

# 創傷治癒に関わる細胞挙動に対するソフトマテリアルによるメカノストレスの影響評価

大阪府立大学大学院理学系研究科

森 英樹

We evaluated the migration ability of fibroblasts and vascular endothelial cells by scratch assay. To evaluate the cell migration ability, cell images were acquired over time as the cells were cultured after cell detachment by scratch treatment. Since both cells filled the detached area by proliferation and migration within 48 hours, the migration rate and direction of each cell was determined by image analysis and calculation based on the temporal images of the cells during 48 hours of culture. Compared to fibroblasts, vascular endothelial cells tended to migrate more perpendicular to the boundary with the detached area. In addition, the migration rate of vascular endothelial cells was slower than that of fibroblasts. By analyzing the migration characteristics of individual cells, we were able to find differences in the migration characteristics of different cell types, which cannot be determined by the conventional method of measuring the total area covered by cells. To investigate the effect of covering with a soft hydrogel as a wound dressing on cell migration, a scratch assay was performed on vascular endothelial cells covered with gelatin-alginate gel after cell detachment. The gel-covered vascular endothelial cells lost their polarity in the direction of migration, and their migration rate became slower. Covering with a soft gelatin-alginate gel seemed to have the effect of delaying the migration of cells to re-cover the wound.

## 1. 緒言

創傷治癒には、皮膚を構成する線維芽細胞やケラチノサイトだけでなく、血管を構成する血管内皮細胞など多くの細胞が関わる。外傷の治療に用いられる創傷被覆材には繊維や軟らかいハイドロゲルなどが用いられるが、その材質や硬さ(粘弾性)はそれらの細胞の移動や形態を含めた様々な挙動に影響を与えられ考えられる。近年、物理的刺激の1つとして細胞の足場の硬さに対する細胞の応答メカニズムが明らかになってきているが、細胞種によってその応答性は異なる<sup>1-3)</sup>。複数種類の細胞からなる生体組織の再生を促すために用いられる生体材料の選定には、それぞれの細胞の材料の硬さに対する応答性も考慮する必要がある。近年の情報科学技術の進歩に伴い、研究に利用できる性能をもったカメラやコンピュータを比較的安価に入手できるようになり、比較的情報量の大きい経時的な培養細胞の画像データを簡便に保存、解析できるようになった。培養細胞の経時的な画像は個々の細胞の移動や形態などに関する非常に多くの情報を含んでいると考えられる。そこで本研究では、インビトロ創傷治癒アッセイ法として利用されているスクラッチアッセイを用いて、線維芽細胞と血管内皮細胞の運動能の違いを調べるとともに、創傷被覆材などに利用されるアルギン酸カルシウムゲルで細胞を被覆した時

に細胞の移動能がどのように変化するかを調べることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞の培養

実験にはマウス線維芽細胞の株化細胞であるSNLとマウス血管内皮細胞の株化細胞であるb.End3とUV $\uparrow$ 2を用いた。細胞は10% FBSおよび抗生物質を含むDMEM培地を用い、ポリスチレン製培養皿上に播種し、炭酸ガスインキュベータ内で37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下で培養した。

### 2.2. スクラッチアッセイ

細胞を3cm培養皿上で80%コンフルエントの状態になるまで培養し、滅菌済ピペットチップの先で接着した細胞の上を1回引掻くことで、幅約700 $\mu$ mの直線状の傷をつけるように細胞を剥がした(図1)。更に、その細胞を引き続き2日間培養する様子を、炭酸ガスインキュベータ内に

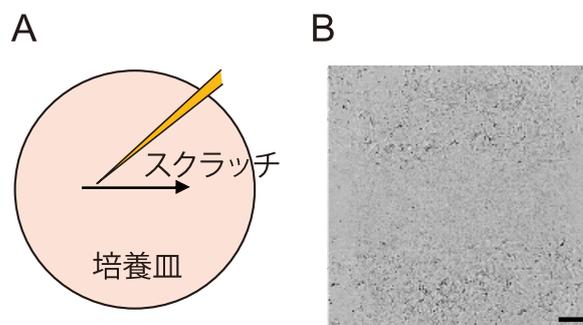


図1 細胞の剥離方法

(A) 細胞の剥離方向と (B) 剥離した細胞の画像 (scale bar=100 $\mu$ m)



Evaluation of the effect of mechanostress by soft materials on cellular behaviors related to wound healing

Hideki Mori

Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

設置した細胞顕微観察装置CytoWatcher（アトー社製）を用いて、20分間或いは30分間隔で経時的に撮影した。

### 2. 3. 細胞の画像解析

経時的に得られた細胞画像をもとに、画像解析プログラムImageJを用いて各画像における各細胞の座標を求めた。連続的に細胞を撮影することができた計110~130個の細胞の座標データから各細胞の6時間毎の移動方向と移動距離を求めた。図2には細胞の移動方向 $\theta$ と移動距離 $l$ を図示した。細胞の移動速度 $v = l \times (t_1 - t_0)^{-1}$ とした。

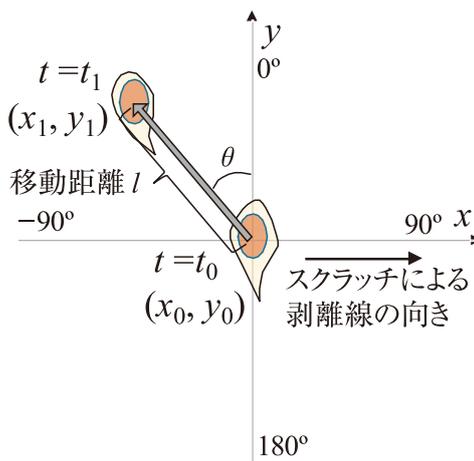


図2 画像解析による細胞移動の距離と移動方向の表し方

### 2. 4. ゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルの作製

アルギン酸ナトリウムが1%、ゼラチンが8%になるように蒸留水に溶解し、ゼラチン-アルギン酸ナトリウム混合液を作製した。ゼラチン-アルギン酸ナトリウム混合液をアルミ製円筒形金型に入れ、18℃ 24時間、10℃ 2時間、4℃ 24時間の順に冷却し、直径15mm、高さ5mmの円筒形ゲルを作製した。更にこのゲルを0.5M塩化カルシウム溶液に24時間浸漬した後にオートクレーブ処理を施し、HEPES緩衝液に3日間浸漬したものを実験に用いた。スクラッチアッセイを実施する直前に、観察する細胞の上からゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲル（ハイドロゲル）を被せた(図3)。

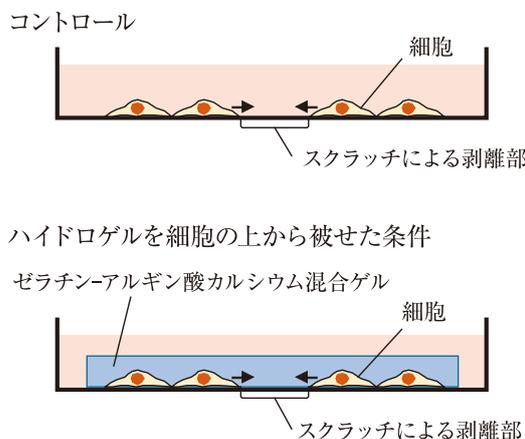


図3 細胞へのハイドロゲルの被せ方

## 3. 結果

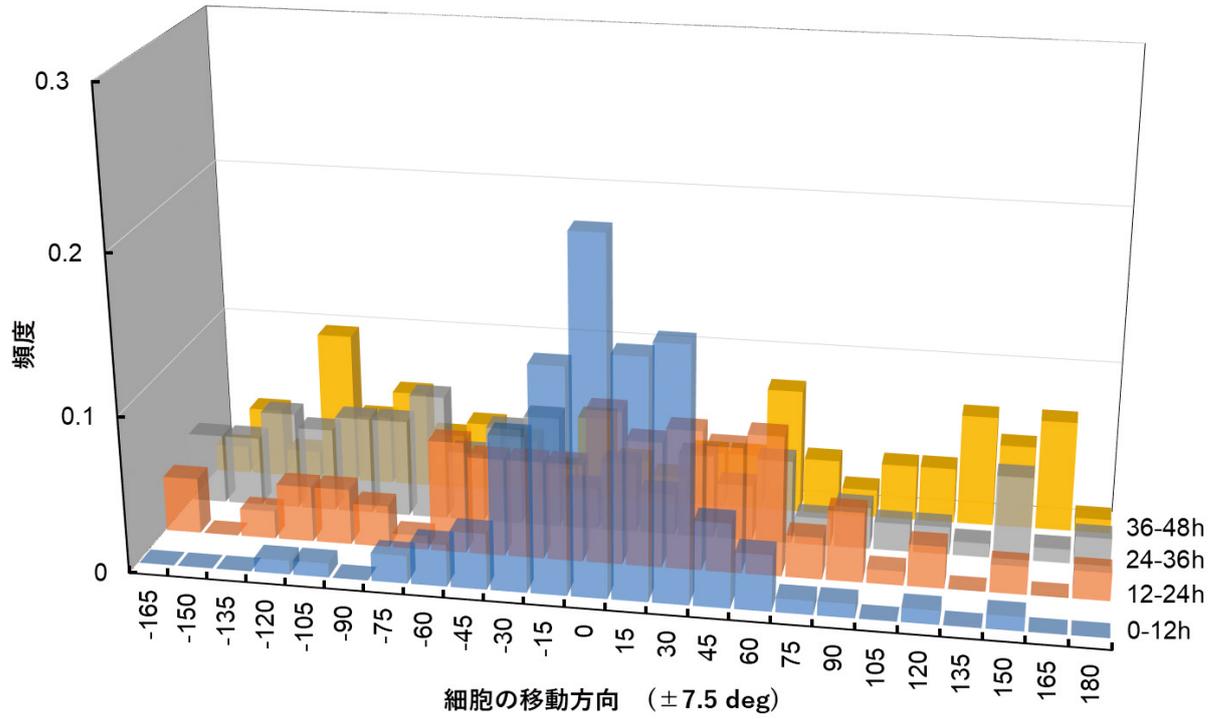
細胞の移動特性を知るためにスクラッチ処理によって細胞を剥離した部分は、いずれの細胞でも増殖と移動によって剥離後48時間程度で細胞が剥離部を埋めた。剥離部を埋めるまでの48時間における細胞の移動特性を評価するために、12時間毎の細胞の移動方向と移動速度の分布を解析し、図4および図5に示した。線維芽細胞SNLは、スクラッチ処理後12時間ではスクラッチ方向に対して垂直な方向( $0 \pm 22.5^\circ$ )へ向かう細胞が全体の約8割を占めていたが、12~24時間では全体の4割程度であり、48時間以降では移動方向の極性がほとんど見られなくなった(図4A)。SNLの細胞移動速度は、スクラッチ処理後24時間までは約9割の細胞が130 $\mu\text{m}/\text{h}$ より低い移動速度で、様々な速度の細胞が見られた。細胞移動速度の平均値はスクラッチ処理後12~24時間で74 $\mu\text{m}/\text{h}$ と最も高く、24時間以降では徐々に低下した(図4B)。

一方、血管内皮細胞b.End3では、スクラッチ処理後24時間までスクラッチ方向に対して垂直に進む細胞は全体の7割以上を占め、24~36時間でも半数の細胞が垂直方向へ移動しており、SNLに比べて移動方向に極性が見られた(図5A)。移動速度に関しては大部分の細胞が80 $\mu\text{m}/\text{h}$ よりも低い速度で移動しており、SNLよりも低かった。スクラッチ処理後12~24時間における移動速度の平均値が

34 $\mu\text{m}/\text{h}$ で各培養期間の中で最も高かった(図5B)。

ヤング率50kPa程度の弾性をもつハイドロゲルであるゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを細胞に被せた時の血管内皮細胞UV $\eta$ 2の移動方向と移動速度に関して、移動速度が最も高くなるスクラッチ処理後12時間における値をもとに解析した。ゲルを被せていない対照条件ではUV $\eta$ 2の移動方向は垂直方向( $\theta = 0 \pm 22.5^\circ$ )に明らかな極性が見られたが、ゲルを被せて培養した条件では細胞の移動方向は360°を24分割したすべての方向にわたっており、移動方向に大きな偏りが見られなかった(図6)。細胞の移動速度もゲルを被せて培養した条件の平均値は20 $\mu\text{m}/\text{h}$ で、対照条件の平均値39 $\mu\text{m}/\text{h}$ に比べ低下した(図7)。また、対照条件では細胞移動速度 $v = 10 \sim 20 \mu\text{m}/\text{h}$ が最頻値であるのに対し、ゲルを被せて培養した条件では細胞移動速度 $v = 0 \sim 10 \mu\text{m}/\text{h}$ が最頻値であった。軟らかいゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを被せることによって、被せられた血管内皮細胞の移動特性に変化が生じた。

A



B

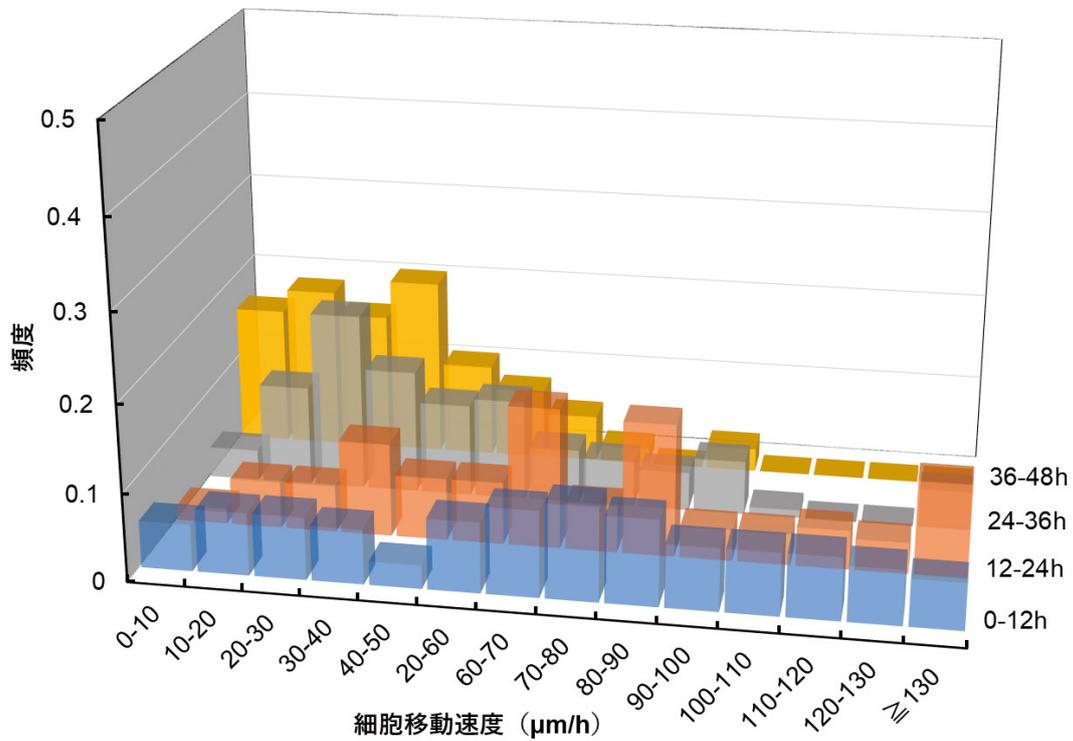
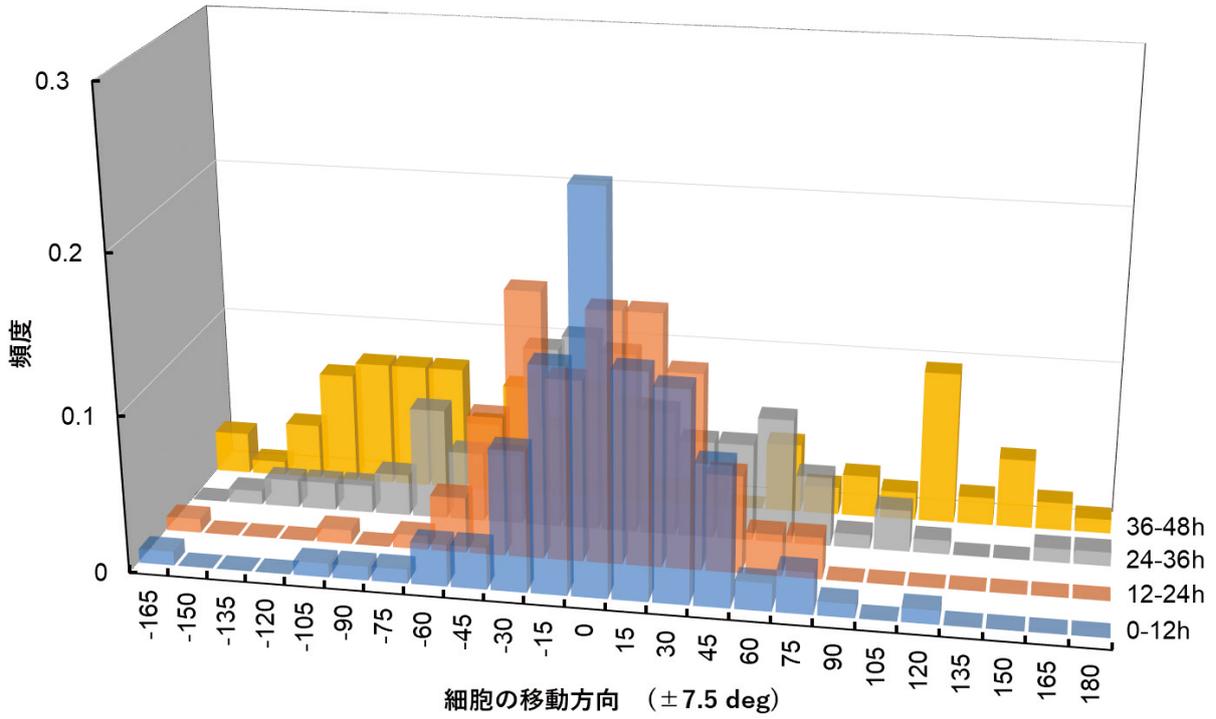


図4 スクラッチアッセイにおける線維芽細胞の移動特性  
線維芽細胞SNLの (A) 移動方向と (B) 移動速度のヒストグラム

A



B

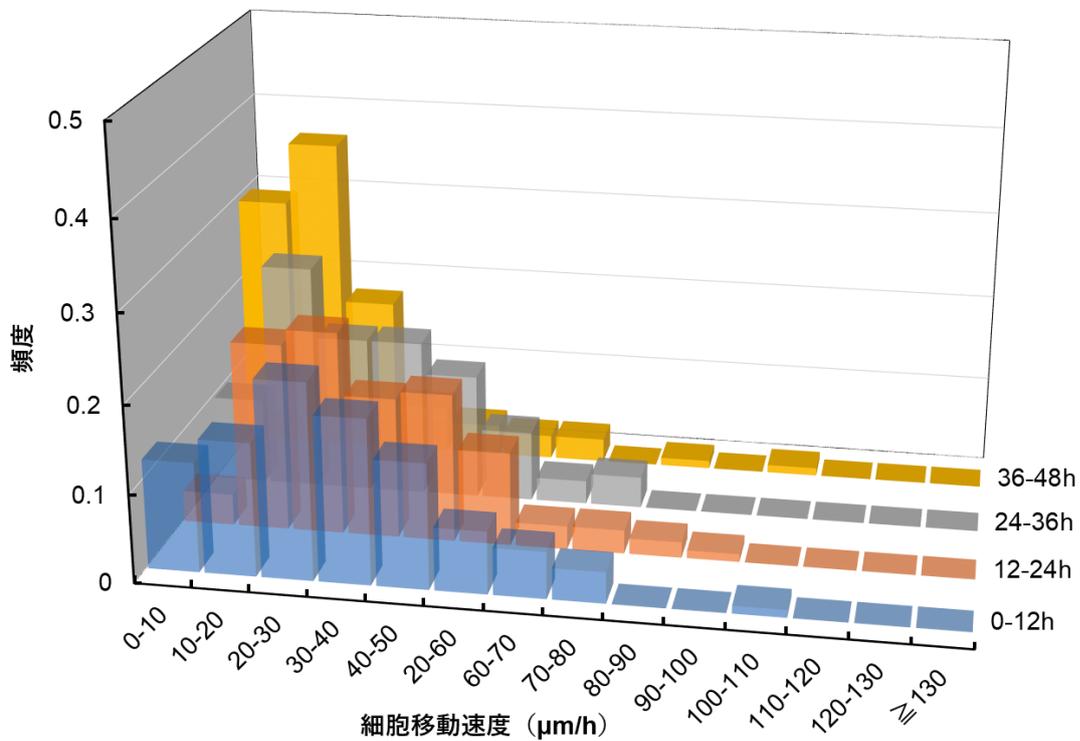


図5 スクラッチアッセイにおける血管内皮細胞の移動特性  
血管内細胞b.End3の (A) 移動方向と (B) 移動速度のヒストグラム

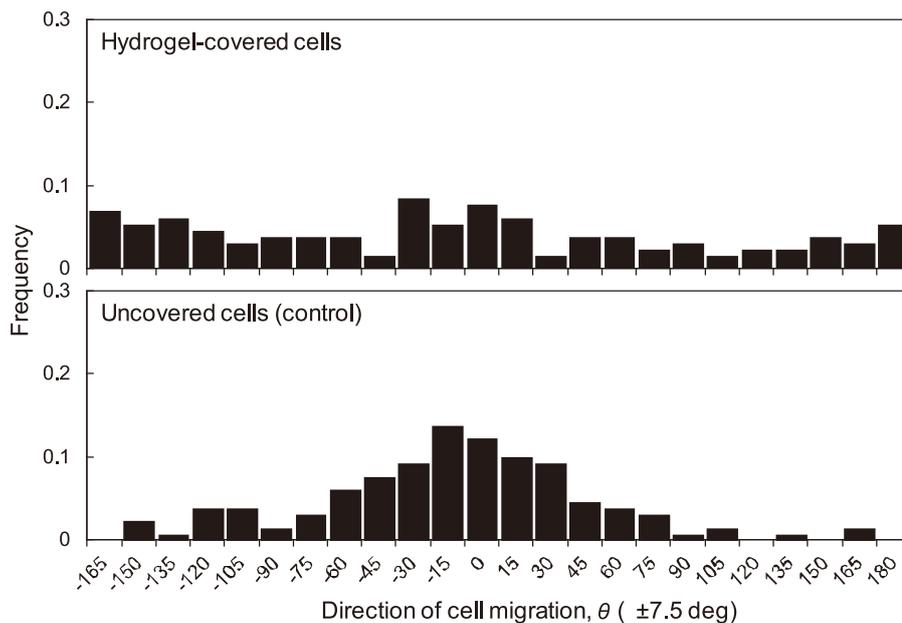


図6 ハイドロゲル被覆培養時の血管内皮細胞UV♀2の移動方向の分布

#### 4. 考察

スクラッチアッセイは *in vitro* で簡便に細胞の移動を評価できる創傷治癒アッセイ法として、皮膚の再生に関わる細胞挙動の研究や塗布薬として効果が期待される低分子化合物の評価など多くの研究に用いられている<sup>4-6)</sup>。しかし、これらのスクラッチアッセイの評価方法の多くは、スクラッチあるいは専用の型によって細胞培養容器中に細胞剥離部を作製し、その剥離部が細胞によって再び覆われる様子を観察し、細胞の再被覆面積の経時変化を定量するものである<sup>7)</sup>。細胞剥離部の再被覆面積の計測は、創傷治癒に対する薬効を簡便に判断できる利用しやすい指標であるが、その細胞による再被覆のメカニズムを知るためには個々の細胞の挙動を注意深く観察し、適切なパラメーターで評価する必要がある。本研究では、細胞の移動方向と移動速度の2つのパラメーターに絞って評価した。線維芽細胞由来のSNLと血管内皮細胞由来のb.End3では移動方向と移動速度のどちらの特性も異なっていた。細胞剥離部を細胞が再被覆する面積および速度を議論する上で、細胞移動速度だけでなく、細胞の移動方向の極性についても考慮する必要があるとされている。最近、細胞集団運動の方向性が細胞間におけるセリン/トレオニンキナーゼであるERKの活性伝搬によって決まることが報告された<sup>8)</sup>。血管内皮細胞由来のUV♀2はゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを被せたことによって移動の方向性の極性が見られなくなったことはゲルの粘弾性がERK活性伝搬に何らかの影響を及ぼしているかもしれない。今後、これらの因果関係について細胞種やパラメーターを増やし、更に研究を進める必要がある。

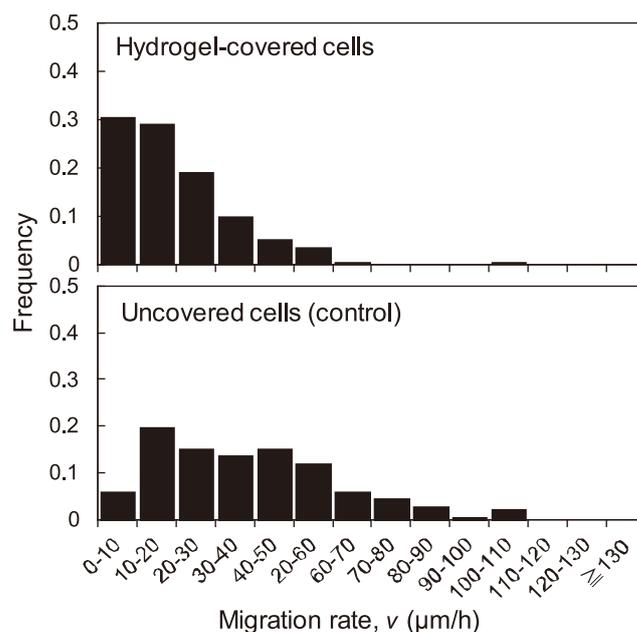


図7 ハイドロゲル被覆培養時の血管内皮細胞UV♀2の移動速度の分布

#### 5. 総括

スクラッチアッセイによって得られた細胞の経時的な画像をもとに、個々の細胞の2種類の移動特性(移動方向、移動速度)を評価した。線維芽細胞と血管内皮細胞の間で細胞種による移動特性の違いを見つけた。また、ゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを血管内皮細胞の上に被せて培養すると、細胞の移動方向に偏りが見られなくなり、移動速度を低下させることを見つけた。本研究で用いた2つの移動特性は創傷治癒に関する細胞挙動評価パラメータ

ーとして、創傷被覆材を評価する指標になることが期待できる。

(引用文献)

- 1) S. Dupont, L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giullitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, S. Piccolo, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature*, 474, 179-185 (2011).
- 2) H. Mori, A. Takahashi, A. Horimoto, M. Hara, Migration of glial cells differentiated from neurosphere-forming neural stem/progenitor cells depended on the stiffness of the chemically cross-linked collagen gel substrate, *Neurosci. Lett.*, 555, 1-6 (2013).
- 3) P. A. Janmey, D. A. Fletcher, C. A. Reinhart-King, Stiffness Sensing by Cells, *Physiol. Rev.*, 100, 695-724 (2020).
- 4) C. -C. Liang, A. Y. Park, J. -L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nature Protocols*, 2, 329-333 (2007).
- 5) A. Grada, M. Otero-Vinas, F. Prieto-Castrillo, Z. Obagi, V. Falanga, Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay, *J. Invest. Dermatol.*, 137, e11-e16 (2017).
- 6) P. Sarkhail, L. Navidpour, M. Rahimifard, N. M. Hosseini, E. Souri, Bioassay-guided fractionation and identification of wound healing active compound from *Pistacia vera* L. hull extract, *J. Ethnopharmacol.* 248, 112335 (2020).
- 7) F. Cappiello, B. Casciaro, M. L. Mangoni, A novel in vitro wound healing assay to evaluate cell migration, *J. Vis. Exp.*, 133, e56825 (2018).
- 8) K. Aoki, Y. Kondo, H. Naoki, T. Hiratsuka, R. I. E. Itoh, M. Matsuda, Propagating wave of ERK activation orients collective cell migration, *Dev. Cell*, 43, 305-317 (2017).