

Title	Study on Endothelial Network Formation in Fluidic Multilayered Myoblast Sheet
Author(s)	Ngo, Trung Xuan
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26216
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

Synopsis of Thesis

Title: Study on Endothelial Network Formation in Fluidic Multilayered Myoblast Sheet

(流動的な特性をもつ積層筋芽細胞シート内における血管内皮ネットワーク形成に関する研究)

Name of Applicant Ngo Xuan Trung

The autologous transplantation of a myoblast cell sheet is emerging as a promising technique for treating myocardial infarction due to the cells' ability to secrete some important cytokines, which improve heart function via the facilitation of angiogenesis and the attraction of progenitors to the infarcted area. The process- and quality- controls are critical steps for realizing in practice a broad cure using myoblast sheet. The clarification of the mechanism by which the endothelial cells of the host migrate into the transplanted myoblast sheets leads to the enhancement of transplant quality. Therefore, in this study, the author aimed to construct a novel 3D *in vitro* culture system imitating the *in vivo* angiogenesis, to understand the mechanism of the network formation of endothelial cells (target cells) in a fluidic multilayered myoblast sheet (packed cells), and to develop observation and image processing methods to analyze cell behaviors toward application of these methods in quality control. In chapter 1, a procedure for fabricating a multilayered cell sheet was developed using a temperature-responsive surface and a stamp system. Confocal laser scanning microscopy and image processing revealed that the fluidity of a multilayered sheet of human skeletal muscle myoblasts (HSMMs) can be estimated analogy to molecular diffusivity, and the sheet fluidity was changed upon addition of dermal fibroblasts. In chapter 2, a novel 3D *in vitro* culture system was developed, in which green fluorescent protein expressing human umbilical vein endothelial cells (GFP-HUVECs) were cultured under HSMM sheets with different layer numbers to vary the thickness of the cell sheet. The difference in the thickness of the cell sheet caused different endothelial behaviors, such as cell detachment on the top of the monolayer sheet, island-shape aggregate on the top of the three-layered sheet, and network formation in the middle and basal layer of the five-layered and seven-layered sheet, respectively, during 96 h of incubation. The thickness of the HSMM sheet, which can be controlled by the number of layers in the cell sheet, is therefore an important factor that affects endothelial behavior in the cell sheet. In chapter 3, an image processing method was developed to quantitatively analyze the dynamic behaviors of endothelial cells during the network formation process. The HUVECs at the bottom of the HSMM sheet elongated, actively migrated upward, encountered and connected to form network in the middle of the HSMM sheet from 0 to 96 h of incubation, and finally degraded at 120 h. Non-networked HUVECs continued to migrate to the top of the sheet, indicating the spatial habitation of HUVECs in the cell sheet. An evaluation of the network extension using image processing showed that initial density of HUVECs strongly affected the extent of endothelial network formation. Overall, this study successfully established a novel 3D *in vitro* culture system imitating *in vivo* angiogenesis with different observation and quantitative analysis methods applicable in quality control. The mechanism of endothelial behaviors during network formation, the initial step of angiogenesis, was clarified by taking into consideration various factors, such as the thickness of the cell sheet, the culture time, and the density of the endothelial cells. The broad, well-connected endothelial network obtained in multilayered myoblast sheet as prevascularization is likely to be successfully applied in regenerative medicine in the future.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Ngo Xuan Trung)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	紀ノ岡 正博
	副 査	教 授	田谷 正仁
	副 査	教 授	馬越 大
	副 査	講 師	長森 英二

論文審査の結果の要旨

患者由来の骨格筋由来筋芽細胞からなる細胞シートの移植は、心疾患の治療法として近年注目されている。筋芽細胞シートを用いた治療が、実践的に広くなされるためには、工程や品質の管理は重要であり、特に、患部側に存在する血管内皮細胞が移植された筋芽細胞シート内へ遊走するメカニズムを明らかにすることは、細胞シートの質的向上につながるものと考えられる。そこで、本研究では、流動する積層筋芽細胞シート（充填細胞）内の血管内皮細胞（ターゲット細胞）のネットワーク形成過程の理解を目的として、まず、温度応答性培養皿とスタンプシステムを用い、細胞シートを積層化する手順の構築を行った。さらに、共焦点顕微鏡による立体的蛍光観察と画像処理により、骨格筋筋芽細胞からなる積層細胞シート鉛直方向内での流動が存在することを見出した。また、異なる細胞シートの厚みでの培養において、単層においては上層での内皮細胞の剥離、3層積層シートでは、最上層での島状集塊形成、5層または7層の積層細胞シートでは、それぞれ中層、低層でネットワークを形成するなど異なる内皮細胞の挙動を示すことが分かった。さらに、5層の筋芽細胞シート底部に置いた内皮細胞は、上方へ活発に遊走し、衝突した細胞同士の連結によって、中層にてネットワークを形成した。一方、ネットワーク形成に関与しない内皮細胞は、上層に遊走し続け、細胞シート上に島状の細胞集塊を形成することが分かった。これにより、内皮細胞は、筋芽細胞シート内にて、連結の有無によって、細胞シート内での内皮細胞の位置的棲み分けと形状変化を引き起こすことが示された。

以上、本研究では、3次元構造を有する積層筋芽細胞シートを構築し、血管新生モデルとしての血管内皮細胞の挙動解析を定量的に行うことができた。血管内皮ネットワークの定量化は、移植後の患部での血管再構築の初期過程を理解する上で重要であり、本研究で得られた知見は、筋芽細胞シートの品質評価手法に関する基礎となるものであり、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。