

令和元年6月21日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04573

研究課題名(和文)送液可能な血管網を備えた立体的な肝組織の構築

研究課題名(英文)Engineering three dimensional hepatic tissues with perfusable vasculatures

研究代表者

福田 淳二(FUKUDA, Junji)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80431675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学細胞脱離技術を利用し、血管様構造をモールドイングする技術を確立し、iPS由来肝細胞スフェロイド、血管内皮細胞、間葉系幹細胞の3つの細胞を用いて、微小血管構造を含む肝組織を構築した。本研究で作製した立体組織は、培養液を送液可能な比較的大きな血管構造とそこから伸びる微小血管網を備えていることから、組織内へ必要十分量の酸素や栄養素を供給できる。その結果、iPS由来肝スフェロイドは、送液培養中に分化し、より成熟した肝組織へと誘導することが可能であった。さらにこのようにして作製した肝組織を直接血管に吻合することでマウスに移植し機能することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療の分野では、送液可能な血管構造を構築する技術の確立が不十分であったため、作製できる移植用組織のサイズは酸素の拡散範囲という制限がかかり、かなり薄いものに限られていた。本研究では、ハイドロゲル内に細胞を適切に配置することで、細胞の自己組織化により機能的な組織が形成されることを示した。また、今後この手法をさらに発展させ、より細胞密度および血管密度の高い機能的な立体組織を作製できれば、直接血管を吻合して移植可能な移植用臓器の作製が可能となり、肝臓に限らず様々な臓器の再生医療につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The lack of fabrication strategy of perfusable vascular networks is a fundamental barrier to engineer thick and cell-dense tissues and organs for regenerative medicine. In this study, we propose a rapid engineering approach of spatially-aligned and perfusable macrovasculatures. We designed an electrochemically cleavable oligopeptide which can be used for cell transfer from a culture surface to a hydrogel. Using this oligopeptide on a needle, macrovasculatures whose internal surface was covered with endothelial cells were fabricated in a hydrogel. The endothelial cells transferred were then migrated and formed luminal structures in the hydrogel, leading to formation of perfusable macro- and micro-vascular networks. Furthermore, by encapsulating iPS-derived hepatic endoderm spheroids between the macrovasculatures, functional liver tissues with vascular networks were induced. This simple and versatile approach promises various applications for engineering three-dimensional thick tissues.

研究分野：生物工学

キーワード：再生医療 肝臓 血管 電気化学 オリゴペプチド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、直径 1~2 mm 程度の肝小葉と呼ばれる最小単位から構成されている。肝小葉は、六角柱で模式的に表され、それぞれの辺縁部にある血管から中心静脈に向けて毛細血管が形成されており、酸素・栄養素などの効率的な物質交換が行える仕組みとなっている。このような血管網を有する肝組織を *in vitro* で構築する技術は未だに確立されておらず、肝臓の再生医療における最大の課題となっていた。一方、血管内皮細胞は、コラーゲンなどのゲル中で培養すると、毛細血管ネットワークを形成する能力があることが古くから知られており、あらかじめ組織内に毛細血管ネットワークを形成しておくことで移植後の生着率が向上することが示されている。しかしながら、このようにして形成する毛細血管ネットワークは、血管内皮細胞が自発的に形成する微小な管腔構造であり、培養液を送液することができず、移植後に生体血管と自発的に吻合することを期待せざるを得ない。そのため、厚みのある組織を *in vitro* で作製することは困難であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した電気化学を利用した細胞脱離技術を用いて血管構造を構築する技術を確立し、なおかつヒト iPS 細胞から誘導した肝前駆細胞スフェロイドと血管構造の自己組織化を誘導することで、送液可能な毛細血管網を備えた立体的な肝組織を構築する。

### 3. 研究の方法

電気化学細胞脱離を用いて作製する血管様構造を肝小葉内の大きな血管(中心静脈、小葉間動脈、静脈)に見立て、これを起点として血管内皮細胞の性質を利用して毛細血管ネットワークを伸長させる。さらに、生体の肝発生を参考にして、iPS 由来肝前駆細胞にこの毛細血管網を取り込みつつ自己組織化させる。これにより、生体外で送液可能な微小血管を有する三次元肝組織を構築する。

### 4. 研究成果

(1) 電気化学的な細胞脱離を、微細な円柱状の金ニードルに応用することで、規則的に配置された血管構造を短時間で作製する手法を考案した。はじめに、直径 500  $\mu\text{m}$  のガラスニードルに金をコートし、オリゴペプチドを介して血管内皮細胞(HUVEC)を接着させ、金ニードル全面を覆うまで培養した。これをアクリルで作製したチャンパに 500  $\mu\text{m}$  間隔で固定した。金ニードルを固定したチャンパ内に光架橋性ゼラチンゲルを導入し、光を 120 秒の照射してゲル化させた。ここで、-1.0 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加することで、HUVEC を金ニードルからゼラチンゲルへと転写し、ニードルを慎重に引き抜くことによって、内表面が血管内皮細胞で覆われた血管様構造を作製した。この様にする事で、血管内皮細胞に裏打ちされ、並列配置された直径約 500  $\mu\text{m}$  の血管様流路構造を工学的に作製する技術を確立した。ここで、Fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) の手法を用いて、細胞転写前後における、細胞間結合の変化を解析した。その結果、隣り合う細胞から低分子量物質が輸送されたため、細胞は細胞間結合の一つであるギャップ結合を保持したまま転写されることを明らかにした。さらに、ゲル側にも血管内皮細胞と間葉系幹細胞を加える事によって、流路構造を連結させる時間を短縮することが可能であった。この血管ネットワークは内部が筒構造になっており直径 1  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズを送液すると血管構造から別の血管構造へと流れこんでいく様子が確認できた。血管様構造の直径や配置は、ガラスロッドの直径と配置を変更することで容易に変えることができる。例えば、直径 500  $\mu\text{m}$  のロッド 9 本を、3×3、500  $\mu\text{m}$  で等間隔配置した鋳型を用い、モールドニングの要領で一度に 3 次元配置することが可能であり、さらにスケールアップし、100 本のニードルを 10×10 配置し cm スケールへ適用できることを確認した。

(2)このように短時間で血管構造を構築する技術と iPS 細胞から誘導した肝細胞を用いて、肝臓類似組織の作製に取り組んだ。ゲルに血管内皮細胞と間葉系幹細胞、iPS 由来肝芽細胞を包埋して、前述したように電気化学的な手法により送液可能な血管構造を作製した。送液培養開始時は、ゲルに包埋した細胞は丸まった状態であるが、培養するとともに伸展していき送液培養 7 日後には血管内皮細胞のネットワークを形成した。血管様流路構造の間の空間を拡大してみると、その間を補完するように微小血管構造が張り巡らされており、その間に iPS 肝スフェロイドが配置されていた。培養とともにアルブミン分泌量、アンモニア代謝量は上昇し、成熟肝細胞マーカーも上昇していることから、送液可能な血管構造を持ったこの肝類似組織は、iPS 細胞の分化を伴いながら、より成熟した肝組織へと発達していることが確認できた。

(3)同様にしてヒト肝細胞を用いて作製した組織体をマウスに移植した。X 線 CT 撮影によって移植後の肝臓デバイスを評価した。その結果、マウス体内に留置したデバイスを in vivo かつ非侵襲的にイメージングすることが可能であった。また、造影剤をマウス尾静脈から注射することで、デバイス内の血管構造を観察することが可能であった。

(4)生体組織では、血管ネットワークに加え、これに神経ネットワークが複雑に張り巡らされることにより、恒常性が保たれている。そこで、ハイドロゲル中に神経細胞と血管内皮細胞を共培養し、安定なダブルネットワークが形成できないか検討した。その結果、神経ネットワークが複雑に張り巡らされること、シナプス形成の指標である  $Ca^{2+}$  を測定すると、神経活動を示すスパイクの頻度が上昇することを示した。さらに神経細胞と血管内皮細胞をハイドロゲル内で共培養することで、血管ネットワークが、単培養したものに比べ、長期的に安定な構造を維持した。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 10 件) 全て査読あり

1. T. Anada, C. Pan, A.M. Stahl, S. Mori, J. Fukuda, O. Suzuki, Y. Yang, Vascularized bone-mimetic hydrogel constructs by 3D bioprinting to promote osteogenesis and angiogenesis, *International Journal of Molecular Sciences* (IF= 3.687), 20(5), 1096 (2019) doi: 10.3390/ijms20051096
2. D. Myasnikova, T. Osaki, K. Onishi, T. Kageyama, B. Zhang, J. Fukuda, Synergic effects of oxygen supply and antioxidants on pancreatic  $\beta$ -cell spheroids, *Scientific Reports* (IF=4.122), 9, 1802 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38011-6>
3. Y. Shimazu, B. Zhang, Z. Yue, G. Wallace, J. Fukuda, Engineering of perfusable double-layered vascular structures using contraction of spheroid-embedded hydrogel and electrochemical cell detachment, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (IF=2.015), 127, 1, 114-120 (2019) doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.07.006
4. J. Enomoto, T. Kageyama, D. Myasnikova, K. Onishi, Y. Kobayashi, Y. Taruno, T. Kanai, J. Fukuda, Gold cleaning methods for preparation of cell culture surfaces for self-assembled monolayers of zwitterionic oligopeptides, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (IF=2.015), 125, 5, 606-612 (2018) doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.014.
5. E. Bianchi, M. Piergiovanni, C. Arrigoni, J. Fukuda, A. Gautieri, M. Moretti, G. Dubini, Herringbone-like hydrodynamic structures in microchannels: A CFD model to evaluate the enhancement of surface binding, *Medical Engineering and Physics* (IF=1.923), 48, 62-67 (2017) doi: 10.1016/j.medengphy.2017.07.003

6. T. Osaki, T. Kageyama, Y. Shimazu, D. Mysnikova, S. Takahashi, S. Takimoto, J. Fukuda, Flatbed *epi* relief-contrast cellular monitoring system for stable cell culture, ***Scientific Reports (IF=4.122)***, 7, 1897 (2017) doi:10.1038/s41598-017-02001-x
7. J. Enomoto, T. Kageyama, T. Osaki, F. Bonalumi, F. Marchese, A. Gautieri, E. Bianchi, G. Dubini, C. Arrigoni, M. Moretti, and J. Fukuda, Catch-and-release of target cells using aptamer-conjugated electroactive zwitterionic oligopeptide SAM, ***Scientific Reports (IF=4.122)***, 7:43375 (2017) DOI: 10.1038/srep43375
8. T. Kageyama, T. Osaki, J. Enomoto, D. Myasnikova, T. Nittami, T. Hozumi, T. Ito, and J. Fukuda, In situ cross-linkable gelatin-CMC hydrogels designed for rapid engineering of perfusable vasculatures, ***ACS Biomaterials Science & Engineering, (IF=4.432)***, 2 (6), 1059–66 (2016) DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00203
9. J. Enomoto, N. Mochizuki, K. Ebisawa, T. Osaki, T. Kageyama, D. Myasnikova, T. Nittami, J. Fukuda, Engineering thick cell sheets by electrochemical desorption of oligopeptides on membrane substrates, ***Regenerative Therapy, (IF=1.182)***, 3, 24-31 (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.reth.2015.12.003>
10. C. Arrigoni, M. Bongio, G. Talò, S. Bersini, J. Enomoto, J. Fukuda, M. Moretti, Rational design of prevascularized large 3D tissue constructs using computational simulations and biofabrication of geometrically controlled microvessels, ***Advanced Healthcare Materials (IF=5.609)***, 5(13), 1617–26 (2016) DOI: 10.1002/adhm.201500958

(学会発表) (計 24 件)

1. 楯芳樹、榎本詢子、景山達斗、福田淳二、松下淳、秋本紗希、根本悠平、電気化学細胞脱離のための金表面洗浄法、化学工学会 第 84 年会、2019
2. 林慎也、大崎達哉、福田淳二、神経・血管相互作用を利用したダブルネットワークの形成誘導、日本動物実験代替法学会 第 31 回大会、2018
3. 福田淳二、血管を含む立体組織をつくるアプローチ、第 80 回日本生物工学会大会、2018
4. J. Fukuda, Engineering small and large tissues based on oxygen supply, TERMIS-WC, 2018
5. S. Ozawa, Y. Kobayashi, C. E.J. Cordonier, S. Kozaki, H. Honma, S. Maruo, J. Fukuda, Transplantation of tailored cell sheets using micro stereolithography and electrochemical cell transfer, TERMIS-WC, 2018
6. H. Akieda, Y. Sonoyama, T. Kageyama, Y. Noda, S. Maruo, J. Fukuda, Fabrication of vascularized bone grafts using bone beads, TERMIS-WC, 2018
7. D. Myasnikova, B. Zhang, J. Fukuda, Ascorbic Acid-2-phosphate protective effect against ROS on pancreatic  $\beta$ -cell spheroids, TERMIS-WC, 2018
8. J. Fukuda, Engineering Tissue Fabrication Processes for Regenerative Medicine, TERMIS-AP, 2017
9. 福田淳二、自己組織化単分子膜を用いた細胞脱離と組織工学、第 17 回日本再生医療学会総会、2017
10. 井関啓人、福田淳二、シーソー型バイオリクターを用いた薬剤評価チップデバイスの開発、日本動物実験代替法学会 第 30 回大会、2017
11. 小林優香、Christopher E.J. Cordonier、野田洋平、本間英夫、丸尾昭二、福田淳二、マイクロ光

- 造形法と生体適合性金めっき法を用いたテイラーメイド型細胞シートの作製、日本動物実験代替法学会 第 30 回大会、2017
12. 大西希咲、福田淳二、酸素透過性培養器を用いた種々の組織細胞のスフェロイド培養、日本動物実験代替法学会 第 30 回大会、2017
  13. 嶋津祐香、Dina myasnicova、福田淳二、平滑筋細胞層を有する in vitro 血管モデルの作製、日本動物実験代替法学会 第 30 回大会、2017
  14. 榎本詢子、福田淳二、電気化学細胞脱離を利用した選択的な細胞の分離・回収技術、日本動物実験代替法学会 第 30 回大会、2017
  15. D. Myasnikova, J. Fukuda, Oxygen supply and oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cell spheroids, 第 69 回日本生物工学会大会、2017
  16. J. Enomoto, A. Gautieri, J. Fukuda, Surface Design for Catch-and-release of Target Cells using Electrochemical Cell Detachment, 12th Annual International Electromaterials Science Symposium, 2017
  17. 篠原礼奈、榎本詢子、大崎達哉、小関智光、中尾裕利、福田淳二、送液可能な血管様構造を用いた血管新生評価デバイスの開発、第 16 回日本再生医療学会総会、2017
  18. 大西希咲、榎本詢子、Dina Myasnikova、福田淳二、 $\beta$  スフェロイドの中空系充填による立体組織作製、第 33 回化学とマイクロ・ナノシステム学会、2016
  19. 榎本詢子、Alfonso Gautieri、福田淳二、アプタマー修飾オリゴペプチド層を用いた選択的な細胞のキャッチ & リリース、第 67 回日本生物工学会大会、2016
  20. 小林優香、Christopher E.J. Cordonier、永瀬史憲、本間英夫、丸尾昭二、福田淳二、マイクロ光造形法と生体適合性金めっきを用いた立体細胞シートの作製、第 67 回日本生物工学会大会、2016
  21. 大西希咲、榎本詢子、福田淳二、 $\beta$  スフェロイドの遠心充填による立体組織作製、第 67 回日本生物工学会大会、2016
  22. Y. Kobayashi, C. E.J. Cordonier, F. Nagase, H. Honma, S. Maruo, J. Fukuda, Transplantation of tailored cell sheets using micro stereolithography and electrochemical cell transfer, International Conference on Biofabrication, 2016
  23. R. Shinohara, J. Enomoto, T. Osaki, Y. Kobayashi, T. Ozeki, H. Nakao, J. Fukuda, Array of perfusable three-dimensional microvasculatures on active tilting stage, MRS Fall Meeting, 2016
  24. K. Onishi, J. Enomoto, R. Shinohara, D. Myasnikova, J. Fukuda, Engineering 3D tissues using oxygen-permeable spheroid plate, Termis-AM, 2016

(図書)(計 2 件)

1. 福田淳二、シーエムシー出版、電気化学的手法による三次元組織の構築、2018、9
2. 榎本詢子、景山達斗、福田淳二、シーエムシー出版、ペプチドおよびアプタマーを用いた選択的な細胞の分離技術、2018、7

(産業財産権)

○出願状況(計 2 件)

1. 名称:細胞培養方法及びその細胞培養方法に用いられる洗浄方法及び洗浄装置  
発明者:宮崎邦浩、林航之介、松下淳、福田淳二、榎本詢子

権利者:株式会社アルバック、横浜国立大学

種類:特許

番号:特願 2017-229919

出願年:2017 年

国内外の別: 国内

## 2. 名称:培養装置及び培養方法

発明者:小関智光、中尾裕利、福田淳二、篠原礼奈、大崎達哉

権利者:株式会社アルバック、横浜国立大学

種類:特許

番号:特願 2016-091020

出願年:2016 年

国内外の別: 国内

### ○取得状況(計1件)

名称:培養方法及び培養装置

発明者:福田淳二、鈴木博章、稲葉里奈、岡村健太郎

権利者:横浜国立大学

種類:特許

番号:2615162(EP)

取得年:2018 年

国内外の別:海外

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:丸尾 昭二

ローマ字氏名:(MARUO, shoji)

所属研究機関名:横浜国立大学

部局名:大学院 工学研究院

職名:教授

研究者番号(8桁):00314047

研究分担者氏名:渡邊 昌俊

ローマ字氏名:(WATANABE, masatoshi)

所属研究機関名:三重大学

部局名:医学系研究科

職名:教授

研究者番号(8桁):90273383

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。