

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14203

研究課題名(和文) マイクロ3Dプリンタと細胞シート技術による3次元状細胞組織の作製

研究課題名(英文) 3D Cell Structure Utilizing Micro 3D Printer and Cell Sheet

研究代表者

梅津 信二郎 (Umezu, Shinjiro)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：70373032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、様々なバイオフィabrication技術が提案されており、これにより、三次元状細胞組織が人工的に作製されている。この組織に毛細血管を内包させることによって、栄養分が内部の細胞に到達し、死滅しない。しかし、毛細血管のように細い組織だけでは、還流する栄養分の量が限定的なため、実際の組織とは異なる。そこで、本研究では、人工細動脈を有する三次元状細胞組織を開発した。

研究成果の概要(英文)：Recently, 3D cell structures are fabricated utilizing many kinds of biofabrication technologies. Cells those are located inside of the 3D structure get nutrition via capillary blood vessels. However, since the capillary is narrow, amount of nutrition is limited. In this study we fabricated cell structures those have arterioles inside.

研究分野：知能機械

キーワード：細動脈 マイクロバイオ3Dプリンタ 細胞シート

## 1. 研究開始当初の背景

現在、臓器や組織の機能が損なわれた疾患に対しては、臓器移植や人工臓器の使用が検討されている。臓器移植で機能の低下した臓器と健康な臓器を取り替えることで機能を回復することが出来る。しかし、ドナー不足は深刻であり、心臓の臓器移植の待機期間は3年程、提供数の少ない腎臓は15年ほどかかる。この待機期間の間に亡くなってしまう人も多く、昨年は心臓移植の待機リストに載った患者のおよそ4割弱しか臓器移植を受けることが出来なかった。また、本人の細胞組織でないため、拒絶反応により悪化してしまう場合もある。人工臓器は内臓や生体の様々な器官や組織の代用として多く用いられているが、装置との拒絶反応や生体適合性の問題も生じる。また、常に機械を入れ続けることで生じる合併症などの予防のため、薬を飲み続けなければならない場合も多く、患者への負担も大きい。これらの問題を解決するにあたり、患者由来の細胞を用いて組織を作製し、実際の臓器の代替物を作製する再生医療が期待されている。

様々なバイオファブリケーション技術が提案され、研究されているが、作製した分厚い組織の内部に存在する細胞への栄養分の供給方法が大きな問題になっている。現状では、直径20 $\mu\text{m}$ 以下の毛細血管網を張り巡らせることで、細胞への栄養分の供給を実現しているが、直径が小さいため、流量が少ない。直径が大きな血管網を細胞組織内に設置することができれば、大幅な流量の増加が期待できる。

## 2. 研究の目的

これまでの研究では、血管内皮細胞を含む細胞シートを積層することにより血管内皮細胞が誘導されて作製されている。直径20 $\mu\text{m}$ ほどの毛細血管を含む三次元状細胞組織は作製されているが、任意の箇所に任意のサイズの血管を作製する方法は確立されていない。また、細胞シートの上にバイオプリンタを用いて細胞やゲルなどのプリントをしようとすると、滲んでしまいプリントすることが出来ない。その他にも様々な方法が研究されているが、どれも20 $\mu\text{m}$ 以下の毛細血管か、200 $\mu\text{m}$ 以上の太い血管であり、細動脈に相当する大きさである20~200 $\mu\text{m}$ の血管を作製する技術は確立されておらず、課題となっている。そこで本研究では、細胞シートの中に生体適合性のあるチタン線、またはバイオマテリアルのファイバなどを挟んで、培養した後で、抜くことにより、管腔構造を作製する。さらに、管腔内に血管内皮細胞を接着させることにより血管構造を作製する。その上で、灌流培養を行うことで、従来の組織に比べてより生体を模擬した機能的三次元状立体組織の構築が期待できる。

また、チタン線は電解研磨などで任意の太さや形状にすることが可能であり、バイオマ

テリアルは、コアセルベーション法やバイオプリンタによって、ファイバ直径を調整可能なため、細動脈に相当する人工血管を内包する三次元状細胞組織の作製を目指す。

## 3. 研究の方法

複数の手法により、人工細動脈を内包する三次元状細胞組織の作製を行ったが、本報告では、スペースの関係で、チタン細線を用いたものみの研究(実験)の方法を示す。従って、細胞シートの作製方法、チタン細線による人工細動脈の作製方法、人工細動脈に対する灌流方法に関して、下記では述べる。

### 3.1 細胞シートの作製方法

直径100mmの培養皿を用いた細胞シートの作製は以下の方法を用いて行う。

10%FBS(ウシ胎児血清)と1%ABを混合したDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)を用いて培養したヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を37に温めたPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で2ml $\times$ 3回洗う。

HBSS(ハンクス平衡塩類溶液)を用いて5倍に薄めたトリプシンを2ml入れ、37インキュベータに5分間入れる。

培養皿のふちを軽くたたいて細胞を培養皿から剥がし、DMEMを2ml入れ、トリプシンを中和した細胞懸濁液を遠沈管に入れる。この作業を2回行い、培養皿の細胞を全て遠沈管に入れる。

細胞懸濁液を入れた遠沈管を遠心機に入れ、25~300rpmで5分間遠心分離を行う。

上澄み液をアスピレーターで吸い、DMEMを入れて混ぜ、セルカントを行う。

200 $\times$ 10<sup>4</sup> cellsの細胞をup cell(セルシード社製、直径35mm)に入れ、合計2mlになるようにDMEMを入れ、37インキュベータで3日間培養する。

3日間培養後、20インキュベータに入れて低温処理を行い、細胞シートを剥離させ、作製する。

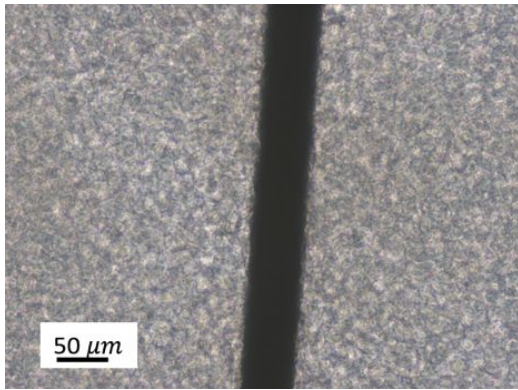
### 3.2 人工細動脈の作製方法

本実験では2枚の細胞シートの間に管腔構造を作製した。

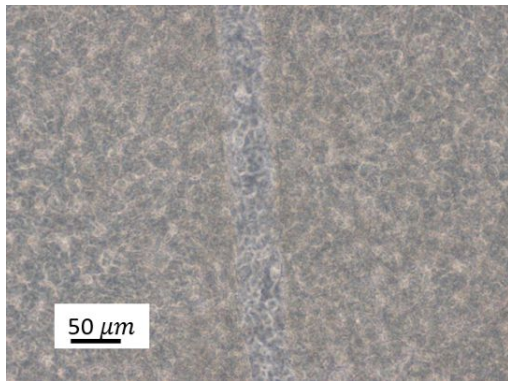
1枚目の細胞シートを60mmの培養皿にのせ、37インキュベータ中で1時間静置することにより培養皿と細胞シートを接着させる。

1枚目を接着させた後に1枚目と同様の処理を行い、剥離した2枚目の細胞シートとチタン線に乗せて20分間静置した後に、遠心機にかけて圧着する。遠心圧着を行うことでチタン線が間にあることで生じる隙間を埋め、2枚の細胞シートをより隙間無く接着することができる。

1枚目と2枚目のシートをより接着させるために37インキュベータに入れて1時間静置させた後、DMEMを入れて1日静置する。静置させた後に4%パラフォルムアルデヒドで



(a) チタン細線を抜く前



(b) チタン細線を抜いた後

図1 チタン細線を用いた人工細動脈を含む積層型細胞組織の作製方法

固定してチタン線を抜く。チタン線を抜く前後の細胞シートを顕微鏡で観察したものを図1に示す。図1に示すように、空洞を設けることに成功した。

### 3.3 灌流実験

人工細動脈に対しての灌流実験を実施する。シリンジポンプを用いて留置針カテーテルに培養液を流し、カテーテルから細胞シートに培養液を流すため、カテーテルを固定しながら細胞シートへの灌流が可能な型を3Dプリンター(EDEN)によって作製した。カテーテルの外径がおよそ400 μmであるのに対し、チタン線の外形が100 μmのため、結合部にアルギン酸ゲルチューブを用いた。

## 4. 研究成果

### 4.1 人工細動脈の作製条件

細胞シート間に、細動脈に相当する管腔を作製するというチャレンジングな試みであったため、様々な実験条件の最適化を行う必要があった。まず、遠心圧着後の静置時間の最適化を行った。遠心圧着後の静置時間を30分としてOCMを用いて断面を観察した結果、上面から見るときれいな管腔が作製されているように見えたが、実際は隙間が多く目立つことが分かった。そのため、よりきれいな管腔を作製するためにTiを挟む条件を検討した。まずは遠心圧着後の静置時間を変化さ

せた。今回は遠心後30分静置したものと1日培養したものの2種類の方法を用いて実験した。挟んで遠心圧着をかけた後に1日間培養することで、細胞が隙間を埋めるように成長することを確認した。

次に遠心圧着時の回転数の検討を行った。遠心圧着をすることにより細胞の接着性が向上することを示した長谷川氏の論文[引用は省略]では遠心圧着時の回転数を300~500 rpm/sと設定していたため、本実験では300、500、1000 rpmの3種類の回転数での接着性の違いを検討した。各条件で作製したサンプルをHE染色した。各回転数による変化はほとんど見られなかった。そのため、回転数300 rpm、遠心時間3分、温度23℃、加速度及び減速度8 rpm/sで統一して実験を行うことにした。

### 4.2 血管内皮細胞のチタンと細胞シートに対する接着特性

細胞シート間に、人工細動脈を作製するにあたり、細胞の接着特性を利用しようと考えた。細胞とチタンの接着力よりも、細胞同士の接着力の方が高い。そこで、血管内皮細胞を接着させたチタン細線を細胞シート間に設置し、抜くことで細胞シート間に血管内皮細胞を設置できるのではないかと考えた。実験した結果、予想通り、チタン細線上に設置した血管内皮細胞を、細胞シートの中に移動させることに成功した。

### 4.3 灌流培養系の構築

下図に示すように、培養皿にカテーテルを固定するための切れ込みを設けた。カテーテルごと遠心機に入れると、カテーテルに作用する遠心力が大きいため、ゲルチューブや細胞シートが過負荷になり、潰れてしまうので、遠心圧着を行う際はカテーテルの先端部のみを挟んだ。この手法により、細胞シート間にチタン細線を挟み込むことに成功したが、チタン細線を抜く際に、カテーテルの先端部を抑える必要があるが、アルギン酸ゲルチューブが潰れてしまい、灌流できなかった。

そこで、カテーテルごと遠心機に入れることが可能な型の作製を行った。カテーテル支持部は3Dプリンタで作製した型にシリコンを入れ、カテーテルを乗せて型取りするこ

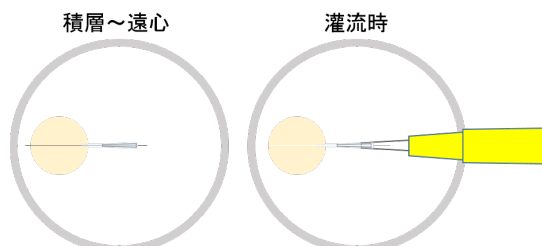


図2 カテーテルに作用する遠心力の問題を解決する工夫。

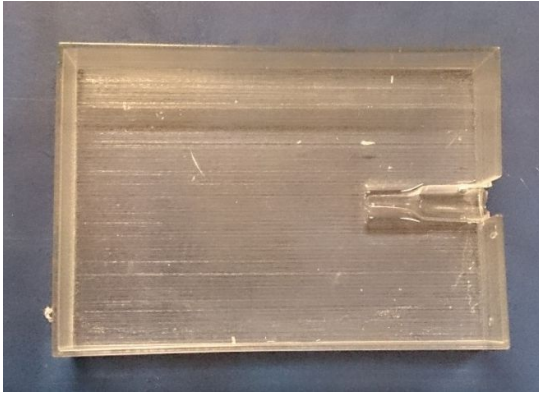


図 3 シリコンによるカテーテルの固定が可能な 3D プリント型。

とで作製した。この型を用いることにより培養皿を用いて作製した型に比べてカテーテルをより安定して固定することが可能となった。しかし、シリコンが片側のみであるため、カテーテルを乗せた際は問題が無いが、カテーテル先にシリンジポンプを接続した際にシリンジポンプとの接続部のチューブの重みにより、接合部が下がってしまい、カテーテル先端が持ち上がってしまうという問題があった。

カテーテルをより強固に固定するために、カテーテルの全周を固定する型を改めて 3D プリントで作製した。この型を使用することで、チタン細線を挟む際、抜く際、そしてシリンジポンプと接続する際に発生した問題を解決できた。

#### 4.4 灌流試験

人工細動脈を有する細胞シートに対して、シリンジポンプを用いて灌流試験を行った。流量は 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  で直径 1  $\mu\text{m}$  の蛍光粒子の灌流を行った。管腔内への灌流に成功した。今後は長期間灌流を行った際に、細胞シート内の細胞や血管内皮細胞に発生する変化を精密にモニタリングしていく予定である。



図 4 灌流実験装置の全体図。

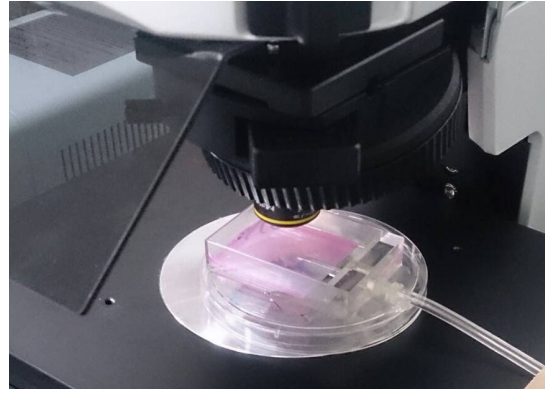


図 5 人工細動脈に対する灌流実験。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Takashi Ohya, Kazuki Nakazono, Tetsutaro Kikuchi, Daisuke Sasaki, Katsuhisa Sakaguchi, Tatsuya Shimizu, Kenjiro Fukuda, Takao Someya, Shinjiro Umez, Simple action potential measurement of cardiac cell sheet utilizing electronic sheet, Artificial Life and Robotics, 査読有 (in printing)

Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Shinjiro Umez, Fundamental characteristics of printed gelatin utilizing micro 3D printer, Artificial Life and Robotics, 査読有, 22 (3), 2018, pp. 316-320.

Takafumi Arai, Ryuichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Shinjiro Umez, Fabrication of micro-gelatin fiber utilizing coacervation method, Artificial Life and Robotics, 査読有, 22 (2), 2017, pp. 197-202.

Katsuhisa Sakaguchi, Takafumi Arai, Tatsuya Shimizu, Shinjiro Umez, Fabrication of micro-alginate gel tubes utilizing micro-gelatin fibers, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 56 (5S2), 2017, 05EB06.

〔学会発表〕(計 7 件)

田村隆行, 田中龍一郎, 梅津信二郎, マイクロ放電加工によるゼラチンゲルの複雑形状加工, IIP2018 情報・知能・精密機器部門(IIP 部門)講演会 (2018).

秋元溪, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, マイクロチタン線を用いた 3 次元状生体組織内への血管様構造の作製, 日本材料学会関東支部 学生研究交流会 (2017).

田村隆行, 田中龍一郎, 梅津信二郎, ゼラチンゲルのマイクロ放電加工における



加工形状の調査, 日本機械学会第 1 回機械材料・材料加工部門 若手ポスターシンポジウム (2017).

田中龍一郎, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, マイクロバイオ 3D プリンタを用いたバイオマテリアルゲルパターンニング技術の開発, 第 56 回日本生体医工学大会 (2017).

秋元溪, 新井隆史, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, 細胞シート工学とマイクロチタンファイバーを用いた血管様構造を有する立体組織の構築, 第 16 回日本再生医療学会総会 (2017).

秋元溪, 坂口勝久, 清水達也, 梅津信二郎, バイオマテリアルをコートしたチタン細線における細胞接着・成長特性, 第 24 回機械材料・材料加工技術講演会 (2016).

Ryu-ichiro Tanaka, Katsuhisa Sakaguchi, Tatsuya Shimizu, Shinjiro Umezu, Biomaterial Printing Utilizing Micro 3D Printer, CEMS Topical Meeting on Soft Robotics (2016).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 人工血管ユニットの製造方法及び人工血管ユニット

発明者: 梅津信二郎、坂口勝久、秋元溪、清水達也

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2018-95023 号

出願年月日: 平成 30 年 5 月 17 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.umeshin.mmech.waseda.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 信二郎 (UMEZU, Shinjiro)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号: 70373032

(2) 研究分担者

坂口 勝久 (SAKAGUCHI Katsuhisa)

早稲田大学・理工学術院・主任研究員(研究院准教授)

研究者番号: 70468867