

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01374

研究課題名(和文)水溶性二層培養液の液層界面浮遊培養による毛細血管網形成法の開発

研究課題名(英文)A biophysical study of capillary formation on a liquid layer interface using an aqueous two-phase system

研究代表者

矢口 俊之(Yaguchi, Toshiyuki)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号：70385483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞組織の構築技術は、細胞の3Dプリントや、細胞シートの積層技術等、数多くの研究が進められているが、臓器のように大きく厚みのある組織の再生には多くの技術的課題がある。高密度な毛細血管網を構築する方法が確立されていないことも解決すべき問題の一つであり、本研究では新規な毛細血管構築法の開発を目指し、水溶性二層培養液(Aqueous Two Phase System, ATPS)を用い、さらに細胞の足場である Scaffoldを用い内皮細胞の液層界面での培養により毛細血管構築を目指した。さらにATPS培養液を用いた細胞懸濁液滴の浮遊培養による細胞凝集塊形成法の基礎検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、毛細血管網が高い再現性で構築可能となれば、今後、再生医療分野における臓器再生技術に大きな進展をもたらすと予想される。また、毛細血管網が本方法にて発生、伸展するメカニズムが解明されれば学術的にも新規な知見であり、これは昨今のiPS細胞を用いた臓器再生や、細胞の3Dプリンティングや細胞シート工学等、他の細胞組織構築技術と併用することも可能な基盤技術となる。将来的には人の健康、QOL向上にもつながら、社会に貢献可能な独創的な技術である。

研究成果の概要(英文)：In regenerative medicine, it is necessary to construct tissues from cells to regenerate functional organs. At present, it is difficult to construct organs of a size comparable to that of human organs. In this research, we applied an aqueous two-phase system (ATPS) that has been proposed for use as a two-dimensional cell patterning technology, to develop a new cell-based tissue construction platform. ATPS displays the excellent features of 1) allowing cells to be handled in a wet state at all times (which is less damaging), and 2) propagating molecular signaling via solvent. The system uses a culture medium (ATPS culture solution) that separates into the following two phases: dextran (DEX) phase, and a polyethylene glycol (PEG) phase. Cells were suspended in droplets of the DEX phase. We then assessed the feasibility of cell aggregate formation by maintaining this cell suspension in the PEG phase.

研究分野：生体医工学

キーワード：毛細血管 オルガノイド 細胞凝集塊

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療と周辺技術は世界的にも急速に発展しつつあり、社会的にも実用化の期待が高まっている。細胞を組織構築する技術は、細胞の3Dプリントや、細胞シート技術等、数多く開発されているが、一般にイメージする心臓や肺などの大きな臓器の再生構築は未だ成されていない。様々なアプローチで研究が進められており技術の発展を待つ必要もあるが、厚みのある細胞組織はその内部へ十分な血流を届け、栄養供給と代謝を担うための十分な毛細血管網が必要であり、その構築法が確立していないことも大きな要因であると考えられている。

我々はこれまでに、高分子を材料とした繊維性 Scaffold が、毛細血管の新生を誘導しうる可能性を実験的に見出し、知財権の申請を行った(幡多,村井ら(研究協力者)と本学の共同出願,毛細血管の製造方法および毛細血管の製造装置(特願 2011-270360 および 2013-199317))。この技術により Scaffold の微細構造を毛細血管新生に適した構造に設計、試作し、専用設計した試作培養チャンバーにて内皮細胞を灌流培養することにより、直径約 20  $\mu\text{m}$  の毛細血管の構築が確認できた。しかし、再現性は低く、その最適な装置条件等は不明であった。

### 2. 研究の目的

本申請ではこれらの繊維性 Scaffold と Aqueous Two Phase System(ATPS)培養液を併せて用いることにより、新規な毛細血管網構築法を提案した。ATPS 培養液の濃度、溶質の分子量、混合比を調整して液層界面に内皮細胞を高密度に浮遊させ、その界面に毛細血管網新生に適するよう高空隙率に構造設計した繊維性 Scaffold を定位させる。これによって従来は困難であった繊維性 Scaffold 内部へ高密度の内皮細胞播種を実現することを目指し、灌流培養の条件を詳細に検討することで予備実験と比較して高い再現性で、かつ高密度の毛細血管網の構築法を確立することを目的とした。

また、研究課程で新たに見出された新規手法として、ATPS 培養液中での浮遊培養による毛細血管網を備えた細胞凝集塊形成法についても基礎検討した。この方法では、高密度に局在化させた接着性細胞懸濁液滴を浮遊させて培養することにより、内皮細胞を含む細胞凝集塊の形成を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 Scaffold を用いた液層界面培養による毛細血管形成の検討

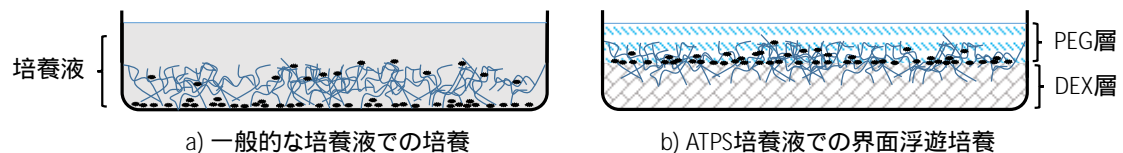


図 1 Scaffold への内皮細胞播種

毛細血管新生には繊維間隙が非常に大きい繊維性 Scaffold が適しているのだが、この Scaffold に内皮細胞を播種しても、細胞が繊維に接着する前に繊維間隙を沈下してしまうため、繊維性 Scaffold へ内皮細胞を十分な密度で播種することが困難であるためだと考えた(図 1 (a))。そこで本研究では ATPS 培養液の濃度、溶質の分子量、混合比を調整して液層界面に内皮細胞を高密度に浮遊させ、その界面に毛細血管網新生に適するよう高空隙率に構造設計した繊維性 Scaffold を定位させる。これによって従来は困難であった繊維性 Scaffold 内部へ高密度の内皮細胞播種を実現することを目指した(図 1 (b))。

基礎検討として、細胞を懸濁させた DEX 相の液滴を、PEG 相培養液で満たされたパイプ型培養槽に浮遊させた状態を維持することを目的として、実現可能性評価を行った。

ATPS を構成する水溶性ポリマーとして、先行研究での細胞培養例を参考に Polyethylene glycol (PEG, Mw: 35K, Sigma-Aldrich) と Dextran (DEX, Mw: 500K, Pharma-cosmos) の 2 種を用いた。ATPS 培養液は、細胞の種類に合わせた培地にて各ポリマーを溶解後、0.2  $\mu\text{m}$  の孔径フィルターに通して小さな粒子および不純物を除去した。その後、培養温度である 37  $^{\circ}\text{C}$  で遠心分離することにより、二相 (PEG 相, DEX 相) に分離した ATPS 培養液を得た。

#### 3.2 ATPS 溶液を用いた浮遊培養システムの構築

##### 1) ATPS 溶液浮遊培養システムの設計と構築

ATPS 溶液を灌流させることによって浮遊培養を行うため、ATPS 浮遊培養システムを設計・試

作した。予備検討では、最小要素で構成されたプロトタイプシステムを試作し、手動で流量制御をして細胞凝集塊形成の実現可能性を検討した。浮遊原理としては、縦方向に立てたチューブ型培養槽の内部を比重が小さい方の液相である PEG 相で満たし、図 2 の A 端より細胞を懸濁した DEX 相液滴を滴下し密封する (図 2 ①)。細胞を懸濁した DEX 相の液滴は PEG 相よりも比重が大きいためチューブ型培養槽の内部で重力の影響によりゆっくり沈降していく (図 2 ②)。DEX 相が沈降し着底しないように、B 端から A 端の方向に PEG 相の流れを付与する事で、図 1 の AB 間において DEX 相が常時浮遊している状態を保ち長時間維持させる (図 2 ③)。重力下で浮遊する DEX 相内部で細胞を培養することで、従来法のように底面で接着し平面状に増殖することなく、三次元的な構造を持つ細胞凝集塊を簡単に培養することが可能になると考えた (図 2 ③)。

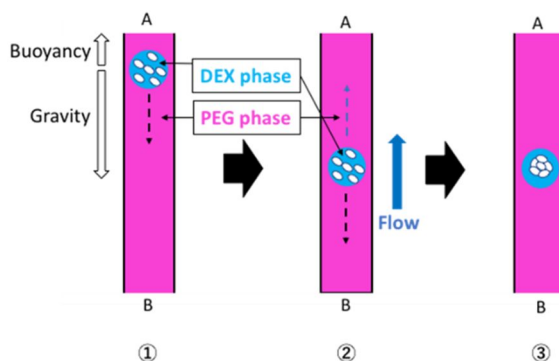


図 2 ATPS 浮遊培養の原理

## 2) 細胞を用いた浮遊培養実験と細胞凝集塊の評価

基礎評価に用いる細胞種として、マウス線維芽細胞様細胞株 (NIH-3T3)、マウス由来血管内皮腫瘍細胞 (RCB1994 UV 2)、ヒト由来臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の 3 種類で検討した。それぞれの細胞は、細胞供給元が提供する培養条件、培地にて継代をしてから実験に用いた。

DEX 相液滴内部に懸濁した細胞が凝集塊を形成するか検討を行った。本浮遊培養システムを用いて浮遊状態を 1~5 時間維持した後、DEX 相液滴をガラスボトムディッシュ上に移し、共焦点顕微鏡 (FV10C-02, Olympus) を用いて観察を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 Scaffold を用いた液層界面培養による毛細血管形成の検討

計画初年度では、Scaffold 構築システムを用いた高分子製 Scaffold の微細構造設計と試作を行い、また、Scaffold を組み込んだ灌流培養チャンバーの設計および試作を行った。そして、ATPS 培養液の基本特性評価として、分子量、濃度、混合比等を調整した際の接触角の変化等について検討した。また、灌流システムについてはポンプシステムの選定とその制御に関する基礎検討を行った。平成 30 年度にはシステムの試作を進め、それを用いて実際の細胞を用いた基礎検討を開始し、試作毛細血管構築システムを用い、細胞の組織化に関する基礎検討を行うことができた。しかし、本提案手法による毛細血管形成に関しては従来法に比較して改善や芳しい結果を得られなかった。

### 4.2 ATPS 溶液を用いた浮遊培養システムの構築

#### 1) ATPS 溶液浮遊培養システムの設計と構築

PEG 相で満たされたパイプ型培養槽内に細胞を懸濁した DEX 相液滴を 20  $\mu$ L 滴下する事で、液滴が図 3 に示すような長楕円体のような形状になり、ポンプの流量を適切に設定する事で、DEX 相液滴の内部に細胞を隔離したまま、液滴を保ったままで浮遊状態が維持されることが確認された。

#### 2) 細胞を用いた浮遊培養実験と細胞凝集塊の評価

今回構築した浮遊培養システムのプロトタイプでは装置的制約のため数時間の浮遊培養しか行えなかったが、その結果、細胞懸濁 DEX 液滴を浮遊状態で PEG 液相中に定位 (浮遊) させること、3 時間の浮遊培養によって接着性細胞 (線維芽細胞) が細胞凝集塊を形成することを確認できた (図 4)。ただし、20  $\mu$ l の DEX 相液滴内に懸濁した細胞が全て一つの凝集塊となるわけではなく、DEX 相液滴内に数十~数百  $\mu$ m オーダーの凝集塊が多数形成された。これまでに、マウス由来線維芽細胞 (NIH-3T3) の他、マウス由来血管内皮腫瘍細胞 (RCB1994 UV 2)、ヒト由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて同様の実験を行ったところ、やはり同様の凝集塊形成が確認された。今後、システムの改良によりさらに長期間の浮遊培養が可能となれば、さらに凝集が進んでより大きな凝集塊となることや、組織化が進みスフェロイド化や毛細血管が形成される可能性があると考えられる。

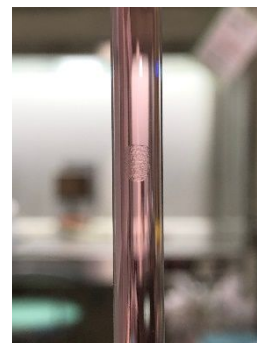


図 3 ATPS 浮遊培養

次に、回収した細胞凝集塊を構成する細胞の生死判定をするため、Propidium Iodide (励起/蛍光 [nm] = 535/617, 富士フイルム和光純薬) により死細胞を核染色し、蛍光顕微鏡 (EVOS Cell Imaging Systems, Thermo fisher) を用いて観察した。その結果、今回行った3時間の浮遊培養においては問題となるような死細胞は確認されなかった。今後はより長時間での浮遊培養を行った場合の細胞の生存性やバイアビリティについての検討が必要である。

これらの検討により新たな臓器再生法の基礎技術としての構築を目指す。本法により細胞凝集塊を実体顕微鏡下でハンドリングできるレベルのサイズで形成できれば、特殊な機器を用いずとも、組織工学的な新規技術となる可能性がある。

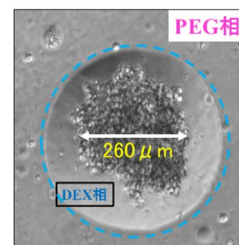


図4 形成された細胞凝集塊

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 矢口俊之, 井上聡	4. 巻 -
2. 論文標題 水性二相系培養液を用いた細胞組織構築法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鬼頭大海 1、大越康晴、平塚傑工、中森秀樹、平栗健二、住倉博仁、矢口俊之、本間章彦
2. 発表標題 プラズマ照射後の DLC 表面の親水性の持続性と細胞接着への影響
3. 学会等名 第28回 ライフサポート学会 フロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田拓実, 住倉博仁, 藤井豊, 荒船龍彦, 大越康晴, 矢口俊之, 本間章彦
2. 発表標題 ラット体外循環モデルに適用可能な外部灌流型人工肺の開発
3. 学会等名 第28回 ライフサポート学会 フロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本桂大, 大越康晴, 平栗健二, 矢口俊之, 本間章彦
2. 発表標題 PBF溶液によるDLCへの簡易的なドーピング方法の検討
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多積直之, 大越康晴, 宮田登, 宮崎司, 矢口俊之, 本間彰彦
2. 発表標題 中性子反射率法による窒素含有DLC薄膜の構造評価
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中里悠一郎, 本間章彦, 平栗健二, 矢口俊之, 大越康晴
2. 発表標題 NIH-3T3細胞の接着性および挙動に及ぼす窒素含有DLCの影響
3. 学会等名 第32回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 アルヤ アミラ, 藤本桂大, 平栗健二, 本間彰彦, 大越康晴
2. 発表標題 DLCの膜構造および電気特性における熱拡散ホウ素ドーピングの影響
3. 学会等名 第32回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間山竜也, 宮田 登, 平塚傑工, 中森秀樹, 本間章彦, 平栗健二, 大越康晴
2. 発表標題 各種成膜方法により成膜したDLCの膜構造と表面特性との関連性の検討
3. 学会等名 第32回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼頭大海, 平塚傑工, 中森秀樹, 本間章彦, 平栗健二, 大越康晴
2. 発表標題 プラズマ照射によるDLCの親水性の付与と表面変化
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Nakazato, N. Miyata, T. Miyazaki, N. Tatsumi, T. Yaguchi, A. Homma, K. Hirakuri, Y. Ohgoe
2. 発表標題 Effect of nitrogen contained in a-C:H film deposition for cell behavior
3. 学会等名 ICDCM 2018 (29th International Conference on Diamond and Carbon Material)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. Tatsumi, T. Mayama, Y. Nakazato, N. Miyata, T. Miyazaki, Y. Ohgoe, K. Hirakuri, and A. Homma
2. 発表標題 Investigation of N <sub>2</sub> -Containing DLC Film Structure based on Electrical Properties for Biological Response by Neutron Reflectance
3. 学会等名 IUMRS-ICEM (International Conference on Electronic Materials)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abdul Rahin Nur Shuhadah, 志村まり, 矢口俊之, 荒船龍彦, 本間章彦
2. 発表標題 繊維性スキャフォールドを用いた細胞運動形態評価システム
3. 学会等名 第56回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Abdul Rahin Nur Shuhadah, 志村まり, 矢口俊之, 荒船龍彦, 本間章彦
2. 発表標題 異なるDLC窒素比の成膜繊維性スキャフォールドを用いた細胞運動形態評価システム
3. 学会等名 第33回ライフサポート学会大会・LIFE2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢口俊之, 木村拓海, 大越康晴, 荒船龍彦, 住倉博仁, 高山秀一, 本間章彦
2. 発表標題 二相液体システム (Aqueous two phase system) による細胞培養技術開発
3. 学会等名 第27回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Sakurai, R. Ohnishi, K. Kanamori, H. Zama, T. Yaguchi, A. Homma, and Y. Ohgoe
2. 発表標題 Effect of post deposition thermal annealing on ALD-alumina for biomedical surface interaction
3. 学会等名 IUMRS-ICAM 2017 (The 15th International Conference on Advanced materials (国際学会))
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Nakazato, N. Shuhadah, T. Yaguchi, K. Hirakuri, A. Homma, and Y. Ohgoe
2. 発表標題 Effect of CH <sub>4</sub> + N <sub>2</sub> Plasma on a-C:H film for Cell Proliferation
3. 学会等名 IUMRS-ICAM 2017 (The 15th International Conference on Advanced materials (国際学会))
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 矢口俊之, 井上聡, 大越康晴, 荒船龍彦, 住倉博仁, 本間章彦
2. 発表標題 水溶性二相系 (Aqueous Two Phase System) を用いた細胞組織構築法の基礎技術開発
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢口俊之, 井上聡, 大越康晴, 荒船龍彦, 住倉博仁, 本間章彦
2. 発表標題 水溶性二相系培養液を用いた細胞組織構築法の基礎検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 浮遊培養装置及び浮遊培養方法	発明者 矢口俊之, 井上聡	権利者 東京電機大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-191368	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>1) 東京電機大学 新技術説明会  <a href="https://shingi.jst.go.jp/kobetsu/dendai/2019_dendai.html">https://shingi.jst.go.jp/kobetsu/dendai/2019_dendai.html</a></p> <p>2) メディア掲載：「浮かぶ液滴内で細胞塊培養、東京電機大、相互作用解明へ」, 日経産業新聞7ページ, 2019年11月6日掲載</p>
--

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大越 康晴  (Ohgoe Yasuharu)  (10408643)	東京電機大学・理工学部・准教授    (32657)	
研究分担者	本間 章彦  (Honma Akihiko)  (20287428)	東京電機大学・理工学部・教授    (32657)	
研究分担者	荒船 龍彦  (Arafune Tatsuhiko)  (50376597)	東京電機大学・理工学部・准教授    (32657)	