

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12068

研究課題名（和文）生体組織様ヒト立体バイオ心筋組織の遠心力による迅速な作製法の確立

研究課題名（英文）A rapid fabrication system of a morphologically and functionally communicative three-dimensional cell-dense cardiac tissue by centrifugation

研究代表者

原口 裕次 (Yuji, Haraguchi)

東京女子医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：80272251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：温調機能付きプレート遠心機のプレートにかかる遠心力を最適に制御することで、遠心力を強めても組織障害等を起こすことなく、細胞を播種後最短30分で立体組織を作製できることが分かった。またヒトiPS細胞由来心筋細胞を用い作製した立体組織は遠心後3時間以内に機能的にも結合することが分かった。作製したヒト心筋組織をラット皮下に移植したところ、生着した組織の厚さは200 μmを超えており、その拍動も確認できた。さらに微細藻類を共培養することで細胞障害を抑えながら厚さ400 μmの立体組織を維持培養可能であることが分かった。逆に不均一にかかる遠心力を利用することで組織を目的方向に伸長させることにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、細胞シート技術は多様な組織作製に用いられ、7つの診療科において治験・臨床研究が行われている。立体的に細胞を積み上げる技術が開発されたことで、より多くの細胞の移植が可能となる。一方細胞シート積層化で立体組織を作製する過程にかかる時間は数時間であるが細胞シートの作製には数日を要する。今回機能的に結合する移植可能な組織を、遠心力を用い細胞播種後数時間以内に作製できること、すなわち細胞を播種当日に組織移植を行える可能性を示した。さらに藻類を共培養することで厚い組織でも壊死を抑えながら培養できることを示した。これらの成果は患者QOLの向上および新たな機能を有する組織作製に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：A transplantable three-dimensional tissue having 200 μm-thickness was fabricated without cytotoxicity at 30 min by a swing-type centrifuge with a heating function. Additionally, human electrically/functionally communicative cardiac tissues were fabricated within 3 h after the centrifugation by using iPS cell-derived cardiac cells. The transplantation of the cardiac tissue showed effective engraftment and beatings. The transplanted cardiac tissue had more than 200 μm-thickness. Furthermore, the co-cultivation with microalgae improved the culture condition of thicker tissues fabricated by using the centrifugal system, resulting in the fabrication/maintenance of 400 μm-thickness tissues.

研究分野：細胞生物学、組織工学

キーワード：迅速立体組織作製 細胞間接着 プレート遠心機 遠心力制御 藻類共培養 組織移植 ヒト心筋組織 温調機能

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在細胞シート工学は多くの組織作製に用いられ、すでに循環器外科学等の7つの診療科において治験・臨床研究が行われている。複数の細胞シートを積層し、立体的に細胞を積み上げる技術が開発されたことで、より多くの細胞の移植が可能となる (Nat Protoc, 7, 850, 2012)。これらの方法で細胞が非常に密に存在し、機能的にも結合した立体組織を作製できる (Biomaterials, 27, 4765, 2006)。作製組織は移植後、宿主組織と12時間以内に速やかに結合する (J Tissue Eng Regen Med, 10, 700, 2016)。多層化した細胞シート立体組織を移植すると、単層の細胞シート移植と比較し、より高い治療効果を示す (Stem Cells Trans Med, 1, 136, 2012)。細胞シートの積層枚数を増やすことでパラクライン効果は増大し、また拍動バイオ心筋組織のポンプ機能はより強力となり、移植後傷害心に対し強力なサポートが期待される。分厚いバイオ立体組織の作製は効果的な治療法の確立、治療適応の拡大につながる。また立体組織内の細胞は、二次元的に培養された細胞に比べ細胞生物学および分子生物学的に、より生体組織に近い性質を示す (Biochem Biophys Res Commun, 349, 723, 2006)。厚い立体組織を作製することで、より多くの細胞を移植できるだけでなく、より生体に近い機能を有する組織を移植できる。これらが立体組織のより高い治療効果につながっていると考えられている。一方、細胞シートを積層化することで立体組織を作製する過程にかかる時間は数時間であるが、細胞を温度応答性培養皿に播種してから細胞シートを回収するまでに通常数日を要する (Methods Mol Biol, 1181, 139, 2014)。また血管網のない厚さ80 μm以上の立体組織内において壊死が認められ、それ以上の厚い組織の構築を妨げている (RSC Advances, 2, 2184, 2012)。それが組織工学の大きな課題となっている。これらの壊死は組織内部の低酸素・低栄養・有害代謝産物の蓄積が原因であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)温調機能を持つ遠心機を用い、立体組織の作製時間を大幅に短縮すること、(2)機能的に結合した生体組織に近い性質・機能を持つバイオ立体組織を作製すること、(3)藻類との共培養で組織に酸素を供給し、また組織が排出する有害代謝産物を除去することで従来の培養法では成し得ない厚みを持つ立体組織を作製することである。

3. 研究の方法

培養皿上にシリコンで作製したリング状のデバイスを設置し、回収した細胞を播種する。そして培養皿を温調機能付きプレート遠心機にセットし、遠心を行う。その後、CO₂インキュベーターで培養することで組織内の細胞間接着を促進する。そしてピンセットでシリコンリングをピックアップし、立体組織を露出する。作製組織を移植に使用する場合は温度応答性培養皿を用い、低温処理後、組織移植デバイスを用いラット皮下組織に移植した。またin vitroでの組織解析を行う場合は通常のポリスチレン培養皿を用いた。またヒトiPS細胞(RBRC-HPS0001、理化学研究所より入手)由来分化心筋細胞の活動電位を解析する実験では、遠心により微小電極が64個パターンニングされたプローブ上で立体組織を作製し、MEDシステム(アルファメッドサイエンティフィック)で電気生理学的解析を行った。立体組織を作製するために用いる細胞はヒトiPS細胞由来心筋細胞およびC2C12マウス筋芽細胞を用いた。また厚い立体組織内の培養環境を改善するために緑藻の一種*Chlorella vulgaris*株を用い、共培養を行った。立体組織の組織厚はOptical coherence tomography (OCT)を用い測定した。(本研究の動物実験に関して、東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認手続きを行い、承認を受けた後に実験を実施した。)

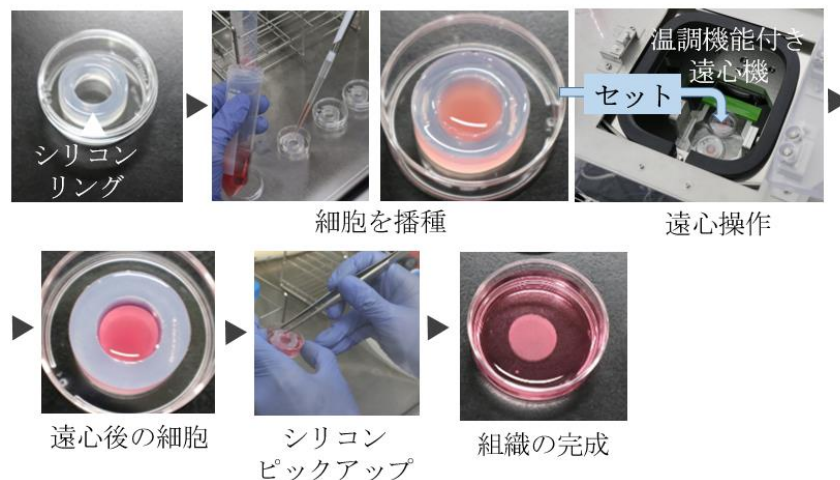


図1. 温調機能付き遠心機を用いた迅速な立体組織形成

性培養皿を用い、低温処理後、組織移植デバイスを用いラット皮下組織に移植した。またin vitroでの組織解析を行う場合は通常のポリスチレン培養皿を用いた。またヒトiPS細胞(RBRC-HPS0001、理化学研究所より入手)由来分化心筋細胞の活動電位を解析する実験では、遠心により微小電極が64個パターンニングされたプローブ上で立体組織を作製し、MEDシステム(アルファメッドサイエンティフィック)で電気生理学的解析を行った。立体組織を作製するために用いる細胞はヒトiPS細胞由来心筋細胞およびC2C12マウス筋芽細胞を用いた。また厚い立体組織内の培養環境を改善するために緑藻の一種*Chlorella vulgaris*株を用い、共培養を行った。立体組織の組織厚はOptical coherence tomography (OCT)を用い測定した。(本研究の動物実験に関して、東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認手続きを行い、承認を受けた後に実験を実施した。)

4. 研究成果

C2C12マウス骨格筋芽細胞株を用いた場合、バラバラの細胞を温度応答性培養皿上に播種し、37°Cで加温下遠心処理(80 x g)を30分行い、その後20°Cで1時間の低温処理により、立体組織を作製・回収できることが分かった。その立体組織は細胞シート移植デバイスで移動すること

が可能な強度を持った組織であった。すなわち温調機能付きプレート遠心機を用いることで細胞間接着が強固な細胞 C2C12 細胞は、細胞を播種後 90 分ほどで移植可能な組織を作製可能であることが分かった。またヒト iPS 細胞由来心筋細胞は、30 分の遠心操作後 37°C で 3 時間培養することで、心筋組織は電氣的に結合することが分かった (図 2)。さらに作製したヒト iPS 細胞由来心筋組織をラット皮下組織に移植可能であること、生着した組織厚は 200 μm を超えており、またその組織の拍動も確認できた。プレートにかかる遠心力を最適に制御することで、遠心力を強めても

(220 x g)、組織の変形や不均一な厚さの組織形成等の悪影響を起こすことなく立体組織を作製できることが分かった。また作製した立体組織は播種する細胞数を変えることで組織厚を制御することも分かった (図 3)。細胞障害の指標の一つである細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出量や細胞の生化学代謝 (グルコース消費、乳酸産生) を解析したところ、今回確立した遠心処理条件では細胞障害を起こしていないことが分かった。今回新たに確立した遠心法を用いることで移植可能な立体組織の作製時間をさらに三分の一に短縮することができた。すなわち遠心プレートにかかる遠心力を最適に制御することで組織に悪影響なく移植可能な立体組織の作製時間を最短 30 分に大幅に短縮することが出来た。一方で遠心力を用いることで播種する細胞数に応じて厚い立体組織を迅速に作製できるが、血管網のない 80 μm 以上の厚さを有する組織は酸素・栄養素不足あるいはアンモニア等の代謝産物の蓄積で組織障害を起こす。そこで分厚い立体組織内の細胞障害を抑えるため、酸素を産生するとともに有害代謝産物のアンモニアを吸収しアミノ酸を合成することができる微細藻類と共培養することで分厚い立体組織を維持培養できるか調べた。緑藻の一種

Chlorella vulgaris 株と共培養することで、共培養する藻類数に応じて立体組織内のエネルギー代謝が嫌氣的代謝から好氣的代謝へと変化し、効率的に栄養素を利用できるようになった。また共培養する藻類数に応じて立体組織

から排出されるアンモニア量の減少も認められた。そして哺乳動物細胞のみで作製した立体組織と比べ、共培養組織では、藻類数に応じて顕著に組織障害性が低下した (図 4)。微細藻類と共培養することで、細胞障害を抑えながら、400 μm の厚みを持つ立体組織を維持培養することが可能であることを示した。また組織の配向性付与に関しては遠心プレートに不均一にかかる遠心力を利用することで組織を目的方向に伸長させることに成功した。今後この方法を用い、立体組織の配向性付与につなげていきたいと考えている。これらの研究成果は組織再生治療において患者 QOL の向上および新たな機能を有する組織作製に貢献するものと考えている。

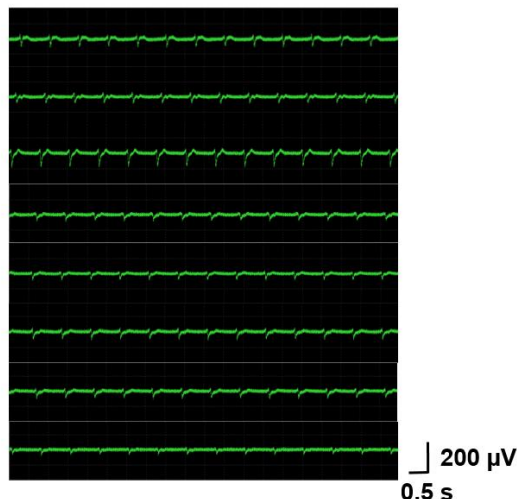


図 2. 作製立体組織 (遠心30分、培養3時間) の細胞外電位測定

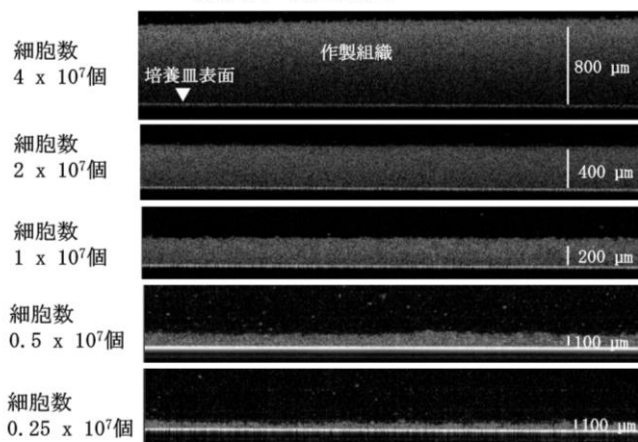


図 3. 作製した立体組織のOCT観察

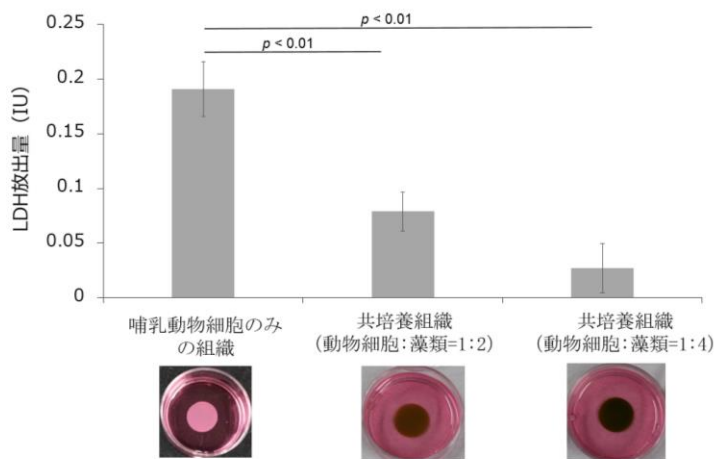


図 4. 共培養する藻類数に応じた組織障害性の低下

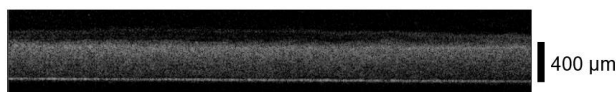


図 5. 作製共培養組織のOCT像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Haraguchi Y, Kagawa Y, Kubo H, Shimizu T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Analysis of force vector field during centrifugation for optimizing cell sheet adhesion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Progress	6. 最初と最後の頁 e2857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/btpr.2857	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Haraguchi Y, Shimizu T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-dimensional tissue fabrication system by co-culture of microalgae and animal cells for production of thicker and healthy cultured food	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology letters	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） 10.1007/s10529-021-03106-0	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加川友己、原口裕次、久保寛嗣、清水達也、小林直樹
2. 発表標題 温度調節付き遠心装置を用いた迅速な組織構築
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Kagawa, Yuji Haraguchi, Hirotsugu Kubo, Tatsuya Shimizu, Naoki Kobayashi
2. 発表標題 Development of a heating plate-centrifuge and its application in tissue engineering
3. 学会等名 TERMIS World Congress 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------