

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19911

研究課題名(和文)三次元リンパ管ネットワークの構築と蠕動収縮刺激による機能制御

研究課題名(英文) Assembly of Three-dimensional cell structure and functional control by mechanical stimulation

研究代表者

益田 泰輔 (Masuda, Taisuke)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授

研究者番号：30431513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究が解決すべき課題は、脈管系の重要な構成要素である大小のリンパ管を生体外で構築し、蠕動・収縮といった複雑で動的な細胞周囲の微小環境を忠実に再現した場の構築である。複数本のマイクロファイバーを集束し、線維構造体を亢進させる三次元組織構造体を提案し、ファイバーコンポーネントが一方方向への配向する三次元組織構造体の構築に成功した。また、顕微鏡下CO2インキュベータ内に設置できる伸展・電気刺激印加培養を新たに構築し、セルマイクロファイバーの力学特性を評価した。その結果、ファイバーの最大収縮率は9.1%、約9.1 mm収縮(3 Hz, 2 V印加の場合)を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外部からの物理的刺激(メカニカルストレス)は細胞レベルでは分化方向や代謝を変化させ、組織レベルでは機能維持に影響を与えることが知られている。本研究は、生体外で構築した三次元組織構造体に対して、伸展・収縮、せん断刺激などを与えたときの挙動を評価することにより、対象三次元組織体の病態や生理学的意義づけを見出すものである。その一歩として、従来の細胞任せ(自己配列)の線維構造体の構築法ではなく、予め形成した複数本のマイクロファイバーを集束しすることによる生体内の線維構造体を再現する構築法を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study proposes a three-dimensional assembly method of aligned fiber-structure such as a human skeletal muscle tissue. The innovative point is assembly method of fiber-structure consists of artificial modular micro-fibers. The magnetite particles are included inside of both ends of micro-fibers for "Assembly", "Positioning" and "Fixation" of micro-fibers, while the capillary force is also used to bundle several fibers tightly. Several different kinds of fibers are fabricated and assembled to form the tissue like structure. In this study, the muscle fiber and sensor fiber, are used for demonstration of the proof of our concept. After the assembly, the micro-fibers were successfully fused to form a tissue like structure with highly arranged cells

研究分野：生体医工学

キーワード：メカノバイオロジー バイオプリンター 刺激印加培養システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究が解決すべき課題は、脈管系の重要な構成要素である大小のリンパ管を生体外で構築し、蠕動・収縮といった複雑で動的な細胞周囲の微小環境を忠実に再現することで、培養細胞に本来の組織・器官特異的性質を発揮させ、リンパ浮腫等の根本的治療を目指した人工リンパ管組織の構築である。従来から、動脈には壁周張力の変化によって血管平滑筋へ伸展刺激が、血管内腔に面する内皮細胞へは血液の流れによるせん断力等の物理的的刺激が加わり、恒常性を維持しているのは周知の事実である。しかしながら、同じ脈管系であるリンパ管に対する物理的的刺激に関しては、これまで系統的に調査されてこなかった。集合リンパ管には血管同様に平滑筋が存在し、心臓と同様の自発的な収縮機構が存在することから、リンパ管に対する力学刺激は無視できるほど小さなものでなく、生体内では静脈と同等か、それよりも高い力(例:せん断力 0.5~2.0 dyn/cm)に暴露されていることが判っている。本研究では、研究代表者がこれまで行ってきた細胞集積技術と、外部循環システム融合技術とを応用し、動的な特徴が裏付けされた良好なリンパ管組織のネットワーク構造の生体外で構築することを目指す。

2. 研究の目的

がんに対する積極的治療により生命予後は改善されたが、外科的治療(リンパ節郭清)や放射線治療の合併症として引き起こすリンパ浮腫が問題になっている。リンパ浮腫はその容姿からも患者のQOLを大きく低下させる難治性疾患であり、重要な課題である。しかし、現在のガイドラインでは、弾性ストッキング着用やリンパマッサージなどの理学療法が中心であるため効果も限定的であり、十分な治療法が確立されていない。近年、顕微鏡下の吻合技術が向上し、リンパ浮腫に対しても、リンパ管静脈吻合や血管柄付きリンパ管移植術などの外科的手術が期待されている。本研究は、リンパ浮腫等の根本的治療を実現するために、正常な機能を有するリンパ管組織を生体外で構築するための基盤技術の確立を目的とする。

3. 研究の方法

1) 三次元組織構造体の構築

三次元組織構造体を構築するにあたり、血管・リンパ管のような線維構造体(ファイバーコンポーネント)を配列する造形方法がないことに直面した。線維構造体のアセンブリ方法として、従来の細胞任せ(自己配列)の線維構造体形成ではなく、予め形成した複数本のセルマイクロファイバーを集束し、線維構造体を亢進させる三次元組織構造体の構築を提案した(図1)。セルマイクロファイバー両端に磁性粒子を含ませることによって、磁力と液体架橋力を利用してアセンブリを行う。アセンブリプロセスは大きく分けて以下の二つの工程からなる。

- i) 磁石と金属針を使用し、マイクロファイバーを磁力と液体架橋力を利用して束ねる。
- ii) さらに金属針とファイバーとを固定するために生体適合性の接着剤で固定する。

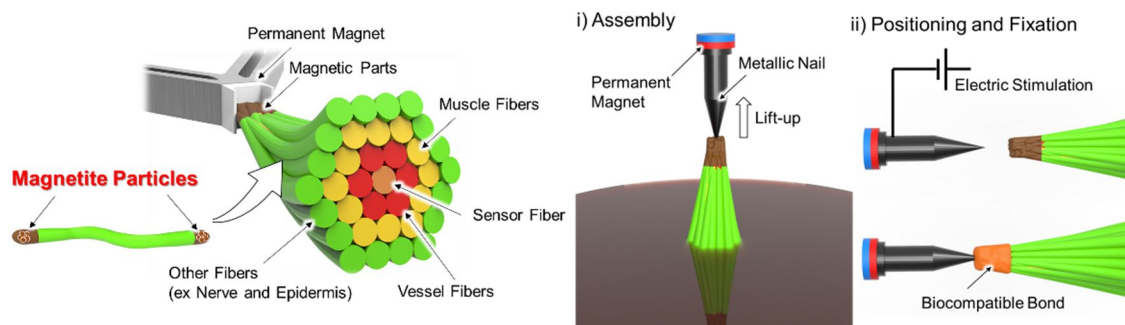


Fig. 1 Concept of micro-fibers assembled by the magnetic force and capillary force. Features of magnetite ends of tissue fibers, which are i) assembly, ii) positioning and fixation. Capillary force is applied to the micro-fibers by lift up the permanent magnet, tightly bundle the muscle tissue for better fusion between fibers.

セルマイクロファイバーの作製手順は以下の6工程からなる。

ICR マウス大臀筋から回収した筋芽細胞を細胞外基質ゲル(Matrigel)に混入し、磁性端(図2 a)、中心部分(図2 b)の順番で溝型にプリンティングする。磁性端には、粒径 2.8 μm (Dynabeads M-270 Epoxy) の磁性粒子を混入した。溝型にすべての基質ゲルがプリンティングされた後、架橋する(37°C, 15分)。

1日間の増殖培養後、マイクロファイバーは2つの永久磁石の間に晒され(図2 c)、磁場印加によるファイバーの伸展を誘引の元、筋管を形成する。

溝型から回収したセルマイクロファイバー(図2 d)は、先端を磁場集中させた治具を使用してセルマイクロファイバーを引き寄せ(図2 e)、それらを培地の水面から持ち上げて液体架橋力によってファイバー同士を集束する(図2 f)。

集束したファイバーを別の PDMS 製の溝型に配置して 2 日間培養し、ファイバー同士を融合する。この際、セルマイクロファイバーの固定補助として、生体適合性接着剤 (DERMABOND) を用いた。(図 2 g)

その後、移動用治具を用いて融合したセルマイクロファイバーを力学(伸展・煽動収縮)刺激印加培養システムに移動させる。(図 2 h)

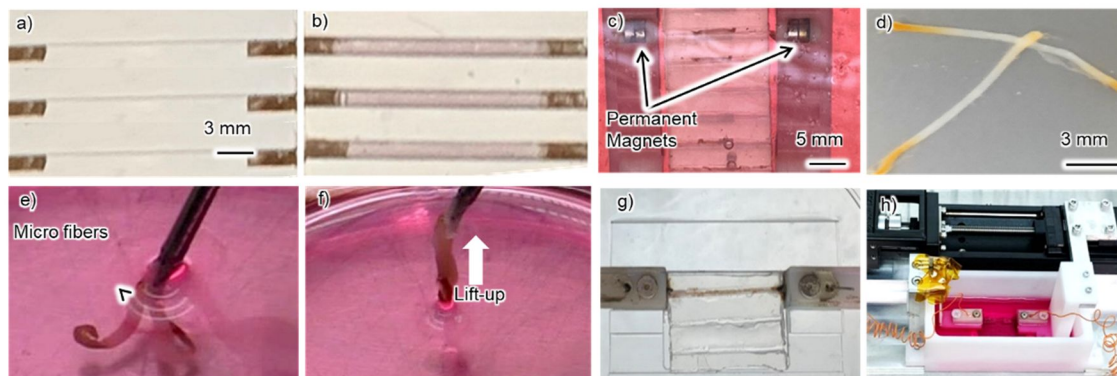


Fig. 2 Fabrication and assembly of cell micro-fibers

2) 力学(伸展・煽動収縮)刺激印加培養システムの構築

作製した伸展・電気刺激印加培養デバイスの概要図を図 3 に示す。伸展ひずみはステッピングモータを介して、次の印加条件を与えることが可能である(振幅: 1 mm (10%ひずみ), 周期: 1 Hz)。成人男性の腕の筋線維のヤング率は 90~150 kPa である。ゆえに、作製した三次元細胞組織体が分化・成熟を経た場合、線維が引張に対して発生する反発力は 9~15 mN と推定される。そのことから、本実験を遂行するあたり感度、計測レンジが適した力センサの設計を行った。当該培養デバイスは、顕微鏡搭載 CO₂ インキュベータ内に設置できるように、温度および湿度対策を行っている。力計測は、骨格筋ファイバーが固定された板バネに貼付したひずみゲージによって計測された。

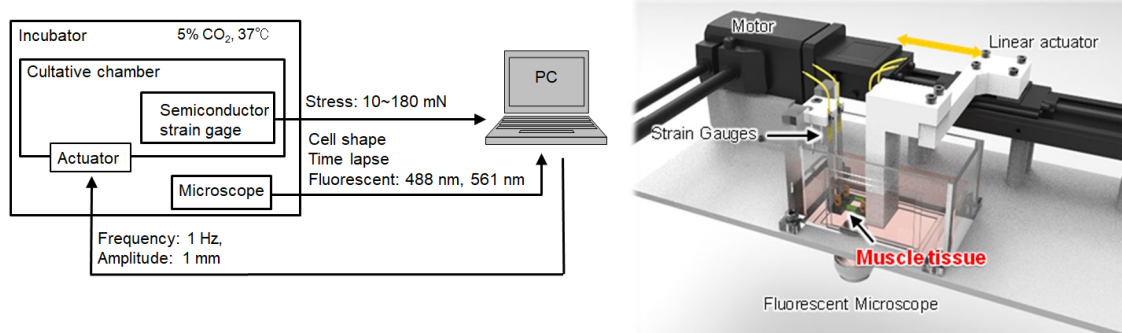


Fig. 3 (Right) Constitution of monitoring culture system for dynamic mechano-information. (Left) Monitoring and Stimulation System for cell micro-fiber.

4. 研究成果

1) 三次元組織構造体

磁性端に導入した磁性粒子による細胞への影響を評価するために、作製した骨格筋ファイバーの Alive/Dead 染色を行った。毒性評価には、作製 2 日後のマイクロファイバーを用いた。図 4 上に Alive/Dead 染色の結果を示す。磁性粒子が導入された磁性端とファイバー本体(中心部分)は、シームレスに接続していることが伺えた。また、ファイバー全体の細胞生存率は 99% を示し、磁性粒子による細胞毒性は観察されなかった。

また、図 4 下に作製したセルマイクロファイバーの細胞蛍光画像を示す。セルマイクロファイバー内に細胞核および細胞骨格(アクチン)は、それぞれ DAPI (Ex 360 nm / Em 460 nm), Alexa Fluor 488 (Ex 488 nm / Em 520 nm) にて染色された。蛍光画像から、筋芽細胞同士が融合し、筋管を形成し、筋細胞へ分化していることが観察された。

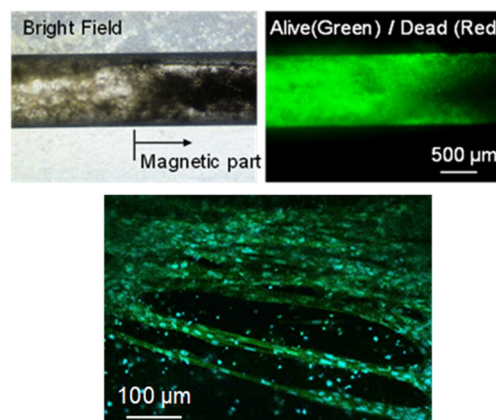


Fig. 4 (Upper) Dead alive test around the boundary of magnetite end. (Lower) Fluorescent image of assembled fibers. Blue: Nuclei; Green: Actin

2) 力学 (伸展・煽動収縮) 刺激印加培養システム

作製したセルマイクロファイバーは、昨年作製した伸展・電気刺激印加培養デバイスを用いて、伸展刺激および電気刺激を印加する。作製した骨格筋ファイバーに $10 \mu\text{m/s}$ の一定速度で 10% 伸展ひずみを与えたときの変位量と伸展力の関係を示したグラフを図 5 上に示す。その結果、培養 5 日目のセルマイクロファイバーのヤング率は約 6.0 kPa であることが明らかになった。一方、電気刺激印加時のセルマイクロファイバーの収縮率の一例を図 5 下 (1 Hz , 2 V 印加) に示す。顕微画像上の特異点の変化量として算出した結果、ファイバーの収縮応答は印加刺激に対して周波数遅れや振幅のバラツキが見られるものの、最大収縮率は 9.1% 、約 9.1 mm 収縮 (3 Hz , 2 V 印加の場合) を確認した。

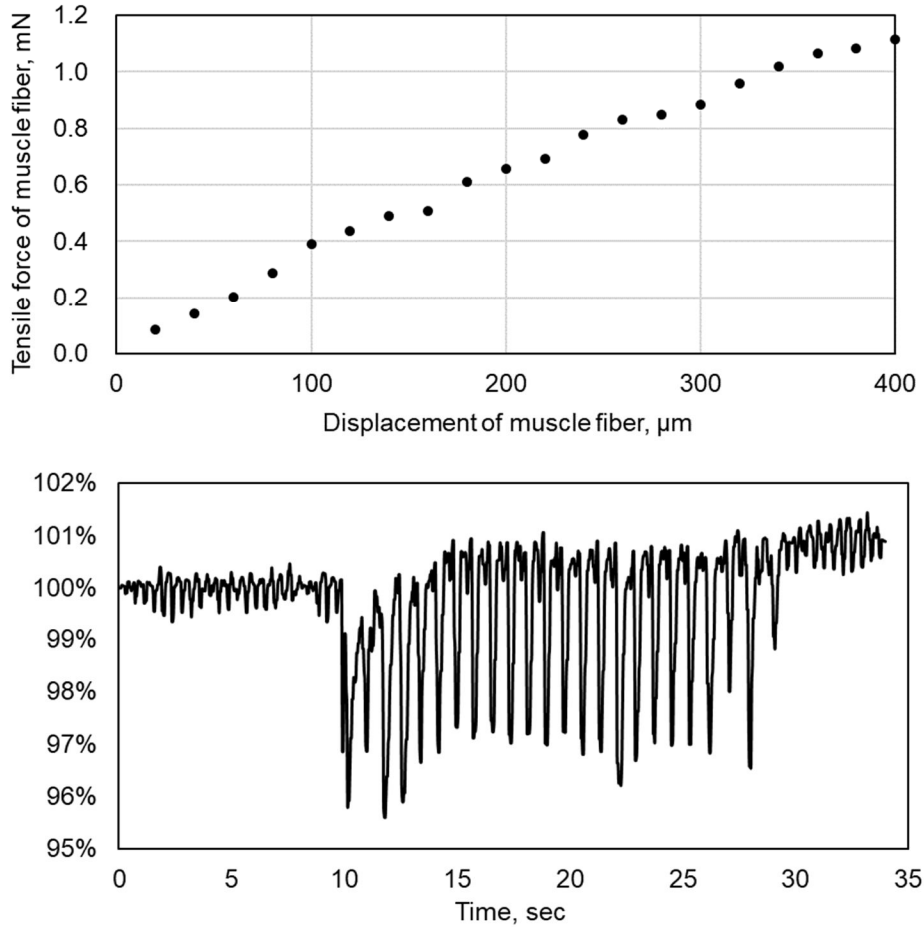


Fig. 5 (Upper) Diagram of force-displacement of single muscle fiber. In this case, Young's modulus of muscle fiber was 6.0 kPa . (Lower) Analysis of contraction Response in 1 Hz Frequency, 2 V amplitude.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Zhaoyu Wang, Taisuke Masuda, Ruixuan Weng, Hisataka Maruyama and Fumihito Arai
2. 発表標題 Assembly and Monitoring of Modular Tissue Structure of Micro-Fibers
3. 学会等名 30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhaoyu Wang, Taisuke Masuda, Katsuki Miki, Hisataka Maruyama and Fumihito Arai
2. 発表標題 Assembly of Modular Tissue Structure of Micro-Fibers using Magnetic Force and Capillary Force
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益田泰輔, 河野明, 安藤大知, 秋田祐甫, 横田悠樹, Ruixuan Weng, Zhaoyu Wang, 丸山央峰, 新井史人
2. 発表標題 オルガノマシンの内部状態計測
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学新井研究室
<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/>

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