

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：33401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12793

研究課題名（和文）組織-組織間相互作用の発現機構を解明するためのヒトインビトロ生体システムの構築

研究課題名（英文）Construction of Human in vitro Systems for Investigating Tissue-Tissue Interactions

研究代表者

古澤 和也（Furusawa, Kazuya）

福井工業大学・環境情報学部・教授

研究者番号：00510017

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）：この研究では細胞とゼリー状の素材と一緒に培養して、肝臓や腸のミニチュアを作製し、それぞれを接着することでヒトの体内環境を培養容器中に再現する方法を開発しました。肝臓と腸のミニチュアを同じ培養容器内で接着させて培養すると、腸のミニチュアで代謝に関わる酵素（CYP3A4）が単純な培養皿での培養よりも強く作られることがわかりました。また、ゼリー状素材の形を変えて肝臓のミニチュア組織を作ると、そのかたちによって尿素代謝や血中成分の合成などの肝臓の機能を制御できることがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、栄養成分や薬品など体に影響を及ぼす物質の性質をより生体内に近い環境で調べる実験方法の確立につながります。

研究成果の概要（英文）：We have developed methods for reproducing tissue-tissue interactions by connecting the engineered liver and intestine tissues which are constructed by using hydrogels. By co-culturing the engineered liver tissue and the engineered intestine tissue, an expression level of CYP3A4 was enhanced. In addition, the engineered liver tissues constructed by using collagen hydrogels with multi-channel structures showed higher levels of albumin synthesis and urea metabolism than those for the engineered liver tissue constructed by using a conventional 3D culture method. The results suggest that the metabolic functions of engineered liver tissues can be controlled by regulating the hierarchical structure of scaffold materials.

研究分野：組織工学 高分子化学 生体材料学 レオロジー

キーワード：再生組織 モデル実験系 コラーゲン 肝機能 尿素代謝 腸上皮 組織工学 生体材料

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

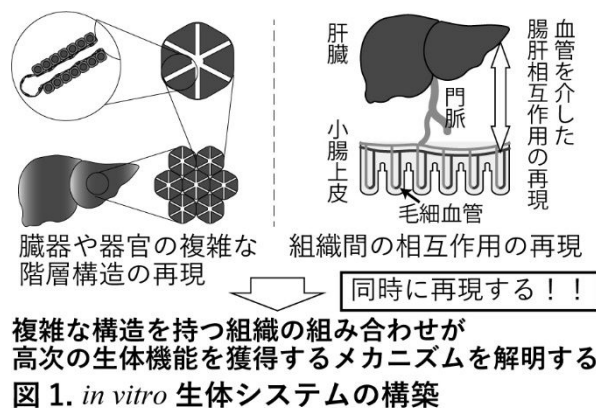
生体内での臓器間の栄養成分の移動は、主に血液を通して行われる。多くの栄養成分は小腸で吸収されて血管に移動し、門脈を通して肝臓に運ばれる。肝臓で代謝された産物は筋肉や脂肪組織などの種々の臓器に移されて、それぞれの臓器で利用される。一方で、各臓器の代謝や栄養成分の吸収、そして液性因子の分泌は血中ホルモンや神経系を介した相互作用でも調節されている。このような臓器間の相互作用の調査では、未だ実験動物を使用した実験が主な手法となっている。そのため、資金・施設ともに大規模な研究体制が必要であり、さらに、動物愛護の観点から実験動物の利用の削減が求められていることなど、多くの問題を抱えている。また、動物実験で得られた結論をそのままヒトでは使えない点も大きな課題である。

一方で、ヒトを対象とした実験には技術的にも倫理的にも大きな制限がある。ヒトを対象とした生命現象を研究するための究極の方法は、ヒトの生体内環境を培養容器中に再現することである。その有力な手段の一つとして、注目を集めている技術が、Organ-on-a-chip 技術である。しかしこの方法では、異種細胞間の相互作用を解析することができても、各臓器の複雑な階層構造や、血管や神経を介した相互作用を同時に再現することはできない。また、小さなチップ上では、培養できる細胞の数に制限があり、そのために培養液中に分泌される液性因子や代謝産物の濃度が想定よりも薄くなるなどの課題も抱えている。

では、十分な細胞密度と、複雑な臓器の階層構造、およびこれらの臓器間の相互作用を同時に培養容器中に再現した時、それは生体内で起こる様々な高次機能を獲得し、ヒトを再現したモデル実験系としての役割を果たすのか?これが、本研究課題の核心をなす「問い」である。

## 2. 研究の目的

本研究では、複雑な臓器の階層構造と臓器間の相互作用を同時に再現した複合組織を構築する技術の開発に取り組む(図1)。そして、この複合組織が血管や神経を介して腸-肝相互作用を再現した高次の生体機能を発現するインビトロ生体システムとして機能するかどうかを評価し、栄養化学研究に利用可能なインビトロ生体システムを構築する。さらに、複合組織の培養液中の代謝産物の分析により生命現象の解析への応用を目指すことが本研究の目的である。



## 3. 研究の方法

### 3-1: インビトロ生体システムを構成する再生組織の構築

直径 8 mm の穴が開いた厚さ 1 mm のシリコンゴムを 60 mm の培養皿の底面に密着させた。100  $\mu$ L のコラーゲン水溶液(5.0 mg/mL in 1mM HCl (pH 3.0), IPC-50 KOKEN co.ltd.)をシリコンゴムの孔に充てんし、この上に 20 mm $\times$ 20 mm に切った透析膜をかぶせた。8 mL のリン酸緩衝液(PBg, 20 mM Na<sub>2</sub>PH<sub>4</sub>, 13 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0)を培養皿に流し込むことで、コラーゲン水溶液をリン酸緩衝液中に透析した。以上より、培養皿の表面に直径 8 mm、厚さ 1 mm の多管構造を持つコラーゲングル(MCCG)を調製した。透析膜を伸長に剥がしたあとで、MCCG 表面を覆うように 200  $\mu$ L の I 型コラゲナーゼ水溶液(1 mg/mL)を滴下し、37°C で 20 分インキュベートした。この操作により、MCCG 表面のゲルの膜を消化除去し、多管構造内腔を露出させた。5 mM EDTA を含む PBS(-) で 4 回洗浄した後で、5 mM のゲニピンを含む PBS(-) を入れて 24 時間 37°C でインキュベートすることで MCCG を化学架橋した。化学架橋後の MCCG を PBS(-) で 4 回洗浄することで余分なゲニピンを除去した。Caco2 を上記 MCCG の表面に播種し、一定期間培養することで再生腸上皮組織を構築した。

HepG2 を 280 mM のグルコースを含むコラーゲン水溶液(4.5 mg/mL in 1 mM HCl, pH 3.0)に懸濁して細胞懸濁液を調製した。この時、HepG2 の細胞密度を  $2.0 \times 10^6$  cells/mL と

4.0×10<sup>6</sup> cells/mL とした。この細胞懸濁液 100 μL をボイデンチャンバー(Falcon 半透明高密度 PET メンブレンインサート 353495)の内側に流し込み、1 mL の PBg もしくは 1 mL の増殖培地 (DMEM, 10% FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 μg/mL Streptomycin) が入った 24 ウェル培養プレートのウェルにセットして細胞懸濁液を MCCG 化させることで再生肝組織を構築した。Pbg が入ったウェルにセットすると、多管構造を持つコラーゲンゲル中に HepG2 が包埋された三次元再生肝組織が得られ、増殖培地が入ったウェルにセットすると、均一なコラーゲンゲルに HepG2 が包埋された三次元再生肝組織が得られる (ACS Biomater. Sci. Eng., 2017, 3(12), 3414–3424)。

### 3 - 2 : インビトロ生体システムの構築

3 - 1 で構築した再生肝組織の表面にヒト臍帯由来静脈内皮細胞 (HUVEC) を懸濁したマトリゲルを 10 μL 滴下し、直ちに再生腸上皮組織をその上に載せた。37°C で 30 分間インキュベートしてマトリゲルをゲル化させ、再生腸上皮組織と再生肝組織からなるインビトロ生体システムを構築した。

### 3 - 3 : 組織形態観察

3 - 2 で構築したインビトロ生体システムの組織形態観察するため、2% パラホルムアルデヒド液で固定した (4°C, Over night)。固定後の試料を洗浄後、50%、70%、90%、および 100% のエタノールで脱水し、キシレンに溶媒置換した。溶媒置換後の試料を 50% パラフィン溶液 (キシレンが溶媒) に浸漬し、50°C で 3 日間インキュベートしキシレンを完全に揮発させた。それぞれの試料をパラフィンに包埋後、回転式マイクロトーム (RX860, 大和光機) で 10 mm 厚の組織切片とし、スライドガラス状に回収した。脱パラフィン後の切片を 90°C の pH6.0 のクエン酸緩衝液 (10 mM) で 20 分間加熱処理した (抗原賦活化処理)。4% ウシ血清アルブミンと 0.3% triton X-100 を含む溶液を抗原賦活化後の試料に滴下し、30 分間 37°C でインキュベートした。試料を洗浄した後で、MUC および CYP3A4 の一次抗体溶液 (それぞれブロッッキング溶液で 1/200 希釈した) で、一次抗体処理を行った (37°C, 30 分間)。また、別の組織切片について抗 E-カドヘリンの一次抗体溶液で同様に処理した。次に、Alexa488 および Alexa555 で標識された抗 IgG 抗体 (1/1000) を使用して、試料の二次抗体処理を行った (37°C, 30 分間)。二次抗体処理後の切片を PBS(-) で洗浄し、Nucblue と褪色防止剤入りの封入剤で試料を封入した。得られた組織切片について、蛍光顕微鏡観察を行った。

### 3 - 4 : 再生腸上皮組織の経上皮抵抗測定

3 - 1 の方法で構築した再生腸上皮組織を 4 週間培養し、培養後の試料の経上皮抵抗をミリセル抵抗値測定システム (Millicell ERS-2) で測定した。

### 3 - 5 : 再生肝組織の代謝機能に及ぼすコラーゲンゲルの構造の影響

3 - 1 の方法で構築した再生肝組織の培養上清を回収し、1 日のアミノ酸濃度の変化と、1 日に分泌されるアルブミンの濃度を定量的に分析した。アミノ酸濃度の変化は培養 7 日目、培養 15 日目、および培養 42 日目の培養上清で測定した。アミノ酸濃度の定量分析は、分担研究者 (大能俊久) の協力の下、全自動アミノ酸分析機 (JEOL, JLC-500) を使用して実施した。一方で、アルブミン濃度の定量は培養 43 日目の培養上清を使用した。アルブミンの濃度は定量キット (Human Albumin AssayMax ELISA Kit, EA2202-1, Assaypro) を使用して実施した。

## 4 . 研究成果

本研究では、MCCG を用いて、腸陰窩構造を持つ再生腸上皮組織を構築する技術、再生腸上皮組織と再生肝組織からなるインビトロ生体システムを開発した。

### 成果 1 : 腸陰窩構造を再現した再生腸上皮組織の構築技術を確立した

円盤状の MCCG の多管構造表面に直接ヒト大腸がん由来上皮細胞 (Caco-2) を播種して再生腸上皮組織を構築した。構築した再生腸上皮組織の組織形態観察より、Caco-2 が MCCG の多管構造の壁に沿って管腔様の構造を作り、さらに管腔様構造が MCCG の多管構造の底まで連続していることから、大腸上皮と同様の腸陰窩構造を形成していることが明らかとなった。以上より、大腸上皮の形態を高度に再現する方法を確立することができた。構築した再生腸上皮組織の経上皮電気抵抗 (TEER) の測定の結果、62 ohm/cm<sup>2</sup> の TEER を測定することができた。測定値としては単層の Caco2 の文献値よりも低い値となったが、インビトロ生体システムの機能評価の指標の一つとして TEER が利用できることを示す成果の一つとなった。

### 成果 2 : 複雑な組織形態を持つ再生組織からなるインビトロ生体システムの構築技術を確立した

上記再生腸上皮組織と既に確立してあった再生肝組織をマトリゲルで接着させて、インビトロ生体システムを構築した。また、同時に二種の組織を培養維持するための培養

条件を決定することもできた。インビトロ生体システムの、MUCとCYP3A4の免疫蛍光染色を行った結果、MUCは再生腸上皮組織で特異的に発現していたが、CYP3A4は再生腸上皮組織と再生肝組織の両方で発現が見られた(図2)。HepG2ではCYP3A4の発現が強く、Caco2ではCYP3A4の発現強度が弱いこと過去の研究で知られているため、免疫蛍光染色で二つの組織を染め分けることができると期待していたが、結果はそうならなかった。再生腸上皮組織中のCaco2のCYP3A4の発現強度が再生肝組織中のHepG2と同程度発現した理由として、二つの組織の共培養がCaco2のCYP3A4の発現を上方制御したことが考えられる。より詳細な研究が必要であるが、二つの組織の共培養による組織間の相互作用を示唆する一つの結果を得ることができたと言える。また、再生肝組織と再生腸上皮組織との間のマトリゲル層には、HUVECが作ったとみられる管腔構造が形成されていることも分かった。

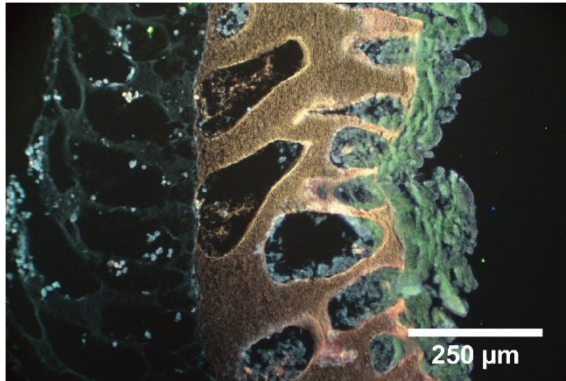


図2. インビトロ生体システムの免疫蛍光染色像。写真左が再生肝組織で、右が再生腸上皮組織となっている。シアン、グリーン、およびオレンジの蛍光色はそれぞれCYP3A4、MUC、およびゲニピン化コラーゲンを示している。ゲニピン化コラーゲンはゲニピンとコラーゲンが化学反応することで生じる強い自家蛍光を利用して観察した。再生肝組織のコラーゲンは、ゲニピン化していないため自家蛍光はほとんど見られない。

### 成果3：再生肝組織の代謝機能に及ぼす細胞足場素材の構造の影響を明らかにした。

異なる構造のコラーゲンゲル中でHepG2を三次元培養することで、組織形態の異なる再生肝組織を構築し、アンモニアやアミノ酸の代謝機能やアルブミンの生成能を定量分析した。MCCGを使用して構築した再生肝組織は、均一なコラーゲンゲルを使用した時よりも高いアルブミン生成能や尿素の生成能を示すことがわかった。また、尿素回路に関連するアルギニンの濃度にも有意な差があった。それぞれの再生肝組織の組織形態を比較したところ、MCCGを足場材料として利用した場合は、通常のコラーゲンゲルを使用した場合よりも組織中心部の細胞数が多いことが示唆された。1組織あたりに含まれる細胞の数がMCCGを使用したほうが多くなったため、アルブミンや尿素の生成量が多くなったり、その他のアミノ酸の濃度に差が見られたりしたのだと考えられる。

### 成果のまとめ

本研究では、複雑な階層構造を持つ再生肝組織と再生腸上皮組織とを組み合わせたインビトロ生体システムの試作品を構築することができた。このヒトインビトロ生体システムを構成するCaco2のCYP3A4の発現レベルが培養皿上よりも強く発現していることから、二つの組織の間の相互作用が現れたことが示唆された。一方で、再生肝組織のアルブミン生成能や尿素の生成能を、使用する足場材料の構造によって制御できることを示すことができた。この二つの成果を組み合わせることで、インビトロ生体システムを構成する再生組織の機能を変えたとき、他の再生組織にどのような影響が現れるのかを調べることができるようになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furusawa Kazuya, Teramae Ryo, Ohashi Hirono, Shimizu Masahiro, Department of Applied Chemistry and Food Science, Fukui University of Technology 3-6-1 Gakuen, Fukui, Fukui 910-8505, Japan, Department of System Innovation, Osaka University 1-2 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of Living “Bio-Robots” for Autonomous Actuations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Robotics and Mechatronics	6. 最初と最後の頁 279 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20965/jrm.2022.p0279	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 Utoh Rie, Enomoto Sakiko, Yamada Masumi, Yamanaka Keigo, Yajima Yuya, Furusawa Kazuya, Seki Minoru	4. 巻 129
2. 論文標題 Polyanion-induced, microfluidic engineering of fragmented collagen microfibers for reconstituting extracellular environments of 3D hepatocyte culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 112417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112417	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 Yonemoto Junta, Maki Yasuyuki, Koh Isabel, Furusawa Kazuya, Annaka Masahiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Formation of Multi-Channel Collagen Gels Investigated Using Particle Tracking Microrheology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 3819 ~ 3826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.1c00666	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 Ishida-Ishihara Sumire, Akiyama Masakazu, Furusawa Kazuya, Naguro Isao, Ryuno Hiroki, Sushida Takamichi, Ishihara Seiichiro, Haga Hisashi	4. 巻 133
2. 論文標題 Osmotic gradients induce stable dome morphogenesis on extracellular matrix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 243865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.243865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 古澤和也, 木村恒久, 西嶋茂宏	4. 巻 50
2. 論文標題 次世代畜産技術としての培養肉技術の基礎的研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 福井工業大学研究紀要	6. 最初と最後の頁 353-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kazuya Furusawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Mechanical Properties and Morphologies of Collagen Hydrogels on Tissue Hierarchical Structures of 3D Engineered Muscle Tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science	6. 最初と最後の頁 69-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 古澤和也 新谷耀也 大能俊久
2. 発表標題 コラーゲンゲルの構造が再生肝組織の機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 コラーゲン水溶液のゲル化と相分離の共役
3. 学会等名 第69回レオロジー討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古澤和也 木村恒久 西嶋茂宏
2. 発表標題 食肉の階層構造を再現した培養肉製造技術の開発
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 槇靖幸 米本純太 安中雅彦 古澤和也
2. 発表標題 粒子追跡法を用いた多管構造コラーゲンゲル形成のレオロジー
3. 学会等名 第44回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 多管構造を持つコラーゲンゲルを使ったヒト大脳オルガノイドの構築
3. 学会等名 第44回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 ロボットのようなニンゲン？それともニンゲンのようなロボット？
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2020 in Kanazawa, Robomech2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 コラーゲンゲルの力学特性と階層構造が再生筋組織の筋分化に与える影響
3. 学会等名 第68回レオロジー討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 多管構造を持つコラーゲンゲルを用いた再生腸上皮組織の構築
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 複雑な階層構造を持つ再生筋組織の構築
3. 学会等名 第29回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 マルチチャネルコラーゲンゲルを用いた三次元再生組織の構築
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 古澤和也
2. 発表標題 生体高分子水溶液の相挙動制御と組織工学への応用
3. 学会等名 ACS on Campus Fukui University of Technology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Furusawa
2. 発表標題 Effects of Mechanical Properties and Morphologies of Collagen Hydrogels on Tissue Hierarchical Structures of 3D Engineered Muscle Tissues
3. 学会等名 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	大能 俊久 (Ohno Toshihisa) (60390902)	福井工業大学・環境情報学部・准教授  (33401)	

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