

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12852

研究課題名(和文)細胞比率のコントロール可能な多細胞スフェロイド形成システムの開発研究

研究課題名(英文) Research and development of a multicellular spheroid formation system with controllable cell ratio

研究代表者

下戸 健 (Shimoto, Takeshi)

福岡工業大学・情報工学部・准教授

研究者番号：40412457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループでは、スフェロイド培養して作製された細胞凝集塊(スフェロイド)同士は融合するという特性を利用して、独自の技術で再生医療用細胞構造体の作製に成功している。線維芽細胞と内皮細胞をある比率で混合させた多細胞スフェロイドが、血管や心臓の細胞構造体の作製に適していることが証明されつつある。そこで本研究では、目的の細胞比率を有したスフェロイドを形成するシステムの開発を行うことを目的とした。研究の結果、開発したシステムを用いることで、任意の細胞比率に調整した多細胞スフェロイドを作製できるようになった。さらに、作業工程が異なることで、得られる多細胞スフェロイドも変化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作業者の専門的な知識や技術に依存せず、コンタミネーションが発生しないクリーン環境下で、目的の細胞比率を有した多細胞スフェロイドを作製できるようになった。さらに、作業工程が異なると、多細胞スフェロイドの時間経過に伴う変化や内部の細胞の状態が異なる事を見つけることができた。これらの情報は、培養工程の自動化における作業方法の検討等に役立つと考えられる。本研究成果は、再生医療用細胞構造体の高度化および多様化に応用できるだけでなく、研究サイクルを向上させ、力学的および機能的な観点からの多細胞スフェロイドの特性の解明にも繋がれると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research group has established a technology for producing a large three-dimensional cell constructed using only the cell. In the production of vascular and cardiac cell constructs, the use of the multicellular spheroids with mixture of fibroblasts and endothelial cells has been found to be effective. However, it is not easy for technicians to do this. Additionally, it is necessary to suppress variation factors that occur from human operation by using automation, improving data accuracy, and obtaining reproducible spheroids. Therefore, the aim of this study was to develop a multicellular spheroid formation system for the fabrication of cell structures for regenerative medicine. As a result of the research, it became possible to create multicellular spheroids with an arbitrary cell ratio using the developed system. Additionally, it was found that the multicellular spheroids obtained varied according to the different timing of dispensing.

研究分野：生体医工学

キーワード：医用ロボット 再生医学 スフェロイド 細胞構造体

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は、2013年に再生医療推進法が成立し、再生医療法や薬機法が公布されるなど、国策の重点項目として位置づけられている。医学的アプローチである iPS 細胞といった細胞ソースの開発の一方で、工学的アプローチによる細胞構造体の形成開発が活発化している。細胞構造体を作製する方法として、細胞シートを積層する技術、細胞を任意の位置に播種しながら積層化させるバイオプリンティング技術、細胞ファイバー技術および細胞折り紙技術、などがある。これらに対し本研究グループでは、スフェロイドを使うことが特徴である。スフェロイドとは、従来の平面的な細胞培養とは異なり、3次元に培養することで作製される細胞の塊である。スフェロイド同士は融合するという特性を利用して、独自の技術で再生医療用細胞構造体を作製することに成功している (Shimoto et al., *J. Robot. Mechatron.*, 2012)。近年、医学的アプローチにより、血管や心臓の構造体の作製には、線維芽細胞と内皮細胞をある細胞比率で混合させた多細胞スフェロイドが有効であることが証明されつつある。したがって、異なる種類の細胞を任意の比率で混合させることが求められているが、作業者が任意の細胞比率に調整するのは困難であり、最適な細胞比率を検討するための膨大な実験は、作業者に大きな負担が掛かる。

一方で、個々の技術に依存する多くの変動要因を最小限に抑えることが求められており、作業者による細胞培養の作業過程の自動化が行われている。自動化によって、迅速な操作、データ精度の向上および新規データの取得など、研究サイクルが向上する。本研究においても、『スフェロイド形成システム』(Shimoto et al., *J. Clinical Biomechanics*, 2018) や『スフェロイド形態評価システム』(Shimoto et al., *J. Robot. Mechatron.*, 2018) の開発を行い、作製プロトコルの自動化や形態評価を行ってきた。しかし、同じモーションで細胞を扱っても、細胞数によって得られる結果が異なることが明らかとなった。したがって、細胞の状態に応じたシステムのモーションの開発が求められている。以上のように、培養プロトコルの自動化や効率的な培養方法の確立が模索されている中、これまで研究開発してきた2つのシステムを応用することにより、任意の細胞比率を有した多細胞スフェロイドの作製が可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

ロボティクス技術を用いて、血管や心臓の3次元細胞構造体を作製するために必要となる、任意の細胞比率を有した多細胞スフェロイドを形成するシステムを開発することを目的とした。開発したシステムの有用性を確認するために、徒手に行う従来法と同様に多細胞スフェロイドを作製し、得られた多細胞スフェロイドについて、形態の経時的変化の定量評価および内部の細胞の様子を観察した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多細胞スフェロイド形成システムの開発

開発したシステムの概観図とソフトウェア画面を図1に示す。スカラーロボット (E2C, EPSON) 第4関節先端にチップ間距離 9mm の2x2チャンネルのチップ着脱可能ピペットを取り付け、滅菌済みのチップを装着して細胞を扱うようにした。細胞懸濁液の吸引・排出は、電動シリンダー (CPL28T2B-06KD, Orientalmotor) を用いた。作業者と多細胞スフェロイド形成システムの多細胞スフェロイド培養方法を図2に示す。多細胞スフェロイド形成システムは、作業効率を向上させるために、2x2チャンネルのピペットを使用した。多細胞スフェロイドの作製は、まずスフェロイドを作製するのに十分な細胞数を有する細胞懸濁液と細胞が入っていないメEDIUMとスフェロイド培養用のリザーバーを、2種類の細胞 (ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal

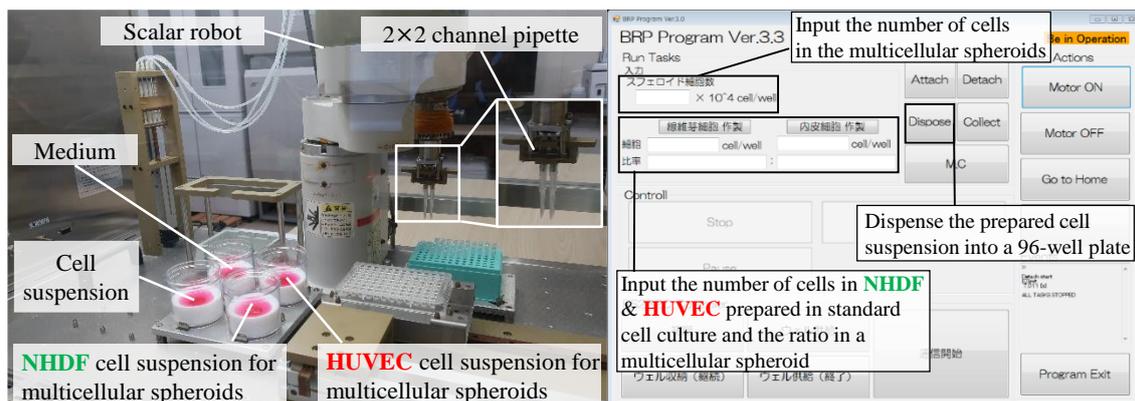


図1 多細胞スフェロイド形成システムの概観図とソフトウェア画面

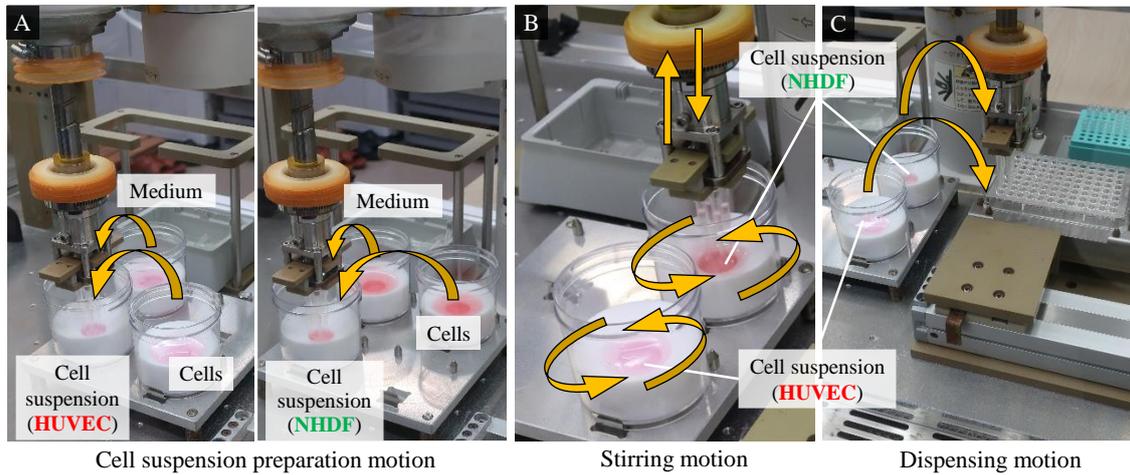


図2 多細胞スフェロイド形成システムのモーション

Fibroblasts, NHDF) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)) について用意した. 次に, ソフトウェア上で, 作製したい多細胞スフェロイドの細胞数, 用意した 2 種類それぞれの細胞の細胞数と多細胞スフェロイドにおける比率を入力することで, 2 種類の細胞懸濁液の調整が自動で行われる (図 2A). その後, 各細胞懸濁液が  $50\mu\text{l}$  ずつ 96 ウェルプレートに分注され (図 2C), 96 ウェルプレートの各ウェルに 1 つのスフェロイドが作製される. これにより, 任意の細胞比率を有する多細胞スフェロイドを作製することができる.

作業者は  $1 \times 8$  チャンネルのピペットを使用して, 比率が調整された 2 種類の細胞が入った細胞懸濁液を, 96 ウェルプレートに播種していく (図 3A). その際に, リザーバーで細胞懸濁液を入念にピペッティングし細胞分布を均一化してから, 96 ウェルプレートに分注する. これにより, 96 ウェルプレートの各ウェルに 1 つのスフェロイドが作製され, スフェロイドの大きさは播種する細胞数で調整することができる. 多細胞スフェロイド形成システムでは, 作業効率を向上させるために,  $2 \times 2$  チャンネルのピペットを作製し, それに合わせたリザーバーを作製した (図 3B). 作製したリザーバーは, 深部の円筒部分に向かってテーパ加工されている. 作業者が使うリザーバーも V 字になっており, これは細胞懸濁液を極力残らないようにするためである. 円筒部分の直径は  $20\text{mm}$  であり,  $2 \times 2$  チャンネルのピペットで攪拌できる大きさとしている.

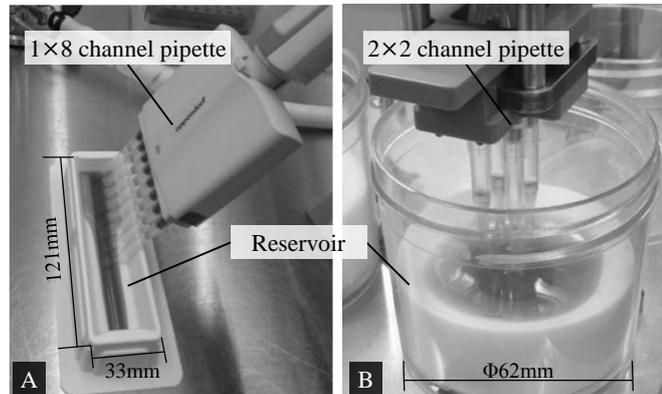


図3 (A)作業者と(B)多細胞スフェロイド形成システムが細胞懸濁液を取り扱うためのピペットとリザーバー

細胞培養操作において, 懸濁液の攪拌, 吸引排出, 分注といった動きは, 細胞に対する外的刺激を極力小さくする必要があり, 目的のスフェロイドを高品質な状態で獲得するためには, 高度な教育訓練, 培養経験を有した技術が必要となる. さらに, 多細胞スフェロイドの培養方法は定量化されていないため, 熟練した作業者の経験に基づいて行われている. そこで, 熟練した作業者の知見を基にモーションの開発を行った.

作製した専用のリザーバー内の細胞懸濁液内の細胞分布を均一にする際には, スカラールロボット第 4 関節の回転と, 電動シリンダーによる吸引・排出により攪拌を行った. 単純な円運動では一定の場所に細胞が集まる可能性があるため, 熟練した作業者のモーションと同様に, 複雑かつ全体に行き渡るようにした. 具体的には, 目標点から目標点に移動する際は螺旋軌道とし, リザーバーの形状に沿うようにした. その際, ピペットの急激な変化や動作による細胞への外的刺激を避けるために, 動きは滑らかにした. ピペットを動かす際, 細胞懸濁液深部で吸引し, 細胞懸濁液浅部で排出させた. これは, 深部に沈殿している細胞を全体に分散させるために有効であり, 手技でも必ず行われているテクニックである. さらに, 熟練した作業者もしているように, チップの脱落や細胞に外的刺激を極力与えないようにチップはリザーバーの壁面に接触しないようにし, 気泡が発生しないようにした. スフェロイド作製の細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに分注する際には, 細胞懸濁液の攪拌をしながら分注を行った (図 2B).  $2 \times 2$  チャンネルのピペットに取り付けたチップで  $50\mu\text{l}$  吸引し, 1 箇所  $50\mu\text{l}$  ずつ排出して分注する. すなわち, 1 回の動作で 4 ウェルに分注することができる. 細胞懸濁液の排出時はチップ先端をウェル壁面に当てて, 気泡を発生させないようにした. さらに, 細胞懸濁液の分注時間は, 作業者が分注するよりも時間が掛からないようにした.

## (2) 目的に応じた多細胞スフェロイドの作製実験と評価

細胞はヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、多細胞スフェロイド培養に必要な細胞数に達するまで作業者が通常培養を行った。多細胞スフェロイド培養のための細胞懸濁液の細胞数および細胞比率の調整、96 ウェルプレートへの分注は、作業者と開発した多細胞スフェロイド形成システムで行った。本研究における作業者は、細胞培養の基本を理解し、細胞株を適切な方法で培養できるとともに、24 ヶ月以上の細胞培養の経験の有している者である。細胞数は本研究グループの細胞構造体作製において使用頻度の高い、 $3 \times 10^4$  cells/well とし、継代数は 5 から 10、比率は 7 : 3 とした。細胞を分注してから 24 時間毎に 5 日間撮影を行い、定量評価として 96 ウェルプレートの各ウェルに生成される全ての多細胞スフェロイドの直径および円形度を算出し経時的に観察した。細胞構造体作製時では、スフェロイドを針に刺して任意の位置の設置するため、スフェロイドに再現性を持たせることである。したがって、多細胞スフェロイドの直径は重要な評価指標になる。円形度については、作業者が未熟であるとスフェロイド培養しても凝集しないか歪な形になることを確認しており、本研究では品質の基準として採用している。定性評価としては、多細胞スフェロイド内の組織構造および NHDF と HUVEC の分布状況を観察するために、HE 染色および蛍光免疫組織化学分析を行った。

## 4. 研究成果

予備実験の結果、作業者と多細胞スフェロイド形成システムで作製した多細胞スフェロイドは、直径と円形度および蛍光免疫組織化学分析における多細胞スフェロイド内の細胞分布ともに、異なる傾向が認められた。これらについて、多細胞スフェロイドの作製過程が影響していると考えられた。作業者はリザーバーに細胞比率を調整した細胞懸濁液を用意し、入念にピペッティングしてから  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注する。それに対して多細胞スフェロイド形成システムは、細胞比率を調整した NHDF と HUVEC それぞれの細胞懸濁液を作成し、NHDF を  $50 \mu\text{l}$  分注し、その後 HUVEC を  $50 \mu\text{l}$  分注しており、2 種類の細胞を混ぜるタイミングや順番が影響していると考えられた。そこで、多細胞スフェロイドを作製する際に、NHDF と HUVEC を播種する順番によって生じる形状の差異に着目し、播種する順番を入れ替えて 2 種類の多細胞スフェロイド作製する実験を行った (図 4)。作製した多細胞スフェロイドの外観と直径と円形度を算出した結果を図 5 に示す。細胞数が  $3 \times 10^4$  cell/well の多細胞スフェロイドの直径は  $0.55 \sim 0.65 \text{ mm}$  になるため、全ての手法の多くの多細胞スフェロイドが満たしていた。円形度に関して、本研究グループが定める品質基準の 0.6 を多くのスフェロイドが満たしていた。このことから再現性のあるスフェロイドの作製に成功したと考えられる。これらの実験結果から、HUVEC を先に播種した方法の方が、作業者が作製したものに近いことが確認された。

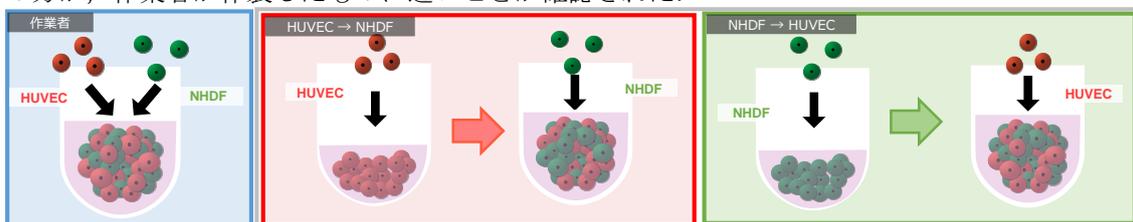


図4 多細胞スフェロイドの作製過程を考慮した作製実験

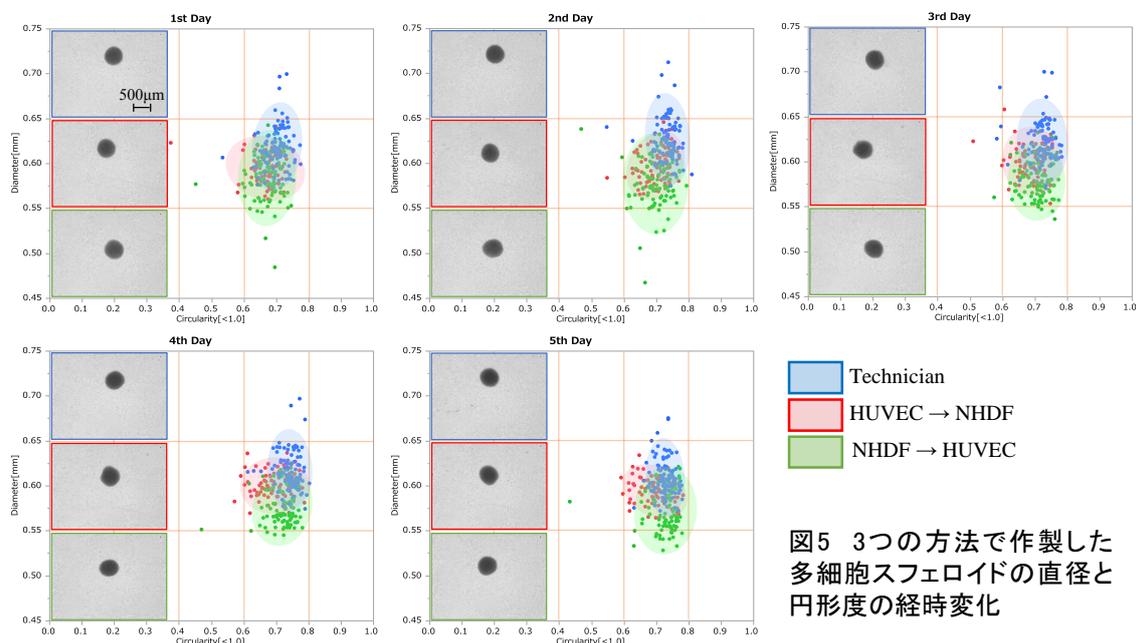


図5 3つの方法で作製した多細胞スフェロイドの直径と円形度の経時変化

スフェロイド培養して2日目の多細胞スフェロイドに対し、HE染色および蛍光免疫組織化学分析を行った結果を図6示す。HE染色により多細胞スフェロイド内の細胞は死滅していないことが確認された。蛍光免疫組織化学分析において、作業者が作製したスフェロイドでは、HUVECが外周部と内部に様に分布していた。多細胞スフェロイド形成システムで作製した多細胞スフェロイドに関しては、HUVECを先に分注した場合、外周部には分布していなかったが、スフェロイドの内部には作業者と同程度のHUVECが一様に分布していることが確認された。NHDFを先に播種した場合には、外周部にHUVECが分布していたが、スフェロイドの内部のHUVECは少ないことが確認された。スフェロイド内部一様にHUVECが分布している方がよいとされており、これらのことについても、HUVECを先に播種した方法の方が、作業者が作製したものに近いことが確認された。

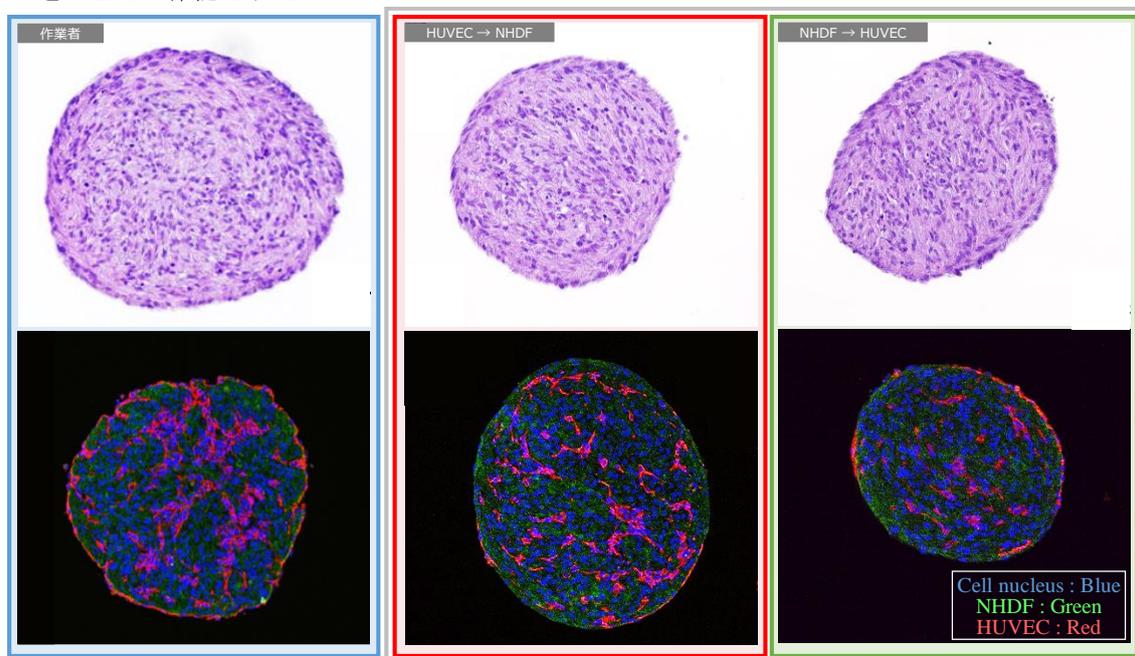


図6 3つの方法で作製した多細胞スフェロイド内部の細胞分布の様子

血管や心臓の3次元細胞構造体を作製するために必要となる多細胞スフェロイドについて、細胞比率を調整できる多細胞スフェロイド形成システムの開発を行った。再現性のある多細胞スフェロイドを作製することができ、作製過程を考慮することで、作業者が作製するものと同様の多細胞スフェロイドを作製できることを確認した。今後は、開発したシステムを応用して、スフェロイドの融合特性を解明するための研究を行う計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 下戸健, 張秀英	4. 巻 Vol.43
2. 論文標題 再生医療用cell processing ロボットを用いた多細胞スフェロイド作製過程の自動化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床バイオメカニクス	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) 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 Shimoto T, Teshima C, Watanabe T, Xiu-Ying Zhang, Ishikawa A, Higaki H, Nakayama K	4. 巻 Vol.33, No.1
2. 論文標題 Study on Pipetting Motion optimization of the Automatic Spheroid Culture System for Forming Spheroids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Robotics and Mechatronics	6. 最初と最後の頁 78-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20965/jrm.2021.p0078	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 下戸健, 手嶋千尋, 中山功一	4. 巻 Vol.46, No.5
2. 論文標題 多細胞スフェロイド形成システムの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 pp.286-287
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 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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Oshio T, Zhang XY, Aoyama K, Shimoto T
2. 発表標題 A Study on a spheroid production method using the multicellular spheroid formation system
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics 2022 (WCB2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoyama K Oshio T, Zhang XY, Teshima C, Shimoto T
2. 発表標題 Evaluation of Spheroids Manufactured Using the Multicellular Spheroid Formation System
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics 2022 (WCB2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山小春, 張秀英, 大塩崇博, 下戸健
2. 発表標題 多細胞スフェロイド形成システムを用いたスフェロイドの作製と組織学的評価
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塩崇博, 張秀英, 青山小春, 下戸健
2. 発表標題 再生医療用細胞構造体作製のための多細胞スフェロイド形成システムの開発
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山小春, 下戸健, 手嶋千尋, 張秀英
2. 発表標題 多細胞スフェロイド形成システムを用いて作製したスフェロイドの内部評価
3. 学会等名 日本機械学会学生会 第53回卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 大塩崇博, 下戸健, 手嶋千尋, 張秀英
2. 発表標題 多細胞スフェロイド形成システムを用いたスフェロイド作製法の検討
3. 学会等名 日本機械学会学生会 第53回卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Teshima C, Shimoto T, Xiu-Ying Zhang
2. 発表標題 Development of the multicellular spheroids formation system for cells construct
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下戸健, 手嶋千尋, 張秀英
2. 発表標題 再生医療用cell processing ロボットを用いた多細胞スフェロイド作製過程の自動化
3. 学会等名 日本臨床バイオメカニクス学会 第48回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手嶋千尋, 下戸健, 渡部俊樹, 石川篤, 日垣 秀彦, 中山 功一
2. 発表標題 スフェロイドサイズに合わせた自動スフェロイド培養システムのピペッティングモーションの検討
3. 学会等名 日本機械学会 2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手嶋千尋, 下戸健, 渡部俊樹, 石川篤, 日垣秀彦, 中山功一
2. 発表標題 細胞比率調節可能な多細胞スフェロイド形成システムの開発
3. 学会等名 日本機械学会学生会 第51回卒業研究発表講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe T, Shimoto T, Teshima C, Zhang XY, Kuzushima k, Ishikawa A, Higaki H, Nakayama K
2. 発表標題 Development of the Automatic Spheroid Culture System for Multicellular Spheroids
3. 学会等名 The 17th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

下戸研究室ホームページ <a href="http://www.fit.ac.jp/~simoto">http://www.fit.ac.jp/~simoto</a> 福岡工業大学研究者情報 <a href="https://www.fit.ac.jp/research/search/profile/id/184">https://www.fit.ac.jp/research/search/profile/id/184</a> 下戸研究室ホームページ <a href="http://www.fit.ac.jp/~simoto">http://www.fit.ac.jp/~simoto</a> 福岡工業大学研究者情報 <a href="https://www.fit.ac.jp/research/search/profile/id/184">https://www.fit.ac.jp/research/search/profile/id/184</a>
--

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