

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20664

研究課題名（和文）マルチコア-シェル型ファイバーを用いた血管網を構築した生体組織の作製

研究課題名（英文）Multicore-shell cell-laden fibers for construction of 3D tissues

研究代表者

小沢 文智（Ozawa, Fumisato）

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：00739120

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）：本研究において、マイクロ流体デバイスを用いて、複数の細胞種を同時に空間制御してカプセル化したマルチコア-シェル型の細胞ファイバーを開発した。このファイバーを用いて血管内皮細胞と肝細胞をカプセル化した肝組織モデルを構築することができた。さらにヒトiPS細胞由来膵島をカプセル化したマルチコア-シェル型細胞ファイバーを作製し、それを糖尿病モデルマウスへ移植し血糖値制御ができた。通常、移植片のサイズが大きくなると細胞に対する酸素や栄養供給の問題から移植片として機能を保つことが難しいが、シェルの近傍に細胞を配置できるマルチコア-シェル型細胞ファイバーでは十分な機能を保つことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルチコアシェル型細胞ファイバーは、細胞の位置を空間的に制御することができ、肝臓や膵臓といった複雑な組織を3次元構築することに有用であると考えられる。また、移植片としてサイズを制御したマルチコアシェル型細胞ファイバーは異物反応を起こしにくく、また腫瘍形成を起こさずかつ緊急時に取り出しも可能であることから、ヒトiPS細胞由来膵島をはじめとしたヒトiPS細胞由来分化細胞を安全に移植することが可能である。今後は移植片の構造や使用しているハイドロゲルの最適化により、様々なヒトへの臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed multicore-shell cell-laden fibers in which multiple cell types are simultaneously spatially controlled and encapsulated using a microfluidic device. Using this fiber, we constructed a liver tissue model encapsulating vascular endothelial cells and hepatocytes in the fiber. Furthermore, a multi-core-shell cell fiber encapsulating human iPS cell-derived islets was fabricated and transplanted into a diabetic model mouse to control blood glucose concentrations. Normally, when the size of the graft is large, it is difficult to maintain the function as a graft due to the problem of oxygen and nutrient supply to the cells. The multicore-shell cell-laden fiber that can place the cells near the shell maintained the function sufficiently.

研究分野：組織工学

キーワード：ハイドロゲルカプセル マイクロ流体デバイス 細胞移植 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

血管は全身の様々な臓器や組織に備わっており、その形成・維持といった重要な役割を果たす。近年、iPS 細胞や ES 細胞といった多能性幹細胞から大きな臓器・組織を作り出す研究が進められているが、その際には細胞だけでなく血管も同時に作れなければ、十分な酸素や栄養が内部の細胞に供給されずに死に至ることが考えられる。この事象を回避しつつ、培養細胞から人間の臓器のようなマクロサイズの高機能な組織を作るためには、血管網を構築した細胞組織を作製する技術が極めて重要である。さらに、iPS 細胞等から作製した組織は、移植する際に未分化細胞混入によるテラトーマ形成を引き起こす可能性があるため、作製した組織を安全に移植する技術も求められる。また、血管の内腔を一層に覆う血管内皮細胞は、血管機能の中心的役割を果たすことから多様な実験研究に応用されている。具体的には、血管内皮細胞を共培養することで、血管網を配置した機能的な生体組織を作製した事例が報告されるようになってきたが、いずれの研究においても「血管網を構築した組織を形成すること」に焦点が置かれており、その「安全性」については十分な検証が為されているとは言い難い。そこで、iPS 細胞から肝細胞や膵島細胞を調整し、作製した組織を移植することが検討されているが、作製した組織を「安全に」移植する方法に関してはいまだ課題が多く、実用化に至っていない。これらの背景から、血管が豊富に存在する肝臓や膵臓といった組織を、いかに高機能に作製し、安全に移植するかを解決する方法が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫隔離能をもつマルチコア-シェル型の細胞ファイバー (Fig. 1) を作製し、内部まで十分に酸素や栄養を供給できるマクロサイズの高機能な組織を開発することである。これを、近年盛んに作製されている iPS 細胞から分化した体細胞 (iPS 由来体細胞) を用いた組織構築技術に適用し、細胞壊死を防ぎながら大きな組織を構築することで高機能な生体組織を再現し、かつ安全性が担保された新たな細胞移植治療法が可能になると期待される。

本研究では、細胞を細胞外マトリックスが豊富な環境下で培養でき、かつ細胞をカプセル化できる細胞ファイバー技術に着目した。細胞をカプセル化することのメリットは、半透膜性のゲル等で細胞を覆うことで、基質や代謝物、たんぱく質生成物の伝達を維持しつつ、宿主の免疫反応から保護し、細胞の体内への生着を防ぐことである。また、細胞同士が接触することで組織を構築することも可能である。そこでまず、本手法により肝臓や膵臓といった組織を *in vitro* で再構築した細胞ファイバーを作製する。さらに再生医療実用化を視野に入れ、移植方法の確立を企図する。その手順としては、作製した細胞ファイバーの移植部位等を検討し、移植安全性を確認した後、最終的には疾患モデルマウスに移植することで、*in vivo* での機能評価を行う。

## 3. 研究の方法

まず、複数種の細胞を同時に共培養できるマルチコア-シェル型のファイバーを作製するためのマイクロ流体デバイスを開発した。デバイスは 3D プリンターで作製したコネクタおよびガラスキャピラリーを用いて作製し、流速を制御することでファイバーの外径やコア直径を制御することを試みた。作製したデバイスの、中心コアに血管内皮細胞 HUVEC を含む細胞懸濁液、外側のコアに肝細胞 HepG2 を含む細胞懸濁液、内側のシェルにコラーゲン溶液、外側のシェルに 1.5% アルギン酸ナトリウム溶液、シースに 100 mM 塩化カルシウム溶液を、それぞれ流速 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 700  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 350  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 3.6  $\text{ml}/\text{min}$  で導入し、マルチコア-シェル型の細胞ファイバーを作製した。作製したファイバーを生理食塩水で洗浄し、培地中に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下でファイバー中の細胞を培養した。培養したファイバー中の細胞に対し、Calcein-AM/PI 蛍光染色によって Live/Dead 評価をし、ELISA によってアルブミン分泌量を測定することで *in vitro* での生体機能を評価した。

さらに、作製したマルチコア-シェル型の細胞ファイバーを、マウスへ移植することで *in vivo* での機能評価を行なった。ファイバーの外側のコアにヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したファイバーを作製し、糖尿病モデルマウスの腹腔内にファイバーを移植することで、治療効果および移植安全性を確認した。また、移植したマウスから適宜ファイバーを取り出した後、凍結切片を作製し、HE 染色および免疫染色によって移植後の細胞の解析を行った。

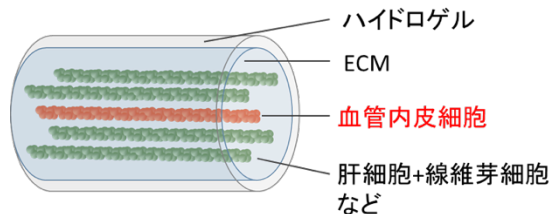


Fig. 1 マルチコア-シェル型細胞ファイバーの概念図

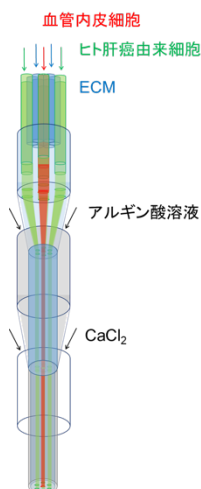


Fig. 2 マイクロ流体デバイスを用いたマルチコア-シェル型細胞ファイバーの作製法

#### 4. 研究成果

作製したマイクロ流体デバイスを用いて、蛍光ビーズをカプセル化したマルチコア-シェル型のファイバーを作製した(Fig. 3)。それぞれのコアにカプセル化した蛍光ビーズはファイバー中に均等に配置され、それぞれのコアが混ざらない状態を維持できることが確認できた。さらに肝臓の再構築をモデルとし、血管内皮細胞 HUVEC とヒト肝癌由来細胞 HepG2 をカプセル化したマルチコア-シェル型の細胞ファイバーを作製した(Fig. 4)。作製したファイバー中の細胞を共培養することで、それぞれのコアの細胞が増殖し凝集することで、ヒモ状の3次元組織が形成された。カプセル化した細胞の Live/Dead 蛍光染色の結果、カプセル化した細胞のほとんどが生存しており、ELISA によってアルブミン分泌していることも確認できた。さらにヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したマルチコア-シェル型細胞ファイバーを作製した (Fig. 5)。通常、移植片のサイズが大きくなると細胞に対する酸素や栄養供給の問題から細胞の生存率を保つことが難しいが、シェルの近傍に細胞を配置できるマルチコア-シェル型細胞ファイバーでは十分な細胞生存率を保つことができた。このファイバーを糖尿病モデルマウスの腹腔内に移植した。作製したファイバーは、従来のものに比べ、異物反応が抑制されかつ1年の長期移植においてもゲルとしての形態を維持しており、血糖値を最大半年以上の長期にわたり正常化することができた (Fig. 6)。移植したマウスには、癒着や腫瘍形成などは起こらず安全性も確認でき、適宜体内から移植片を取り出すことにも成功した。

このマルチコア-シェル型細胞ファイバーは、現状使用している材料では免疫のあるマウスやヒトの糖尿病治療にはまだ課題があるが、構造の最適化や使用しているハイドロゲル材料の改良などを行うことで改善できると考えられる。また、ヒト iPS 細胞由来膵島を安全に移植できることから、膵島に限らず、甲状腺や下垂体などの内分泌細胞の移植に応用でき、さまざまな細胞移植治療への応用展開が期待できる。

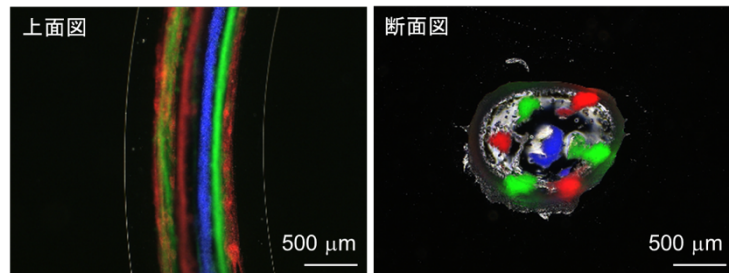


Fig. 3 蛍光ビーズを用いたマルチコア-シェル型ファイバー

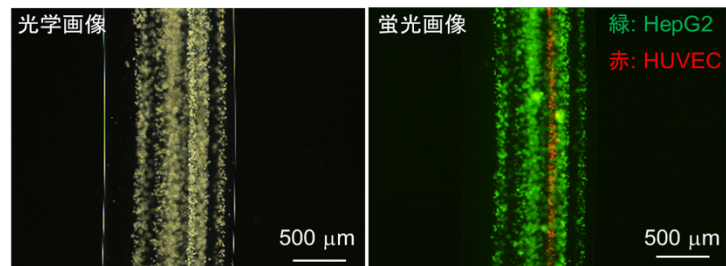


Fig. 4 血管内皮細胞 HUVEC とヒト肝癌由来細胞 HepG2 をカプセル化したマルチコア-シェル型細胞ファイバー

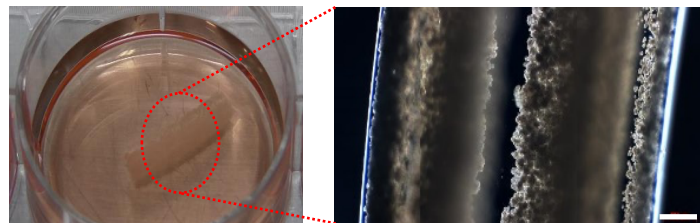


Fig. 5 ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したマルチコア-シェル型細胞ファイバー (Scale bar: 500 μm)

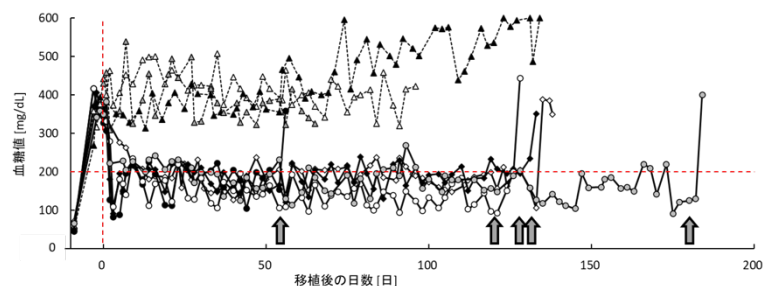


Fig. 6 ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したマルチコア-シェル型細胞ファイバーを移植した後の、長期にわたる血糖値の変化 (実線: 移植あり、点線: 移植なし)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fumisato Ozawa, Shogo Nagata, Haruka Oda, Shigeharu G Yabe, Hitoshi Okochi, Shoji Takeuchi	4. 巻 24
2. 論文標題 Lotus-root-shaped cell-encapsulated construct as a retrieval graft for long-term transplantation of human iPSC-derived -cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102309	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小沢文智、竹内昌治
2. 発表標題 レンコン状構造をもつヒトIPS細胞由来臍島移植片の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 GRAFT AND USE THEREOF	発明者 竹内昌治、小沢文智、長田翔伍	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/043582,	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------