

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22489

研究課題名（和文）体内マトリックス加工法による新規微細培養基板の創出

研究課題名（英文）Development of novel microstructure culture substrate using in-vivo matrix processing method

研究代表者

佐藤 康史（SATO, Yasushi）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30767778

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、従来よりも高精度の評価が可能なin vitro評価系の実現を目指すため、形状制御した生体組織体を作製し、培養基板へ応用することを目的とした。培養基板の形状に設計した鋳型をラットの背部皮下に埋入し、組織形成を行ったところ、鋳型設計に応じてスリット構造やマルチウェル構造など、培養基板として応用可能な立体形状を有する生体組織体を作製可能であった。作製した生体組織体上に培養細胞を播種したところ、通常の細胞培養プレートと同様の細胞形態、密度で接着し、同等の効率で細胞増殖が起こることが明らかとなった。以上から、皮下で作製した生体組織体が培養基板として応用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、設計した鋳型を皮下に植え込むことにより、任意形状の生体組織体を作製可能であり、さらにそれを培養基板として応用できる可能性が示された。生体内と同じECM構造・密度を有する培養基板であるため細胞ECM間相互作用が活性化され、従来の二次元培養で問題となる細胞機能低下を防ぎ、細胞の品質を維持したまま培養できる可能性がある。そのため、従来よりも高精度なin vitro評価系が構築でき、医薬品等の開発に応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop biological tissues with controlled shape and apply them to culture plates for in vitro evaluation system that enables more accurate evaluation than conventional methods.

The molds designed for the culture plate were embedded subcutaneously into the dorsal skin of rats, resulting in tissues formation. Depending on the molds design, it was possible to fabricate tissues with three-dimensional shapes, such as slit structures and multi-well structures, which could be applied as culture plates. When the cultured cells were seeded onto the fabricated tissues, it was observed that the cells adhered with similar morphology and density as those on normal cell culture plates. Additionally, cell proliferation occurred with the same efficiency as that observed in normal cell culture plates. These results suggest that tissues fabricated subcutaneously may be applicable as culture plates.

研究分野：細胞組織工学

キーワード：組織工学 微細培養基板 臓器チップ in vitro評価系 生体内組織工学

1. 研究開始当初の背景

近年、微細加工された培養基板上に培養細胞を配置し、栄養供給や代謝、細胞間の相互作用など、人体の生理的特性を基板上で再現する、臓器チップが医薬品の薬効・毒性の新たな評価ツールとして注目されている。立体構造や機械的刺激の付与により、従来の試験系よりも生体内に近い生理的反応が見られることから、医薬品開発などへの利用が期待されている。しかし、臓器チップをはじめとする *in vitro* 評価系に用いられる細胞培養基板のほとんどがプラスチックなどの合成高分子製であり、分子構造、硬さ、電荷などの培養環境が生体内とは大きく異なり、細胞の接着や細胞—細胞外マトリックス (ECM) 間相互作用、細胞の浸潤や遊走といった細胞本来の生理的反応を再現することに限界がある。特に細胞の足場となる ECM と細胞の相互作用は、細胞の生存や分化に重要な因子である。また、細胞の機能を向上させるため細胞を三次元的に培養する方法も検討されているが、生体内の細胞密度や細胞—ECM 間相互作用を再現できておらず、さらなる改良が必要である。より正確な薬効評価試験を実現するためには、生体環境を模倣可能な新規の培養基板の開発が必要であると考えた。そこで、形状を制御した生体組織を作製し、培養基板として応用することが可能になれば、上記の課題をできると考えた。

2. 研究の目的

申請者らは、皮下に組織作製の鋳型を埋め込み、鋳型に形成した結合組織を移植材料として利用する、生体内での組織工学の研究を行っている。本手法を用いることで、生体外での加工を必要とせず、任意形状の生体組織を生体内と同一の ECM 組織成分・構造を維持したまま細胞培養に利用可能であり、目的の評価系に合わせた構造の生体組織も入手可能である。これらの特徴を生かすことで、これまでよりも高精度評価が可能な、新たな細胞培養基板が開発できると考えた。

本研究では、生体内と類似した培養環境を実現可能な、新たな培養基板を開発するため、動物の皮下で形状制御した生体組織の作製および培養基板としての機能評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 形状制御した生体組織体の作製

3D プリンター等を用いてアクリルまたはシリコン製の埋込用の鋳型を作製し、ラットの皮下に埋入した。1 か月後に鋳型を摘出し生体組織体を得た。生体組織体は 80%エタノールまたは 0.6%グルタルアルデヒド中で保存した。

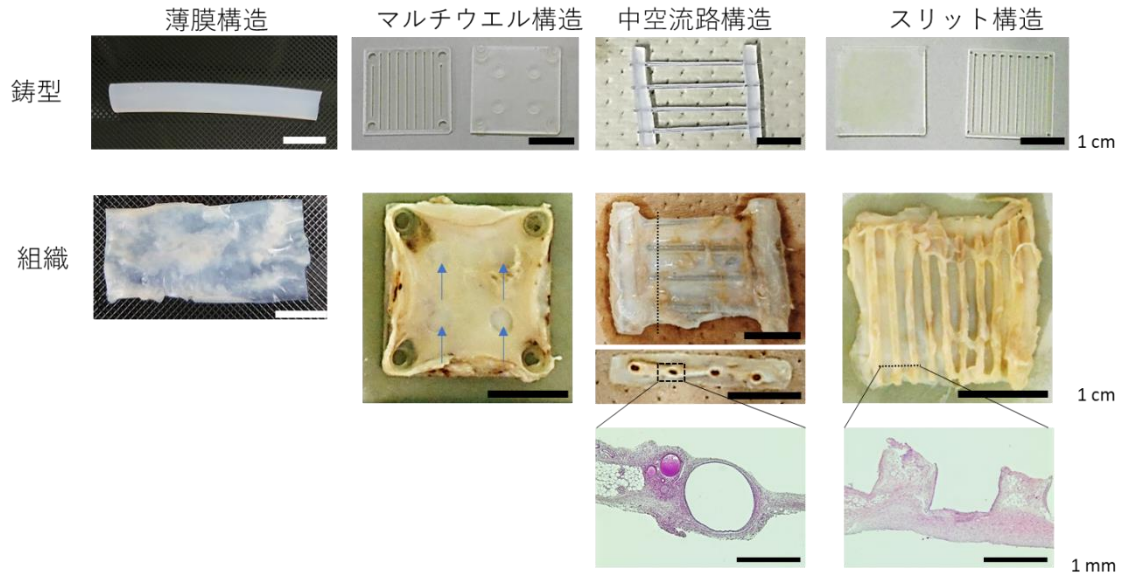
(2) 生体組織培養基板上での細胞培養評価

作製した生体組織体の培養基板としての性能評価のため、培養細胞を用いて評価を行った。生体組織体を直径 6 mm の円形に切り出し、PBS で洗浄後、96well プレートに設置した。臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) またはヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を播種し、細胞形態、細胞数、増殖因子の産生等の評価を行った。

4. 研究成果

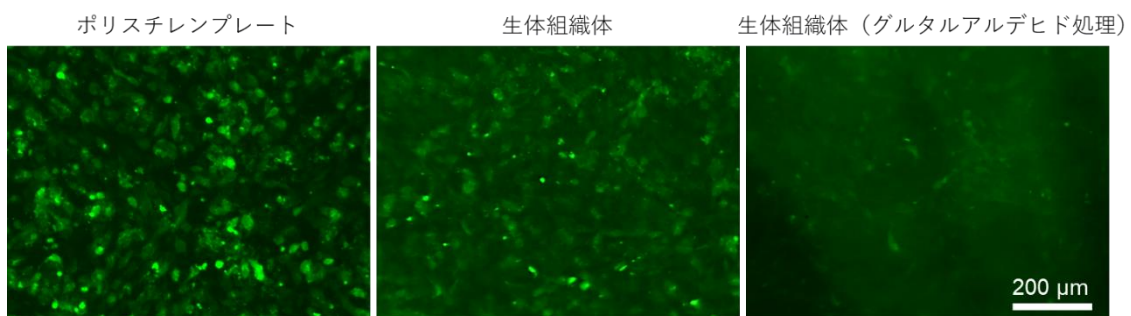
(1) 形状制御した生体組織の作製

組織形成用の鋳型をラットの皮下に約 1 か月埋入したところ、鋳型設計に応じた形状の結合組織が形成し、チューブ状や厚さ 100 μm 程度の薄膜、マルチウエル構造、中空流路構造、1 mm 幅のスリット構造など、培養基板として応用可能な立体形状を有する生体組織体が作製可能であった。



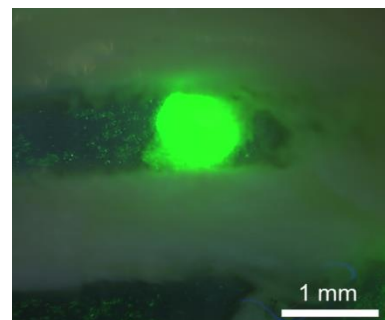
(2) 生体組織培養基板上での細胞培養評価

細胞形態および接着密度を評価するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した HUVEC 播種し、蛍光顕微鏡で観察したところ、生体組織体上には通常の培養プレートと同様の細胞形態、密度で接着、培養可能であることが明らかとなった。一方、グルタルアルデヒド処理を行った組織上では細胞接着効率が低下した。また、スリット構造の生体組織にスフェロイドを設置し、三次元培養への応用することも可能であった。



HUVEC (緑) 播種後2日後の蛍光観察画像

細胞数の変化を WST-8 を用いて評価したところ、通常の細胞培養プレートやコラーゲンコートプレートと同等の効率で細胞接着や増殖が起こることが明らかとなった。一方、培地中の血管内皮増殖因子 (VEGF) の濃度に変化は見られなかった。hMSC を播種した場合でも同様に細胞接着・増殖が起こり、5 日間に渡って維持培養が可能であった。



スリット中に播種した HUVECスフェロイド (緑)

以上から、皮下で作製した生体組織体は、通常の培養基板と同様の細胞接着・増殖挙動が起こり、培養基板として応用できる可能性が示された。また、生体組織体の処理方法により細胞接着性を制御できる可能性が示された。これらの知見は、生体組織由来の培養基板およびそれらをもとにした *in vitro* 評価系の構築に応用されることが期待される。

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 0件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Horie Masanobu, Yamano-Adachi Noriko, Kawabe Yoshinori, Kaneoka Hidenori, Fujita Hideaki, Nagamori Eiji, Iwai Ryosuke, Sato Yasushi, Kanie Kei, Ohta Seiichi, Somiya Masaharu, Ino Kosuke | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Recent advances in animal cell technologies for industrial and medical applications | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering | 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） 10.1016/j.jbiosc.2022.03.005 | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤康史、寺澤武、井上雄介、武輪能明 |
| 2. 発表標題 生体内組織形成術を用いた微細表面構造を有する生体組織培養基板の作製 |
| 3. 学会等名 第59回日本人工臓器学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤康史、寺澤武、井上雄介、武輪能明 |
| 2. 発表標題 生体内組織形成術を用いた Bio-Culture-Plate の開発と性能評価 |
| 3. 学会等名 第34回 代用臓器・再生医学研究会総会/日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第6回研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤康史、寺澤武、井上雄介、武輪能明 |
| 2. 発表標題 生体内組織形成術を用いた Bio-Culture-Plate の開発と性能評価 |
| 3. 学会等名 日本組織培養学会 第94回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

インタビュー記事掲載
佐藤康史：「バイオ系のキャリアデザイン 就職支援OG 08インタビュー編」、生物工学会誌 第101巻 第2号 p.94-95、2023年2月25日
DOI: 10.34565/seibutsukogaku.101.2_94

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|