

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18061

研究課題名（和文）オルガノイド形態形成解析のための三次元制御・計測プラットフォームの構築

研究課題名（英文）3D culture platform for organoid morphogenesis with three-dimensional control of cell distribution and large scale imaging using a cube device

研究代表者

高野 温 (Takano, Atsushi)

大阪大学・大学院工学研究科・招へい研究員

研究者番号：30883657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：生体内の組織あるいは臓器に似せたミニ臓器（オルガノイド）の作製に使われるハイドロゲルに対して、細胞の3次元配置制御と培養した細胞組織の3次元計測が両立可能な培養システムを構築した。立体組織の計測性に優れるキューブ培養器に充填したハイドロゲル中に形成したすきま空間に細胞を配置する方法を確立したことで、3次元培養する際の細胞初期配置の制御性が向上した。本培養システムを用いてキューブ培養器内に配置制御された細胞から立体的な細胞組織をつくり、その細胞組織の3次元計測を達成した。本培養システムは、細胞とハイドロゲルの配置条件と細胞挙動の解析ができるため、オルガノイドの形態形成メカニズムの解明に貢献できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、3Dバイオプリンティング技術とキューブ培養器を使用した計測技術を融合させることで、3次元培養空間に対して設計自由度が高い形状に細胞を配置制御できるだけでなく、培養した細胞組織の計測も実施できる培養系の構築を達成した。これにより、適切な培養系が不足してこれまで着手困難であった、ハイドロゲル中の細胞挙動の計測、解析によるオルガノイド形態形成メカニズムの解明に取り組むことが可能になる。今後、形態形成メカニズムが解明され、細胞とハイドロゲルをどう配置するかをいけばオルガノイドの設計論に応用展開できれば、将来的に本物のようなオルガノイドを人工的に設計して作製する方法の創出が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a 3D culture platform that enables both 3D cell distribution control and 3D imaging of organoids in hydrogel, which is used to create mini-organs (organoids) that mimic cellular tissues or organs in vivo. Three-dimensional control of cell localization in hydrogel filled in a cube device, which has the ability to image cellular tissue with high resolution, improves the accuracy of cellular initial positioning. Using the developed culture system, three-dimensional cellular tissues were cultured from the cells controlled to be placed in the cube device, and three-dimensional imaging of the cellular tissues was also achieved. These results confirm that the developed culture system can contribute to the elucidation of the morphogenesis mechanism of organoids because it can analyze the arrangement conditions of cells and hydrogel as well as cellular behavior.

研究分野：バイオエンジニアリング

キーワード：培養環境制御 3次元培養システム 3Dバイオプリンティング キューブ培養器 細胞初期配置

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の組織や臓器に似せて人工的に作りだしたミニ臓器(オルガノイド)は、本物の組織や臓器の代替として利用され、薬の効果を調べる創薬研究や失われた人体機能を再生させる再生医療研究への応用が期待されている。オルガノイドの作製方法は、細胞同士のコミュニケーションによって生じる細胞の自己組織化によって形成されるが、自己組織化する過程で細胞が凝集塊になり、実際の組織形状と大きく異なる問題があった。一方で、細胞とハイドロゲルを組織の最終形状に配置することで、人工的に実際の組織形状がつくられたが、細胞自体の活動を考慮して配置されなかったため、組織形状が経時変化して最終形状が変形する問題があった。これら2つの異なる試みから、細胞の自己組織化による形態形成メカニズムに従って、工学的に細胞とハイドロゲルを配置することで、実際の組織形状に近いオルガノイドの最終形状を形成できる可能性が示唆された。しかし、細胞とハイドロゲルをどのように配置すべきかのいわばオルガノイドの設計論は具体的に明らかにされておらず、その為にオルガノイドの形態形成メカニズムの解明が必要となる。そして、形態形成メカニズムを解明するためには、細胞とハイドロゲルの配置を条件設定して、その条件での細胞組織の最終形状を計測し、解析する必要があるが、培養時の細胞初期配置の制御と細胞の最終形状の計測が両立した実験系の不足が課題であった。

2. 研究の目的

上記の課題を解決するため、本研究課題では3Dバイオプリンティング技術と申請者が所属する研究グループが開発したオルガノイドの計測技術を融合させ、オルガノイドの形態形成メカニズムの解明に向けた制御と計測が両立した3次元培養システムの構築を目的とした。3Dバイオプリンティング技術は、細胞毒性がないバイオインクを精密に吐出可能なため細胞とハイドロゲルの配置制御に利用できる。他方で、細胞組織の計測には、所属する研究グループが開発したキューブ培養器を使用した高精細イメージングを活用する。すなわち、キューブ培養器を使用した3次元培養にあわせて3Dバイオプリンティングでの制御技術を最適化することにより、キューブ培養器内の3次元空間に細胞とハイドロゲルを自由に配置制御できる方策を検討した。

3. 研究の方法

- (1) 細胞とハイドロゲルの配置制御：3Dバイオプリンターでつくった水溶性鋳型を使った型取りによってキューブ培養器のハイドロゲル中にすきま空間を形成して、そのすきま空間に細胞を導入する方法を確立した。まず、細胞を配置する3次元空間形状を3Dモデリングソフトウェアで設計し、3Dバイオプリンター(Allevi 1, Allevi)を用いて炭水化物ガラス(CG3357, Volumetric)製の水溶性鋳型を造形した。次に、水溶性鋳型をクロロホルムに溶解した50 mg/mL Poly(D, L-lactide-co-glycolide)(PLGA; 26269-10, Polysciences)溶液に浸して疎水性コーティングを施した後、ただちに2-プロパノールに浸して余分なPLGA溶液を除去し、さらに圧縮空気を吹き付けることで2-プロパノールを除去してから防湿庫内で乾燥させた。続いて、疎水性コーティングした水溶性鋳型とキューブ培養器を位置合わせのために3Dプリンターで作製したキューブホルダー上に配置させた。そして、キューブ培養器にコラーゲン溶液を導入して硬化させた後、キューブ培養器をキューブホルダーごとPBSに浸すことで水溶性鋳型を溶解除去した。最後に、キューブ培養器をキューブホルダーから取り外してから、水溶性鋳型がなくなったことでハイドロゲル中に形成されたすきま空間に細胞を導入してすきま空間の表面に接着させてから、マルチウェルプレートに導入した新鮮培地にキューブ培養器を浸して培養を行った。
- (2) 細胞組織の計測と解析：キューブ培養器内で培養した細胞が自己組織化することで形成した組織(細胞組織)を免疫蛍光染色してから、キューブ培養器の多面観察による高精細イメージングで計測し、解析する方法を確立した。免疫蛍光染色については、まず、培養が終了したキューブ培養器をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定した。次に、キューブ培養器をPBSで洗浄した後、0.5% TritonX-100で細胞膜に穴をあける透過処理を行った。続いて、PBSで洗浄した後、キューブ培養器を100 mMグリシンでPFAの未反応なアルデヒド基を不活化処理後、PBSですすいだ。そして、IF-buffer(10% Goat serum, 0.2% Triton X-100, 0.1% BSA, 0.05% Tween-20 in PBS)でブロッキングし、Alexa fluor 488 Phalloidinで細胞組織のアクチンフィラメントを染色した。最後に、キューブ培養器をPBS洗浄してから多面観察による高精細イメージングに使用した。高精細イメージングは、キューブ培養器を多方向から撮影した画像を重ね合わせることで培養容器内の細胞組織の高精細な画像を取得する方法である。まず、蛍光顕微鏡でキューブ培養器の蛍光染色された細胞組織のZ軸スタック画像を撮影し、撮影後キューブ培養器を回転させ、多方向からの同様に撮影を行った。これらのZ軸スタック画像を、独自開発の画像位置合わせソフトで重ね合わせた後、画像処理ソフトImageJでZ軸の投影画像を取得した。

4. 研究成果

本研究課題で構築した3次元培養システムを図1に示す。本培養システムは、次の特長が示された。①3Dバイオプリンターのプリント条件を検討することで、細胞配置形状の3Dモデルに従って水溶性鋳型を形状精度よく造形した。②キューブホルダーを設計して使用することで、水溶性鋳型とキューブ培養器の位置合わせとハイドロゲルへの型取りの再現性が向上した。③水溶性鋳型の溶解除去プロセスの最適化によって、すきま空間内の鋳型残渣による細胞の接着阻害を抑制した。④管腔形状のすきま空間の内壁のみに細胞を接着させたい場合、細胞導入後、一定の時間間隔でキューブ培養器を回転させる必要があり、その為の細胞接着方法を最適化した。⑤一般的な蛍光観察では、サンプルサイズが10 mm程度になると焦点距離が長く、対物レンズから離れるほど蛍光信号強度が低下するため、サンプル全体を撮影することが困難だが、所属の研究グループが開発した計測技術を応用することで培養した細胞組織の高精細な蛍光イメージングを達成した。

図2に、細胞初期配置の制御性に影響する主要要素技術を示した。3Dバイオプリンターで造形した水溶性鋳型は、鋳型表面にバリが生じたため、鋳型形状が変形しない程度に加湿空間で保管して鋳型表面を溶かして平滑化することで、型取りした際にハイドロゲル表面に粗さが転写さないようにした(図2a)。キューブホルダーは、水溶性鋳型とキューブ培養器の位置合わせのほか、ハイドロゲル液をキューブ培養器に入れてからハイドロゲルが硬化する間に水溶性鋳型が溶解して崩れることを防いだ(図2b)。また、水溶性鋳型を溶解除去して形成したすきま空間(図2c)の形状精度は、細胞配置の正確さにつながるため重要である。I型コラーゲンゲル中に形成した円柱形状のすきま空間を計測した結果、直径1.00 mmの設計値に対して実測値が0.94 mmとなり、真円度と真直度が0.03 mm以内となり、高い精度ですきま空間が形成できたことが示された。このように要素技術の最適化を行って細胞配置の制御性の確立を図り、3次元培養システムの構築に取り組んだ。

本研究課題で構築した3次元培養システムを用いて、ヒトさい帯静脈内皮細胞(HUVEC)をらせん形状に配置して培養した細胞組織の計測結果を図3に示す。細胞組織の蛍光観察において、計測対象が対物レンズから離れるほど蛍光信号強度が低下するため、今回の計測するHUVECの細胞組織のように対物レンズ(4倍)から3-5 mm程度離れたサンプルの計測は一般的には困難とされる。対して、本培養システムのキューブ培養器を使用した計測では、まず、対物レンズ(4倍)を使用して、立方体の下半分を撮影し、次に、キューブ培養器を180度回転させてキューブ培養器の残り半分を別々に撮影した(図3a)。続いて撮影した画像の重なり合う箇所を基準にして画像の位置合わせを行うことで、キューブ培養器の正面と背面から撮影した細胞組織のらせん交差部分の高精細画像を取得した(図3b, c)。これら画像を重ね合わせることでらせん交差部の計測が実施可能となった(図3d)。

以上より、細胞の配置制御と計測が両立した3次元培養システムが構築され、オルガノイドの形態形成メカニズムの解明にむけて任意の初期配置形状から培養した細胞組織の形態形成を三次元的に計測することで定量的に解析するための基盤技術が整った。

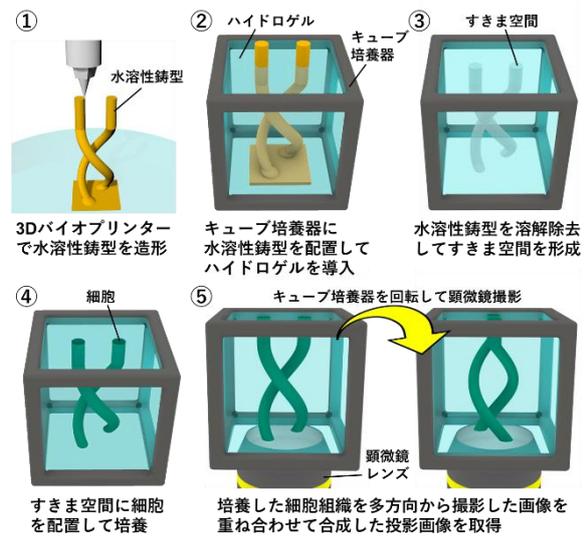


図1. 細胞初期配置の制御と細胞組織形状の計測を両立した3次元培養システム

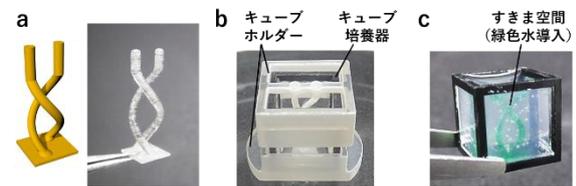


図2. 細胞配置の制御性に関わる要素技術 (a)水溶性鋳型. (b)キューブ培養器をセットしたキューブホルダー. (c)着色水を導入して可視化したハイドロゲル中に形成したすきま空間

キューブホルダーは、水溶性鋳型とキューブ培養器の位置合わせのほか、ハイドロゲル液をキューブ培養器に入れてからハイドロゲルが硬化する間に水溶性鋳型が溶解して崩れることを防いだ(図2b)。また、水溶性鋳型を溶解除去して形成したすきま空間(図2c)の形状精度は、細胞配置の正確さにつながるため重要である。I型コラーゲンゲル中に形成した円柱形状のすきま空間を計測した結果、直径1.00 mmの設計値に対して実測値が0.94 mmとなり、真円度と真直度が0.03 mm以内となり、高い精度ですきま空間が形成できたことが示された。このように要素技術の最適化を行って細胞配置の制御性の確立を図り、3次元培養システムの構築に取り組んだ。

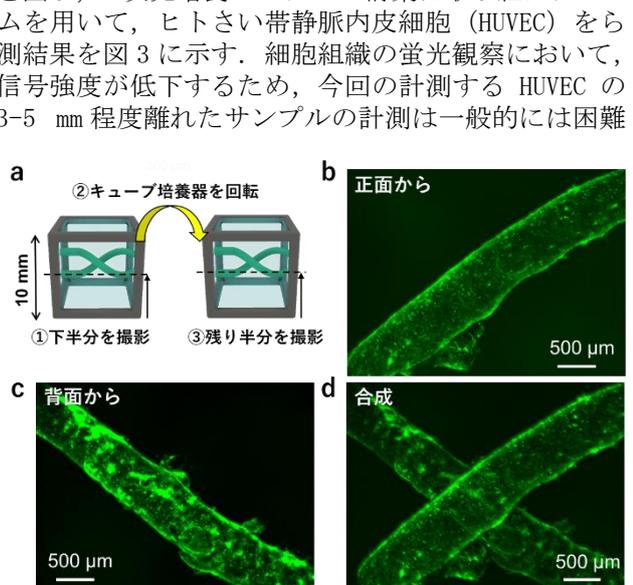


図3. らせん形状に配置して培養したヒトさい帯静脈内皮細胞(HUVEC)の細胞組織 (a)キューブ培養器の撮影方法. (b)細胞組織のらせん交差部をキューブ正面側から撮影した画像. (c)交差部をキューブ背面側から撮影した画像. (d)正面からと背面からの画像を重ね合わせた投影画像

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 Takano Atsushi, Koh Isabel, Hagiwara Masaya	4. 巻 13
2. 論文標題 3D Culture Platform for Enabling Large-Scale Imaging and Control of Cell Distribution into Complex Shapes by Combining 3D Printing with a Cube Device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 156 ~ 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi13020156	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野 温, 萩原 将也
2. 発表標題 三次元任意形状に細胞初期配置制御する手法の構築
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野 温, コウ イザベル, 萩原 将也
2. 発表標題 オルガノイド形成制御のための3次元細胞配置制御プラットフォームの構築
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野 温, コウ イザベル, 萩原 将也
2. 発表標題 3次元細胞配置制御によるオルガノイド形状の制御・計測プラットフォームの構築
3. 学会等名 日本再生医療学会第2回科学シンポジウム
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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