

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18951

研究課題名（和文）デカルトの悪魔をポンプとして内包するスフェロイドの作製

研究課題名（英文）Development of a spheroid containing a water ghost as a pump

研究代表者

小島 伸彦（Kojima, Nobuhiko）

横浜市立大学・理学部・教授

研究者番号：90342956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではスフェロイドの巨大化を目指して、スフェロイドの内部にポンプを埋め込むことを目的とした。スフェロイドの埋め込むポンプは電気駆動するものでは不都合である。なぜなら、防水や配線を施す手間が必要となり、そもそも数ミリ程度というサイズでの作製が困難なためである。そこで本研究では中空粒子をポンプとし、これをスフェロイドに埋め込んだ上で液体中で圧力によって駆動することを目的とした。アルギン酸ゲル、シリコンチューブ、ポリジメチルシロキサン（PDMS）のそれぞれからなる中空粒子を作製し、駆動条件などを検討したところ、PDMSが最も適していることが明らかとなった。その他、温度駆動型のポンプも検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフェロイドとは細胞をボール状に凝集させた人工組織である。通常のシャーレによる培養よりも高い生理学性を示すため、また、再生医療における組織の最小単位となるため、その重要性はますます高まっている。しかしながら、酸素供給が律速となって、直径200ミクロン程度までが培養可能なサイズとなっていた。本研究ではスフェロイドの中に非接触的・非電氣的に駆動できる中空粒子を埋め込み、これを圧力によってポンプのように駆動できることを示した。また、温度変化によって駆動するポンプも検討し、駆動させることによって壊死が抑制できることを明らかとした。これらの成果は、組織工学や再生医療の分野で大きなブレイクスルーである。

研究成果の概要（英文）：In this study, the aim was to achieve enlargement of spheroids by embedding pumps inside them. Electrically driven pumps were deemed unsuitable due to the necessity of waterproofing and wiring, as well as the difficulty in manufacturing at sizes around a few millimeters. Therefore, hollow particles were utilized as pumps in this study, intended to be embedded in spheroids and driven by pressure in liquid environments. Hollow particles composed of alginate gel, silicone tubes, and polydimethylsiloxane (PDMS) were fabricated, and upon investigation of operational conditions, PDMS was found to be the most suitable material. Additionally, temperature-driven pumps were also considered.

研究分野：組織工学、細胞生物学

キーワード：スフェロイド ポンプ 拍動

## 1. 研究開始当初の背景

巨大な臓器をつくる方法として、組織工学分野では3Dプリンターの利用が主流である。しかし、臓器を作り上げるだけの大量の細胞が必要であり、現実性に乏しい。幹細胞生物学や発生生物学の分野では、胚盤胞補完法によってブタ体内にヒト臓器をつくるアプローチが注目を集めている。この場合、用意する細胞はごく少量の未分化な iPS/ES 細胞で済むが、異種動物を使う点や、最終的にブタを殺して臓器を収穫するという点に倫理的な問題が生じる。したがって、巨大臓器作製の目処はまだたっていないというのが現状である。

スフェロイドのようなミニ臓器を培養して大きく育てるというアイデアは、どの研究者も思いつくものだが、我々が知る限りこれまで成功例はない。スフェロイドを培養によって成長させるうえで最も大きな問題の一つは、酸素供給である。スフェロイドの中心部分は表面部分よりも酸素濃度が低く、壊死が生じやすい。生体内では血管と血流によって物質交換能が担保されているが、スフェロイドは単純に細胞が密に凝集した擬似組織であるため、相対的に物質交換能が低くなる。

研究代表者は従来にはない構造をもつスフェロイドを作製する技術の開発に取り組んできた。例えば研究代用者は、スフェロイドに細胞外マトリックスを薄膜充填し、より生体に近いスフェロイドを作製している[Tao *et al.*, *Sci Rep*, 2020]。これらミニ臓器は、医薬品候補化合物の薬効や毒性の評価の際、動物実験を代替する目的に適している。特に物質交換能の低下を改善する目的で、研究代表者はスフェロイドの内部にヒドロゲルビーズからなるスペーサーを埋め込み、多孔質なスフェロイドを実現させた[Kojima *et al.*, *Sensor Actuat B-Chem*, 2014]。このようなスフェロイドは実際に物質交換能の改善が認められ、スフェロイド内部の壊死が抑制された[Mihara *et al.*, *Cells*, 2019]。しかし、内部に空隙はあるが血管網ではなく、あくまで拡散による物質交換が主体となる。

研究代表者は、どんな細胞からなるスフェロイドであっても、物質交換能の低下を改善できるような汎用性の高い基盤技術が必要であると考え、それには血管網とともにスフェロイド内部で駆動するポンプが不可欠だと着想した。例えばヒトの発生では約3週間の時点で心臓の拍動が始まり、酸素や栄養供給の莉速を克服して胎児サイズが大きくなる。その際、初めから血管網が存在するのではなく、脈管形成という様式によってゼロから血管がつくられる。これをスフェロイドの内部でも再現できれば、これまでに実現していない“試験管内で作製可能な巨大臓器”という人類の夢の実現に繋がるだろう。

最も重要なのは何をポンプとして使うかである。ポンプが駆動することを前提とすれば、初めからある程度大きなスフェロイドをつくることはできるが、とはいえポンプのサイズは数 mm か、それよりも小さいものであるべきだろう。電動の場合は配線が必要となり、また防水の観点からも現実的ではない。そこで研究代表者は“デカルトの悪魔”、すなわち“浮沈子”の原理を応用することとした。浮沈子は中空の構造をもち、外部から加えられた圧力によって気体部分の体積が変わることで浮沈する。つまり、スフェロイド内部に中空粒子を埋め、培養液全体を加圧すると、粒子体積が減少した分だけ、スフェロイド内部で培養液が移動する。電源や配線がなくても、スフェロイド内部で非接触的にポンプを駆動できるのである。繰り返しの加圧にはシリンジポンプを利用する。このような中空のポンプをどうやってスフェロイドに埋め込むのかということも大きな問題である。申請者はメチルセルロースを分散した培地を使って、スフェロイドにヒドロゲルビーズ、細胞外マトリックスを混入・封入してきた。中空のポンプについても、同様の方法でスフェロイドに内包させることができるだろう。

## 2. 研究の目的

本研究では、ポンプ機能を内包したスフェロイドを作製すること、さらには流れをもつ血管網を張り巡らせたスフェロイドを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

細胞：肝がん細胞株である Hep G2 細胞を用いた。DMEM に 10% のウシ胎仔血清と抗生剤を添加して、一般的な方法で培養を行なった。

アルギン酸ヒドロゲルからなる中空粒子：作製方法は特許申請予定のために省略。

シリコンチューブからなる中空粒子：シリコンチューブは外径 1.5 mm、内径 1.0 mm のものをおよそ 3 mm の長さに切断して用いた。切断面にポリジメチルシロキサン (PDMS) を適量塗布し、60°C でバークして中空状態とした。

PDMS からなる中空粒子：特許申請予定のために省略。

PNIPAm からなる粒子：温度感受性ゲルは *N*-Isopropylacrylamide を主体とした材料によって作製したものを用いた。ゲルは横浜国立大学の丸尾昭二教授・向井理助教より供与を受けた。ゲルを超音波破砕機で粒状化し、直径およそ 1 mm のサイズとした。

スフェロイドの作製およびポンプの埋め込み：3%メチルセルロース培地にポンプ（各種粒子）および細胞を吐出するという方法で、スフェロイドにポンプを埋め込んだ。一つのスフェロイド

あたり、Hep G2 細胞は 500,000~1,000,000 個を使用した。  
 ナノビーズ：直径 1  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズ (Polyscience) を用いた。  
 サーマルサイクラーによる PNIPPAm ゲルの拍動：PNIPPAm ゲルを拍動させるために、スフェロイドを 0.2 ml チューブに入れ、サーマルサイクラーを用いて培養した。37°C と 30°C を 3 分周期で変化させながら 24 時間培養した。  
 DNA 定量：ポンプによる効果を検証するためにスフェロイドから DNA を抽出して、これを計測した。計測は QuantiFluor® dsDNA System (Promega) を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) アルギン酸ハイドロゲルからなる中空粒子について

本研究は中空粒子をポンプとして利用することを目的としている。まず、加工しやすいと考えられたアルギン酸水溶液を用いて中空粒子を作製した(研究の方法参照)。この中空粒子は培地中で 24 時間以上、変化なく維持することが可能であった(図1)。次に先端を閉じたシリンジにこの中空粒子を入れ、ピストンを押し戻したり戻したりすることで、アルギン酸からなる中空粒子が変形することを確認した。しかしながら、このアルギン酸からなる中空粒子は強度が低く、ポンプとして繰り返しの変形を行うには不適切と考えられた。

##### (2) シリコンチューブからなる中空粒子について

実験1では、中空粒子の脆さが問題となった。そこで実験2では、シリコンチューブの両側を PDMS によってシールした中空粒子を作製した(図2)。その素材から、培地中での安定性や圧力に対する耐久性は十分にあると考えられた。浮沈子のような挙動も確認することができ、外部からの圧力によって中空部分の空気が圧縮され、粒子の体積が変化していると考えられた。メチルセルロース培地を用いた方法によって、この中空粒子をスフェロイドの内部に包埋することも可能であった(図3)。その直径はおおよそ 3 mm 程度となった。このポンプ内蔵スフェロイドをシリンジによって加圧したところ、スフェロイドの形状変化を確認することはできなかった。この理由として、スフェロイドの内部でポンプは一定程度収縮しているが、それを取り巻くスフェロイドはポンプに強く接着しているわけではないため、ポンプの動きには追従せずにスフェロイドの形状変化を伴わなかったという可能性が挙げられた。この場合、実際にはスフェロイド内部でポンプが収縮したり戻ったりを繰り返しているため、スフェロイドの内部で何らかの培養液の流れが存在することになる。この可能性を検証するために、直径 100 nm のナノビーズを培地中に混ぜるなどして、ナノビーズの動きとして培地の流れを検出することを試みた。その結果、現時点ではナノビーズの動きが判明しておらず、ポンプの圧力駆動によってスフェロイドの内部に培地の流れが発生している確かな証拠を得られていない。今後、コントロール条件に対して明確なビーズの動き、培地の流れが検出できるよう、引き続き検討を行っていく。

##### (3) PDMS からなる中空粒子について

実験2では中空粒子の安定性は問題がなかったが、シリコンチューブに厚みがあり、体積変化が起こるもののその変化量が少ないという課題が生じた。そこで、PDMS からなる中空粒子を作製した(図4)。中空粒子にシリンジを使って圧力をかけると、中空粒子が大きく変形することが確認できた(図5)。この PDMS 中空粒子をスフェロイドに包埋し、圧力をかけたところ、スフェロイドごと大きく形状が変化する様子が観察された(図6)。現在、この駆動による効果を検証するために、切片や DNA の定量などについて実験を続けている。また、現時点では Hep G2 細胞単独のスフェロイドになっているが、HUVEC を混入させたスフェロイドをポンプ駆動させることで、当初に想定していた血管構造の再構築についても取り組みを開始している。

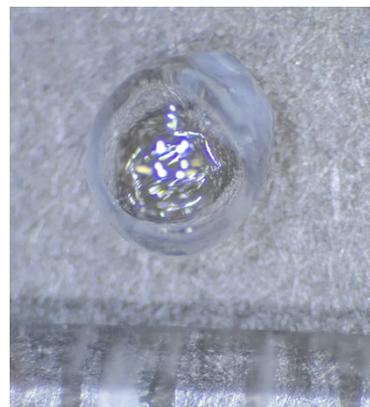


図1 アルギン酸ハイドロゲルからなる中空粒子

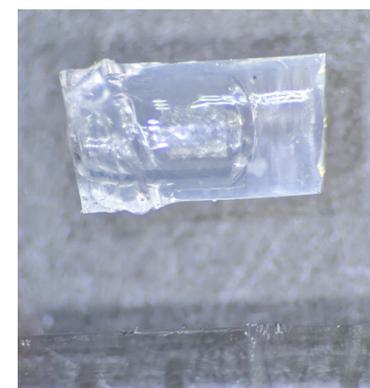


図2 シリコンチューブからなる中空粒子



図3 シリコンチューブからなる中空粒子を埋め込んだスフェロイド

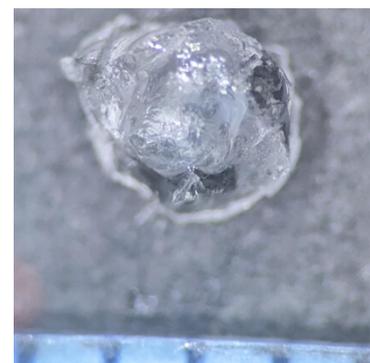


図4 PDMS からなる中空粒子

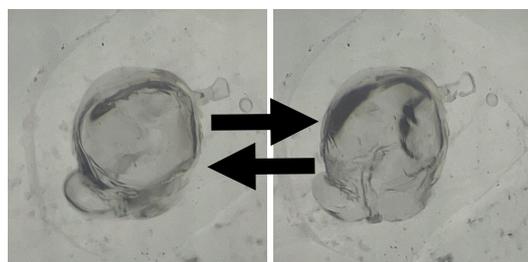


図5 PDMS からなる中空粒子の変形

#### (4) PNIPPAm ゲルからなる粒子ポンプ

本研究は圧力によって非接触的に中空粒子を変形させることで、これをポンプとして利用することを目的としていた。しかしながら、別の手法による非接触的なポンプ駆動を検討することも大きな価値がある。研究開始当初、中空粒子の作製が予定通り進まなかったこともあり、プラン B として温度感受性樹脂を主体とした PNIPPAm ゲルの粒子を、圧力ではなく温度で駆動する研究にも取り組んだ。ゲルは低温側で分子構造が伸び、高温側で分子構造が縮む。いくつかの異なる組成をもつゲルを作製し、PBS 中で 35-37°C において収縮するサンプル 49 を採用した。(図 7、横浜国立大学丸尾教授・向井助教提供)。次にこのゲルを乾燥した後超音波破砕機で粒状化し、温度による形状変化を観察した(図 8)。PNIPPAm ゲルは 37 °C と 30 °C の温度変化で体積が 20.6% 変化した。3 分周期でサーマルサイクラーによる温度変化を繰り返しながら 24 時間培養した後も同様の変化能を示し、劣化等がないことを確認した。この PNIPPAm ゲル粒子をスフェロイドに包埋して、スフェロイドの形状変化を観察した。その結果、温度変化によって、確かにゲル粒子が変化し、スフェロイドもそれに追従して形状変化することが示された(図 9)。また、サーマルサイクラー内で 24 時間培養して、DNA 量を測定した(図 10)。その結果、PNIPPAm ゲル粒子を埋め込んでいないスフェロイドの細胞壊死率は 41.3% であった。PNIPPAm を埋め込んだスフェロイドでは 33.9%、PNIPPAm ゲルを拍動させたスフェロイドでは 14.8% であった。上記の結果は、PNIPPAm ゲルの拍動がスフェロイド内の細胞壊死を抑制している可能性を示している。

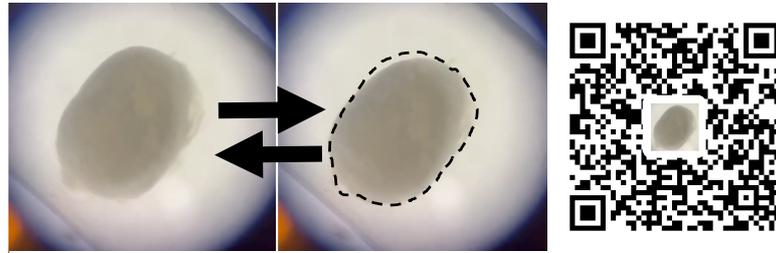


図 6 PDMS からなる中空粒子を埋め込んだスフェロイドの変形 (QR コードに当該スフェロイド等の動画あり)

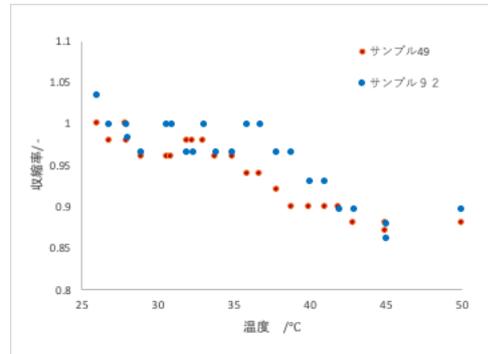


図 7 PNIPPAm ゲルの性状

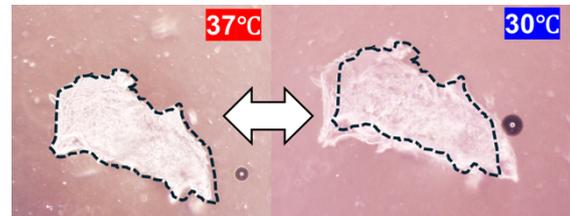


図 8 PNIPPAm ゲル粒子の温度変化による変形

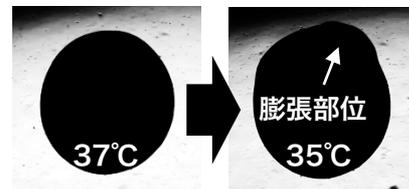


図 9 PNIPPAm ゲル粒子を埋め込んだスフェロイドの温度変化による変形

#### (5) シリンジポンプによる中空粒子駆動システム

中空粒子によるポンプは、電動ポンプに比べて小さくつくれ、防水や配線の問題を解決してくれる。また、複数のポンプを同時に駆動することも可能である。シリンジポンプを利用して図 11 に示すようなシステムを構築した。試運転レベルだが、駆動に向けて実験を続けている。

#### (6) まとめ

本研究では、ポンプ機能を内包したスフェロイドを作製すること、また、そのようなスフェロイドにおける血管網の配備を目標とした。計画の進行という側面では、目的に合致した中空粒子作製に予想よりも多くの試行錯誤が必要となり、血管網の配備まで進むことができなかった。しかしながら、さまざまな中空粒子の特徴を理解しながら、コンセプト通りに動作する圧力駆動型ポンプの作製できたこと、そしてそのスフェロイドへの包埋と駆動までを実現することができたことは、組織工学研究の大きな一歩といえる。プラン B として取り組んだ温度駆動型のポンプについても、一定の成果に繋がった。今後、血管内皮細胞をスフェロイドに添加した条件での血管網付与、そしてそのポンプと血管を備えたスフェロイドの長期培養による、インビトロ臓器の cm サイズへの到達に挑戦していく。

DNA 量変化率 (Hep G2)

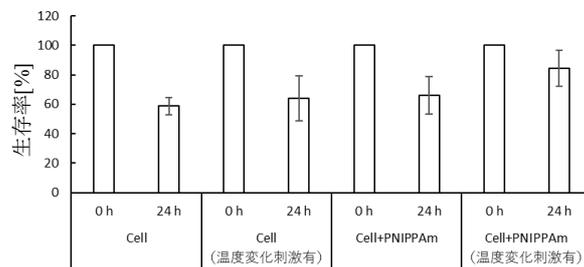


図 10 PNIPPAm ゲル粒子を埋め込んだスフェロイドの DNA 量変化

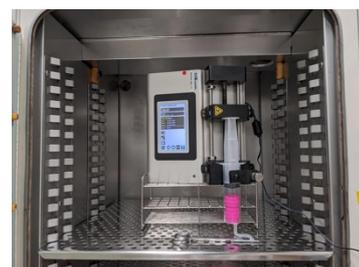


図 11 シリンジポンプを使った中空粒子駆動システム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石丸創一、向井理、丸尾昭二、小島伸彦
2. 発表標題 拍動するハイドロゲルを内部に充填したスフェロイドの開発
3. 学会等名 MPS実用化推進協議会 第1回学術シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石丸創一、向井理、丸尾昭二、小島伸彦
2. 発表標題 拍動するハイドロゲルを用いたスフェロイド培養法の開発
3. 学会等名 デザイン生命工学研究会 第9回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Soichi Ishimaru, Hidekiyo Nakamura, Nobuhiko Kojima
2. 発表標題 Fabrication of a giant spheroid with pumping system
3. 学会等名 7th TERMIS World Congress 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Soichi Ishimaru, Hidekiyo Nakamura, Masaru Mukai, Shoji Maruo, Nobuhiko Kojima
2. 発表標題 Improvement of spheroid culture with "pulsating hydrogel"
3. 学会等名 7th TERMIS World Congress 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石丸創一、中村英聖、向井理、丸尾昭二、小島伸彦
2. 発表標題 拍動するハイドロゲルを内包するスフェロイドの培養法とその効果
3. 学会等名 第19回ナノテク交流シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小島伸彦
2. 発表標題 細胞アッセイの可能性を拓く、ナノ物質と細胞の相互作用支援技術の開発
3. 学会等名 第19回ナノ・バイオメディカル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2024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
---------	---------