

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710142

研究課題名(和文)ボトムアップ的手法による細胞集積型バイオマイクロデバイスの構築

研究課題名(英文)Fabrication of cell-based bio-microdevice by bottom-up approach

研究代表者

小島 伸彦(Kojima, Nobuhiko)

横浜市立大学・総合科学部・准教授

研究者番号：90342956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞を基本構成材料とした3次元的な「バイオマイクロデバイス」構築のために、組織構造の制御方法確立やそのメカニズム解明を目標とした。

組織構造の制御方法について、肝細胞とハイドロゲルビーズを用いて、微小流路構造をもつ細胞凝集体を構築できた。次に膵、膵細胞からなる疑似膵島を作製し、そのと の比率によってグルコース応答性のインスリン分泌活性が変化することを明らかとした。また、膵細胞と膵細胞による自己組織化的なマントルーコア構造形成に糖鎖が関与することも分かった。

本研究を通して、「細胞配列制御による膵島の高機能化」という、社会的に重要なテーマへと展開できた意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish the methods for fabrication of three-dimensional "bio-microdevice" that is mainly comprised of single cells. In addition, we tried to reveal the mechanisms of self-organization occurring in the process of the fabrication of bio-microdevices.

We found that aggregation and cultivation of hepatic cells and hydrogel beads resulted in the formation of network-like microvessels in the hepatic spheroids. We also established a method for fabrication of the pseudo-islet using pancreatic alpha and beta cells. The pseudo-islet acquired not only higher insulin production rate in a specific alpha/beta ratio but also the real islet-like structure. Moreover, it was revealed that sugar chains were involved in the cell-rearrangement.

These results indicate that development of the processes and understanding of the mechanisms to fabricate "bio-microdevice" lead to innovative product like the pseudo-islet.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：バイオマイクロデバイス 自己組織化 膵島 微小流路 ハイドロゲルビーズ

1. 研究開始当初の背景

細胞は隣接する同種あるいは異種の細胞と相互作用しながら、いわゆる「社会」を形成している。この細胞社会には「秩序」を保つためのルールが存在し、細胞の空間的位置決めは、このルールに従って決定されている。すなわち、細胞と細胞とが接触すると、一定のルールに基づいて細胞の挙動が決定される。多細胞生物は、この局所的な振る舞いを積み重ねることで、高度な秩序を生み出している。

細胞をその基本構成材料とするマイクロデバイス(バイオマイクロデバイス)の構築は、近い将来必ず実現すると考えられる。なぜなら、細胞培養技術の発展により、iPS細胞などの幹細胞を含めた様々な細胞の培養が可能となっており、これを高次構造化させることができれば、様々な生物学的現象を再現できるからである。例えば疾患状態を作り出すことができれば、治療方法や治療薬の探索を行うことができる。

生体の機能を再現するためには、その構造を模倣する必要がある。しかし、例えば血管構造を再現したいとき、血管内皮細胞を意図するパターンに配列させても、培養を行うとその並びは変化してしまう。これは、先ほど述べたような細胞社会のルールを考慮に入れていないためである。細胞を使って組織や臓器の機能の一部を備えたバイオマイクロデバイスを作り上げるためには、細胞の自律的な移動、すなわち動的な自己組織化を理解し利用する必要がある。

Fotyらは2種類の細胞を均一な状態で混ぜ合わせて球状の組織を作ると、始めはランダムに存在していた2種類の細胞が徐々に移動を始め、最終的には中心部に集まる細胞と、その外側を覆う細胞とに分かれると報告した[Foty et al., *Development*, 122, 1611-1620 (1996)]。これは細胞が物理的・化学的に周囲の環境を認識して行動する自己組織化現象の一例を示している。しかしながら、上記の手法では細胞接着を細胞自身の接着能力にゆだねているため、極端に凝集しにくい細胞を使用することができないという制限があった。

研究代表者はこのような問題を解決するため、細胞の表面に「接着剤」に相当する生体分子の導入処理を施し、細胞の凝集能力に関係なく数分で凝集させる技術を開発した[Kojima et al., *Biomaterials*, 32, 6059-6067 (2011)]。この技術は細胞毒性がほとんどみられず[Kojima et al., *Biomaterials*, 27, 4904-4910 (2006)]、細胞同士を瞬時に連結できるものである[Kojima et al., *J. Robot. Mechatron.*, 22, 619-622 (2010)]。また、その接着効果は一時的であり、「細胞を仮止めできる瞬間接着剤」といえる。一旦形成された凝集体はそれ以降はバラバラになることなく、接着剤による仮止め効果がなくなっても、自身で作った接着装置群を利用し

て形態を維持できた。上皮細胞株(Hep G2)と血管内皮細胞株(MS1)を用いてヘテロな凝集体を形成すると、およそ5時間後から凝集体内で細胞が移動を開始し、24時間後までにネットワーク状の構造を獲得した。さらに培養を7日間続けると、血管様の特徴ある構造に成長した[前出 Kojima et al., *Biomaterials*, (2011)]。

このような動的な自己組織化を制御することができれば、バイオマイクロデバイスを作り出すための有効な技術となると考え、研究の実施に必要な研究費の申請に至った。

2. 研究の目的

細胞を構成材料としたマイクロデバイスを設計・作製するためには、シリコンやガラスを用いた場合のようなトップダウンの手法ではなく、細胞間相互作用によるボトムアップ的な手法が必須となる。本研究では、細胞の動的な自己組織化現象を利用して、生物学的な階層構造をもつ「バイオマイクロデバイス」を構築・制御する手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は2年間で実施し、以下の2つの計画に取り組むこととした。

計画1：メチルセルロース培地の利用による細胞組織の自己組織化とその制御

本計画では、新たに開発したメチルセルロースを用いた迅速細胞凝集法を用いた。この方法の特徴は、細胞の表面修飾や、磁性体の取り込みなどの細胞に対する処理を一切必要としないことである。また、直径が100 nm~100 μmと非常に幅広いサイズの粒子を凝集させることができる。細胞凝集にアルギン酸ゲルビーズを用いれば、マルチコア-シェルのコアの部分に位置するゲルを溶かして中空化し、組織化に影響を与えることが可能であると想定された。また、従来Hep G2細胞とMS1細胞との組み合わせだけでなく、膵αおよびβ細胞由来の細胞株による自己組織化的な細胞再配列について特に検討を行うことを計画した。

計画2：自己組織化に関与するメカニズムを分子レベルで検証

自己組織化を制御するためには、そのメカニズムを解明する必要がある。我々は、共焦点顕微鏡観察などで手間のかかる三次元培養システムを改良し、自己組織化における細胞移動を簡単に観察できる自己組織化簡易評価システムを開発した。このシステムは96ウェルプレートフォーマットと電動ステージ蛍光顕微鏡とを組み合わせたもので、多数のサンプルを効率良く観察できる。

すでにいくつかの培養条件や阻害剤を検討し、現時点で自己組織化に関与している要素は、「血清」、「PI3Kシグナル経路」、「アクチン重合」、「チューブリン重合」となる。こ

れらに関与する分子群の探索を検討する。さらには、細胞表面のたんぱく質間における認識に重要な役割を果たすと考えられる「糖鎖」についても、自己組織化現象への関与を調べることを計画した。

4. 研究成果

計画1「マルチコア-シェル構造の利用による自己組織化の制御」について

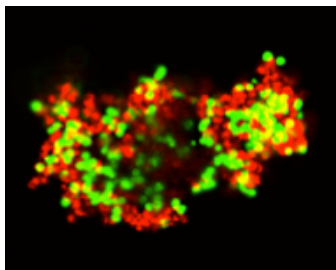


図1 アルギン酸ゲルビーズ(緑)とHep G2細胞(赤)からなるハイブリッド凝集体。メチルセルロース培地に吐出して10分後の様子。

インクジェットノズルシステムを購入して細胞と同程度のアルギン酸水素ゲルビーズを作製した。このゲルビーズとHep G2細胞とを1対1の比率で混合し、メチルセルロース培地に吐出するという方法で、水素ゲルビーズと細胞とからなるハイブリッドな凝集体を作製した(図1)。その結果、凝集体内部にネットワーク上の「流路」を形成することに成功した(図2)。ゲルビーズは分画分子量が大きいので、ゲルビーズが存在したままでも凝集体内部への物質交換が改善されるが、酵素によりゲルビーズを除去することで、直径1 μm の蛍光ビーズが凝集体の深部にまで到達できることも明らかとなった。また、物質交換の改善については、遺伝子発現や代謝機能の改善により確認することが可能であった。

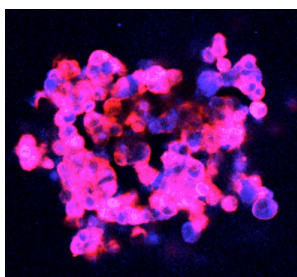


図2 内部に微小流路構造を備えた凝集体。図1のようにハイブリッド凝集体を作成した後、培養して細胞同士を自己組織化させた。この図ではビーズは無色で見えないが、微小流路部分に詰まっている。

異なる細胞からなるヘテロ凝集体における自己組織化現象について、種々の異種細胞の組み合わせを試した結果、膵 α 細胞株(α -TC1.6)と膵 β 細胞株(MIN6m9)を用いたときに、マウスの膵島の構造、すなわち β 細胞

をコアとして α 細胞が単層のシェル構造を自発的に形成することを見出した(図3)。グルコース応答性のインスリン分泌能を測定したところ、 β 細胞に対して特定の比率の α 細胞が存在するときに、インスリン分泌能が高まることが判明した。このようないわゆる疑似膵島について、凝集体サイズの検討や上記の水素ゲルビーズの埋め込みによる構造の制御によって、2000個の β 細胞のみからなる一般的な疑似膵島を基準としたときに対して、40倍を超えるインスリン分泌能を備えた高機能化疑似膵島を作製することができた。

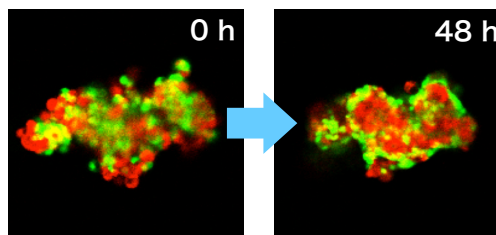


図3 膵 α 細胞と膵 β 細胞の3次元環境化における自己組織化現象。自発的に α 細胞が β 細胞の外側に移動する。

計画2「自己組織化に関与するメカニズムを分子レベルで検証」について

まず、RhoやRacの野生型、構成的活性型あるいは優性阻害型の遺伝子の準備と、細胞への導入条件等を検討し、これらの変異型分子の影響を調べたが、明確な実験結果を得ることができなかった。続いて細胞表面の糖鎖に結合するレクチンによるスクリーニングを開始したところ、一部のレクチンが自己組織化に影響を与えることが判明した。現時点で、自己組織化的な細胞配列パターン形成は、細胞の運動能(アクチンや微小管の重合)が特に大きく寄与しており、E-カドヘリンやRho-ROCKなどは関与が認められていない。すなわち、細胞間接着が形成される前に、細胞間認識とそれとともなう細胞移動が存在すると考えられる。このような概念は細胞を工学的に取り扱うバイオマイクロデバイスの分野で非常に重要であるとともに、発生生物学における細胞の移動においても重要な知見である。

まとめ

以上の結果をまとめると、本研究においては、水素ゲルビーズの混ぜ込みや、膵 α 、 β 細胞によるパターン形成など、細胞凝集体の内部構造や細胞配列パターンを制御できることを示すことができた。加えて、細胞間認識に細胞表面の糖鎖が関与している強い証拠を得ることもできた。このような成果は、本研究の課題名にもあるような「細胞集積型のバイオマイクロデバイス」をボトムアップ的に構築することに関するモデルや原理を示すものとなった。特に、疑似的な膵島については、将来的にiPS細胞などからインスリ

ン分泌細胞を誘導できた際、より少ない細胞でより高いインスリン分泌能を有する膵島、すなわち「ハイパー膵島」をつくることであれば、コスト削減など、糖尿病治療に貢献できる。このようにバイオマイクロデバイス開発の具体的な目標を設定できたことも、評価できると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Kojima, N. In vitro reconstitution of pancreatic islets. *Organogenesis*, Accepted. 査読有

DOI: 10.4161/org.28351

② Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Engineering of Pseudoislets: Effect on Insulin Secretion Activity by Cell Number, Cell Population, and Microchannel Networks. *Transplant. Proc.*, **46**, 1161-1165 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.11.147

③ Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Fabrication of microchannel networks in multicellular spheroids. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **198**, 249-254 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.snb.2014.02.099

④ Katsuda, T., Kojima, N., Ochiya, T. and Sakai, Y. Biliary epithelial cells play an essential role in the reconstruction of hepatic tissue with a functional bile ductular network. *Tissue Eng.*, **19**, 2402-2411 (2013). 査読有

DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0021

⑤ Kojima, N. and Sakai, Y. Control of liver tissue reconstitution in mesenteric leaves: the effect of preculture on mouse hepatic progenitor cells prior to transplantation. *J. Robot. Mechatron.*, **25**, 698-704 (2013). 査読有

<http://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mode=present&inputfile=ROBOT002500040016.xml>

⑥ 小島伸彦, 尾方優花, 中岡慎治, 酒井康行. 異種細胞集団による自己組織化現象の数理モデル化. *生産研究*, **65**, 83-88, (2013). 査読無

DOI: 10.11188/seisankenkyu.65.337

⑦ Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Rapid aggregation of heterogeneous cells and multiple-sized microspheres in methylcellulose medium. *Biomaterials*, **33**,

4508-4514 (2012). 査読有

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.065

[学会発表] (計 19 件)

① Motoyama, W., Aoki, S. and Kojima, N., Protection from Cell Death in Multicellular Spheroids. *9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*. Hotel Hilton Prague, Prague, Czech Republic. August 24-28 2014 (Oral presentation)

② 本山和加子, 青木茂久, 小島伸彦 上皮細胞に適した3次元スフェロイド培養法の開発, 第21回肝細胞研究会(東京医科歯科大学M&Dタワー), 2014年6月27-28日(ポスターセッション)

③ Kojima, N., Functional Enhancement of Multicellular Spheroid by Microchannel Fabrication. *TERMIS EU 2014 Chapter Meeting*. Magazzini del Cotone Conference Center, Genova, Italy. June 10-13 2014 (Oral presentation)

④ 小島伸彦 内部構造の制御による肝および膵島様スフェロイドの高機能化, 日本組織培養学会第87回大会(東京都千代田区・星陵会館), 2014年5月29日

⑤ 小島伸彦 微小環境を再現したミニチュア臓器作製の取り組み, 創薬・探索研究所セミナー(大阪府豊中市・塩野義製薬株式会社・社医薬研究センター), 2014年4月23日

⑥ 小島伸彦 ミニチュア臓器の作製: 微小環境の再現を目指す, 表面、材料に関する生物化学工学シンポジウム(神奈川県横浜市・横浜国立大学・化工安工棟), 2014年3月28日

⑦ 小島伸彦 In vitroにおける膵島様組織の再構築(Engineering of islet-reconstitution in vitro), 第36回日本分子生物学会年会(神戸ポートアイランド), 2013年12月3-6日(ポスターセッション)

⑧ 小島伸彦 微小流路の構築による肝細胞および膵β細胞凝集体の高機能化, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来(東京大学生産技術研究所コンベンションホール), 2013年11月25日(ポスターセッション)

⑨ 小島伸彦 微小流路の構築による肝および膵島様凝集体の高機能化, 第1回細胞凝集研究会(ヒルトン福岡シーホーク), 2013年11月8日(シンポジウム)

⑩ Kojima, N., Ogata, Y., Nakaoka, S. and Sakai, Y. Mathematical modeling for the self-organization of cells. *μTAS 2013*. Messe Freiburg, Freiburg, Germany. October 27-31 2013 (Poster presentation)

⑪ Kojima, N. Fabrication of microchannel network in multicellular spheroids by embedding hydrogel beads. *World Congress on Regenerative Medicine*. Messe Leipzig, Leipzig, Germany. October 23-25 2013 (Oral presentation)

⑫ 小島伸彦, 尾方優花, 中岡慎治, 酒井康行 Mathematical Modeling to Simulate Cell Migration and Adhesion *In Silico*, 第20回肝細胞研究会(大阪国際会議場), 2013年9月26-27日(一般口演)

⑬ Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Engineering of islets to achieve higher insulin secretion rate. *CAST 2013*. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. September 2-6 2013 (Oral presentation)

⑭ 小島伸彦, 竹内昌治, 酒井康行 細胞の自己組織化現象を利用した膵島様組織の構築法, 第12回日本再生医療学会総会(パシフィコ横浜), 2013年3月21-23日(一般口演)

⑮ 小島伸彦, 竹内昌治, 酒井康行 細胞社会における細胞の振る舞いを評価するための新規細胞凝集法 (Establishment of rapid cell aggregation method to study cell behavior in cellular society), 第35回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡), 2012年12月11-14日(ワークショップ・ポスターセッション)

⑯ Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. Fabrication of microchannel network in liver tissue spheroids. *μTAS 2012*. Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan. October 28-November 1 2012 (Poster presentation)

⑰ Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y. A method for multicellular spheroid engineering. *3rd TERMIS World Congress 2012*. Hofburg Congress Center, Vienna, Austria. September 5-8 2012 (Poster presentation)

⑱ 小島伸彦, 竹内昌治, 酒井康行 構造的微小環境を有する肝細胞スフェロイドの作製法, 第19回肝細胞研究会(札幌医科大学), 2012年6月29-30日(シンポジウム)

⑲ 小島伸彦, 竹内昌治, 酒井康行 シヌノイド様構造を有する肝細胞スフェロイドの構築, 第11回日本再生医療学会総会(パシフィコ横浜), 2012年6月12-14日(一般口演)

[図書] (計 1件)

① Sakai, Y., Jiang, J., Hanada, S., Huang, H., Katsuda, T., Kojima, N., Teratani, T. and Ochiya, T. Three-dimensional culture of fetal mouse, rat and porcine hepatocytes. in *“Human Fetal Tissue Transplantation”*, ed. by N. Bhattacharya and P. Stubblefield, Springer-Verlag UK, pp.47-63 (2013).

DOI: 10.1007/978-1-4471-4171-6_4

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

受賞

① 小島伸彦, 第4回BEANS総合研究会, 最優秀発表賞, MEMSと肝臓, 2012年5月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 伸彦 (KOJIMA, Nobuhiko)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号: 90342956