

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882012

研究課題名(和文) 滲流可能な血管様構造を有する3次元細胞組織の構築

研究課題名(英文) Construction of three dimensional tissue with vessel-like structures

研究代表者

平山 佳代子(Hirayama, Kayoko)

東京大学・情報理工学(系)研究科・特任研究員

研究者番号：60710564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、バクテリアが生産するバクテリアセルロースから成る微小径ファイバを作製し、精製したファイバを哺乳類細胞の足場として用いることで血管様構造を作製し、還流可能な3次元細胞組織を構築することを目指した。研究期間内に、バクテリアセルロース微小径ファイバを用いた細胞塊の作製方法を確立し、さらに、異種細胞からなる階層構造を持った細胞組織を実現した。また、細胞組織構築後にセルロース微小径ファイバを分解するのに適した酵素を見出した。さらに、養分拡散モデルを構築し、作製した細胞塊が壊死なく培養できる期間を計算できるシステムを作った。

研究成果の概要(英文)：I fabricated microfiber, which served as a scaffold for mammalian cells. The microfibers were consists of nanofibrous cellulose secreted by bacteria (bacterial cellulose). The aim of this study is to fabricate vessel-like structure by culturing cells on the microfibers and three-dimensional cellular constructs. I achieved fabrication of three-dimensional cellular constructs which had heterocellular hierarchic structure. I also found an enzyme suitable for degrading the bacterial cellulose fibers after the fabrication of cellular construct. Furthermore, the nutrition diffusion model was fabricated to calculate the maximum culturable time of the cellular constructs without necrosis.

研究分野：BioMEMS

キーワード：再生医療 医用材料 バクテリアセルロース

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療や創薬開発への応用を目指した細胞組織を生体外で作製する方法は、数多く提唱されている。しかし、臓器類に見られるような高細胞密度で階層構造を持ったミリメートルサイズの細胞組織を生体外で作製して維持することは達成できていない。なぜなら、高密度な細胞組織の維持に必須である養分/酸素供給路を導入することが困難であるためである。高密度な細胞組織内における養分および酸素の拡散は 200 μm 程度に留まるため、厚みを持った細胞組織を維持する場合は養分/酸素を供給するシステムが必須となる。灌流可能な血管様構造を持つ細胞組織作製方法はいくつか提唱されているが、管腔構造を維持するためにハイドロゲルを用いるため高細胞密度は達成できず (Miller et al., Nat. Mater., 2012)、マウスから摘出した血管を用いる (Sekine et al., Nat. Commun., 2012) など、生体外にて灌流可能な血管様構造を構築し、細胞密度が高い細胞組織に導入する方法は組織工学において極めて困難な課題であり、未だに実現されていなかった。

本研究では、バクテリアセルロースという材料に着目し、これを微小径ファイバ状に成形して、細胞の足場として用いることを提案する。さらに、細胞により被覆された微小径ファイバを折りたたむことで、高い細胞密度を持つ細胞塊を作製する。

### 2. 研究の目的

細胞密度の高い細胞組織内に、生体外で灌流可能な血管様構造を作製することは未だに達成されていない。本研究課題では、バクテリアセルロース微小径ファイバを作製して用いることで、灌流可能な血管様構造を有する細胞組織を作製することを試みる。

### 3. 研究の方法

#### ① 階層構造の作製

血管は、血管内皮細胞や平滑筋細胞が同心円状に階層構造を形成しており、この階層構造が血管としての機能に不可欠である。そこで、本研究ではバクテリアセルロース微小径ファイバを異種細胞で段階的に被覆することで、階層構造の実現を試みる (図 2)。

研究代表者は、同軸二重層流微小流路を用いたバクテリアセルロース微小径ファイバの作製方法を確立しており(図 1)、これを用いた細胞密度の高い細胞塊作製 ( $1.1 \times 10^9$  cells/cm<sup>3</sup>) にも成功している。そこで、今回は階層構造の実現に向けて、各細胞播種時の濃度、2 種類目の細胞を播種するまでの培養時間、異種細胞の組み合わせなどを検討する。ファイバから同心円状に階層構造が形成させた後、これを折り畳むことで階層構造を有する細胞組織を作製し、階層構造の解析は細胞組織切片を免疫染色することで行う。

#### ②バクテリアセルロース微小径ファイバ分



図 1 作製したバクテリアセルロース微小径ファイバの顕微鏡写真

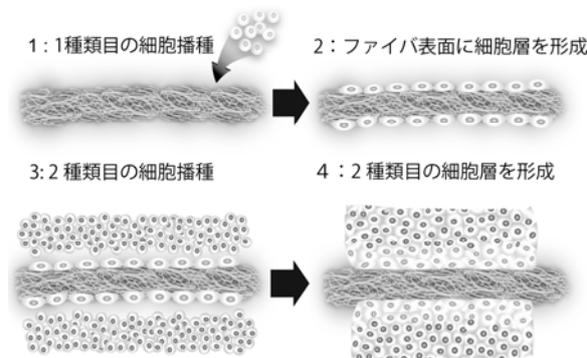


図 2 異種細胞からなる階層構造の作製方法

#### 解に伴う灌流方法の検討

細胞組織内に組み込まれたバクテリアセルロース微小径ファイバは養分供給路としてだけでなく、供給路としての構造を維持する支持体としての役割を担っていると考えられる。したがって、分解酵素によるバクテリアセルロースの分解によって微小径ファイバの強度が減少し、供給路の構造が保てず、結果として管腔構造を形成することができないことが予想される。この問題を解決するためには、セルロース分解がある程度進んだ時点で、それを補完するために灌流を開始する必要がある。灌流を行えば、流圧によって供給路構造を維持できると考えられる。そこで、微小径ファイバ分解時の送液方法や流速条件を検討し、セルロース分解から灌流開始への移行をスムーズに行うためのセットアップを開発する必要がある。これは、申請者の微小流路作製技術を応用することで解決できると考えている。以上の方法により、細胞組織内に組み込まれたバクテリアセルロース微小径ファイバを分解して灌流する方法の開発を目指す。

### 4. 研究成果

1) 本研究では、バクテリアセルロース微小径ファイバ分解までの間、これが養分供給路として機能する。そのため、この微小径ファイバが受動的な養分供給路としてどの程度機能しうるのかを評価するために、養分拡散

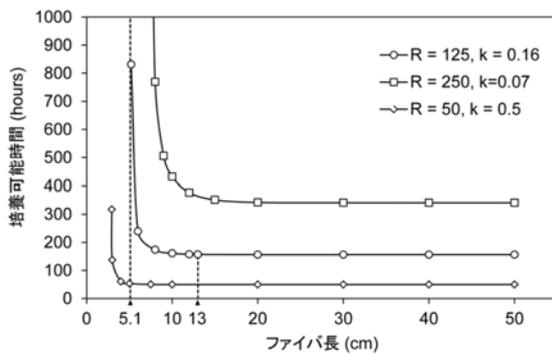


図3 養分拡散モデルから導出した、ファイバ長に対する最大の培養可能時間。培養可能時間は壊死なく細胞塊を培養できる時間とした。(R:ファイバ半径、k:細胞あたりの養分消費速度)

のモデルを構築し、評価した。養分拡散モデル構築のために、まず、バクテリアセルロース微小径ファイバ内での物質の拡散速度を Fluorescence Recovery after Photobleaching 解析 (蛍光の退色からの回復を解析する方法) により求めた。その結果、本研究で作製したバクテリアセルロース微小径ファイバ内では、養分の拡散が水中とほぼ同様に起きることが示唆された。このように、実験的に求めた値と文献値を利用して、拡散の一次方程式に基づき、養分拡散モデルを構築し、作製した細胞塊が壊死なく培養できる最大の時間を導出した。本研究のこのモ

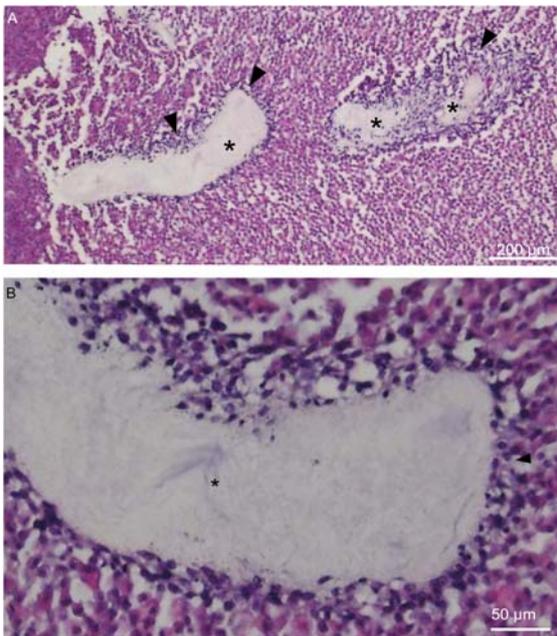


図4 バクテリアセルロース微小径ファイバ表面に平滑筋細胞を培養し、その周囲に繊維芽細胞の細胞組織の切片画像。組織切片のヘマトキシリン-エオシン染色から3次元細胞組織内で階層構造が形成されていることが示唆された。アスタリスクマーク(\*) : バクテリアセルロース微小径ファイバ、黒矢印▲ : 平滑筋細胞であると考えられる部位

デルは、本研究以外の細胞組織構築法にも応用可能である。

2) 段階的に異なる種類の細胞を播種することで、バクテリアセルロース微小径ファイバ周囲に階層的に異種細胞層 (平滑筋細胞/繊維芽細胞) を形成することに成功した。さらにこれを立体的折りたたむことで、養分供給路としてのバクテリアセルロース微小径ファイバの周囲に異種細胞層を持つ細胞塊を形成した (図3)。

3) 本研究課題に置いては細胞培養条件下で、細胞に害なくセルロースを分解することが必須となる。これにはセルロースを特異的に分解する酵素であるセルラーゼを用いることが最適であると考えられる。しかし、セルラーゼには多様な種類が存在し、セルラーゼの種類によっては細胞死が誘発されるのが観察された。そこで、各メーカーからセルラーゼを取り寄せ、細胞死の有無を観察した結果、細胞死を誘導しないセルラーゼを発見した。現在、このセルラーゼを利用した管腔構造作製方法を検討している。

4) あらかじめ研究計画に含まれていなかった成果として、バクテリアセルロース膜のマイクロ加工技術の開発があげられる。本研究では、有機材料であるバクテリアセルロースを基板に固定し、フォトリソグラフィの技術を応用することにより、バクテリアセルロース膜のマイクロパターンを形成する手法を構築した。本研究で開発した手法は、バクテリアセルロース以外の有機材料にも適用可能であり、有機材料の活用の幅を広げるものであるといえる。

さらに、バクテリアセルロース膜部位以外に細胞非接着表面処理をすることで、マイクロパターンされたバクテリアセルロース膜上にのみ細胞が接着して増殖するのが観察された。したがって、バクテリアセルロース

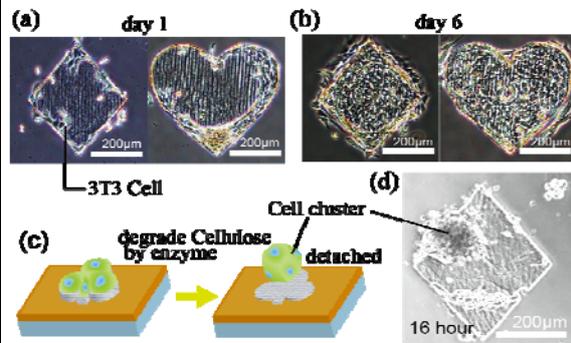


図5 バクテリアセルロース膜マイクロパターンに細胞を播種して1日後(a)、6日後の様子。(c)(d) バクテリアセルロース膜を細胞が被覆した後にセルロース分解酵素でセルロースを分解したときの様子。セルロース分解酵素添加後16時間後に細胞塊が形成された。

膜のマイクロパターンニングにより、細胞接着領域をパターンニングすることができる。さらに、これをセルロース分解酵素で分解したところ、セルロースが得意的に分解され、接着していた細胞が細胞塊としてリリースされるのが確認された。この方法を応用すれば、大きさを調節した細胞塊を任意の場所、タイミングで、数を調整して作製することができるため、新たな細胞組織形成法としての応用も期待できる。なお、哺乳類細胞は、セルロースを分解することも分泌することもしないため、セルロースを分解しても構築した細胞組織に影響は少ないと考えられる。また、分解産物もグルコースやセロビオースといったオリゴ糖であり、細胞には無害であると考えられる。

#### 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1件)

Kayoko Hirayama, Teru Okitsu, Hiroki Teramae, Daisuke Kiriya, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, "Cellular Building Unit Integrated with Microstrand-shaped Bacterial Cellulose", *Biomaterials*, Volume: 34, pp 2421-2427, 2013, 査読有

〔学会発表〕(計2件)

国際学会 査読有

1) Yuya Karita, Kayoko Hirayama, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, "Micropatterning of Bacterial Cellulose as Degradable Substrate for Cell Culture", *The 27th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2014)*, pp.518-519, San Francisco, USA, Jan. 26-30, 2014.

2) Kayoko Hirayama, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, "Diffusion of Nutrition in Macroscopic Tissue", *The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014)*, pp.781-783, San Antonio, USA, Oct. 26-30, 2014

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：多孔性バクテリアセルロースファイバー及びその製造方法

発明者：竹内昌治、尾上弘晃、桐谷乃輔、平山佳代子

権利者：東京大学

種類：特開

番号：P2013-74863A

出願年月日：平成23年9月30日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山佳代子 (HIRAYAMA, Kayoko)

東京大学 情報理工学(系)研究科

特任研究員

研究者番号：60710564

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし