

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870137

研究課題名(和文) 本格的再生医療への応用を目指した自発的還流機能を有する3次元マクロ組織の作製

研究課題名(英文) Fabrication of 3D perfusable macroscopic tissue with hierarchical structures

## 研究代表者

岩永 進太郎 (Iwanaga, Shintaroh)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：70587972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、灌流可能な3次元マクロ組織の作製を目指して研究を行った。まずはマイクロ流体デバイスを用い、細胞からひも状の組織(細胞ファイバ)を構築した。様々な細胞から細胞ファイバを作製し、直径500ミクロンのアルギン酸ハイドロゲルファイバの周りに細胞ファイバを多層に巻き付けることで、高速に階層化組織を構築可能であった。組織構築後、支持体であるアルギン酸ファイバを酵素で分解したところ、内腔を有する管腔組織を構築でき、ペリスタポンプで培養液を灌流可能であった。肝がん細胞と線維芽細胞を階層化した組織構造では肝がん細胞単独から作製した構造体と比べてアルブミン生産能が有意に上昇していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In this research, fabrication technique of three-dimensional perfusable macroscopic tissues using cell fibers was described. Various cells were able to be encapsulated in the fiber-shaped hydrogel, namely a cell fiber, using microfluidic device. It was succeeded to rapidly create hierarchical tissues using a method to reel cell fibers around degradable hydrogel supports. After the creation of hierarchical tissues, decomposition and removal of hydrogel support using with enzyme enable to fabricate luminal tissue structures that was able to be perfused with culture medium using a peristaltic pump. Comparing hierarchical tissue of hepatoma and fibroblast with monolayer tissue of hepatoma, it was observed that the rate of albumin secretion of a hierarchical tissue was higher than that of a monolayer tissue. We have prepared to submit the paper about this research.

研究分野：組織工学、再生医療、バイオマテリアル

キーワード：3次元組織構築 組織工学 バイオマテリアル マイクロ流体デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ流体デバイスを利用することで、細胞をコラーゲンなどの ECM に懸濁した状態でひも状に加工し培養することに成功していた（細胞ファイバ）。この細胞ファイバはシェル部分にアルギン酸ゲルの被膜を有し、コア部分に細胞を配置させることで、培養液が十分内部に浸透しながら、ピンセットなどでハンドリングすることも可能な強度を有している。この細胞ファイバを用いて、ファイバを織る・巻きつけるなどの方法でさまざまな形状の 3 次元組織の構築を行うことが可能である。しかしながら、アルギン酸はもともと生体内に存在するものではないため、3 次元組織を作製してもアルギン酸が残存してしまう問題があった。そこで細胞ファイバからアルギン酸を除去した状態で 3 次元組織の作製が可能になれば、より生体に近い立体組織の作製に有効であり、組織工学の更なる発展に寄与することが期待される。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞の登場により、組織や臓器の作製において患者本人の細胞を用いたり、拒絶反応の少ない細胞を選択して利用することが可能になり、細胞ソースに対する問題に大きな光明を得た。また、近年、組織工学の中でも、細胞をスフェロイドやマイクロサイズのハイドロゲルなどと組み合わせた細胞集塊として培養し、これらをより大きな構造体を作製するためのビルディングブロックとみなし、組み合わせることでマクロサイズの組織を構築するボトムアップ組織工学が注目を集めている。これにより、生体へ適応可能な組織や臓器の作製の研究が盛んにおこなわれている。しかしながら、依然として有用なマクロサイズの組織や臓器の作製は困難な現状である。その理由の一つとしてマク

ロサイズ組織への培養液の輸送の問題があげられる。

そこで本研究では、細胞をひも状に加工した細胞ファイバをビルディングブロックとし、この細胞ファイバをハイドロゲル支持体に巻きつけて管状の組織を作ることで、灌流可能な構造を有する 3 次元組織を作製することに着目した。しかしながら、細胞ファイバを作製する際に必要となるシェル部分のアルギン酸は、本来生体内には存在しないものであるため、このアルギン酸を除去した状態の細胞ファイバを利用して 3 次元組織の再構築を試みた。

## 3. 研究の方法

これまで当研究室で作製されている細胞ファイバをもとに、犠牲層となるハイドロゲル支持体へ細胞ファイバを巻きつけることで 3 次元組織構造の作製を行った。

### (1) 細胞ファイバの作製および培養

細胞ファイバ内に封入する細胞として、マウス線維芽細胞 (3T3)、ヒト不死化線維芽細胞 (OUMS-36T-1)、ヒト肝がん由来細胞 (HepG2)、ヒト初代筋芽細胞 (hSMC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いた。氷上で中性化した I 型コラーゲンないしは Matrigel に各細胞を  $1 \times 10^8$  cells/mL となるように懸濁した。HepG2 細胞に関しては、HepG2 と hMSC の細胞数がそれぞれ 10:0, 9:1, 8:2, 7:3 となるように懸濁混合した。それとは別に、アルギン酸ナトリウムを生理食塩水に 1.5 wt% になるように溶解し、 $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターを通してろ過滅菌した。また、シース溶液として 100 mM の塩化カルシウム溶液を用意し、オートクレーブにて滅菌した。これらをマイクロ流体デバイスへ流し、アルギン酸によって被覆された細胞ファイバを得た。作製した細胞ファイバはそれぞ

れの細胞に適した培養液へ浸し、37°C / 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。

#### (2) ゴルゲル転移により中空状になるハイドロゲル支持体の作製

細胞ファイバを巻きつける支持体として、温度によって内部に腔を作製可能なハイドロゲル支持体を作製した。溶液として、1.5 wt% アルギン酸(生理食塩水)、10 wt% メビオールジェル(生理食塩水)、100 mM 塩化カルシウム溶液をそれぞれ用意した。各溶液を滅菌後、細胞ファイバと同じマイクロ流体デバイスを用いて、コアに温度応答性を有するメビオールゲル、シェルにアルギン酸ゲルを有するハイドロゲル支持体を作製した。作製したハイドロゲル支持体は 100 mM 塩化カルシウム溶液に浸し、37°C に置くことでコアを速やかにゲル化させ、使用するまでその状態で保管した。

#### (3) アルギン酸ゲルを除去した細胞ファイバの作製およびファイバ形状の観察

細胞ファイバを作製後、培養 0 時間(作製直後)~48 時間後に、50 mM の EDTA を含む DMEM を用いてアルギン酸ゲルを除去した細胞ファイバを作製した。アルギン酸を除去した後、各細胞ファイバを培養液内でピンセットを用いてハンドリング可能か観察した。

#### (4) 灌流可能な 3 次元組織の作製

ハイドロゲル支持体を EDTA を含まない DMEM に浸し、アルギン酸シェルを除去した細胞ファイバをピンセットを用いてハイドロゲル支持体の周りに巻きつけた。細胞ファイバを 5~7 巻きした後に、ハイドロゲル支持体ごと培養液から取り出し、空気中に 5 秒ほど曝すことで細胞ファイバをハイドロゲル支持体に密着させた。さらに、第 1 層を巻きつけた後に別の細胞ファイバを巻きつけることで、2 層に階層化した 3 次元組織を作製した。また、1 層巻きつけ

た組織を 2 個用意し、それらを同時に別の細胞ファイバで巻きつけることによって、複数の階層化した 3 次元組織を一度に作製した。

#### (5) 作製した 3 次元組織の機能解析

HepG2 で作製した細胞ファイバを用い、3 次元組織を作製した。HepG2 細胞ファイバは HepG2:hMSC=8:2 で作製し、2 種類の 3 次元組織を構築した後、それぞれのアルブミン生産量を比較した。1 つは HepG2 細胞ファイバのみを巻きつけて作製した構造体で、もう 1 つは HepG2 細胞ファイバを巻きつけた上にヒト線維芽細胞ファイバを巻きつけた構造体を作製した。それぞれ培養 1 日後、3 日後のアルブミン生産量を ELISA により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) アルギン酸シェル除去後の細胞ファイバの安定性

いずれの細胞もマイクロ流体デバイスを用いることでアルギン酸ゲルに被覆された細胞ファイバを作製することに成功した。各細胞に適した培養液中で培養することで、コア内部で細胞が増殖し、ばらばらな状態から細胞同士のコネクションが形成されているような状態へ変化していった。培養直後(0 h)でアルギン酸を除去した場合はいずれの細胞においてもコアの細胞がばらばらになってしまい、ファイバ形状を保ったままアルギン酸を除去することはできなかった。一方、培養 48 時間後にアルギン酸を除去した場合、3T3・OUMS-36T-1・hSMC・hMSC を用いて作製した細胞ファイバはアルギン酸除去後にコア部分単独でファイバ形状を保って回収することが可能であった。しかし、HepG2 単独で作製した細胞ファイバは培養 48 時間後であってもアルギン酸除去後にはコア部分がばらばらになってしまい、ファイ

バ形状を保った状態で回収することはできな

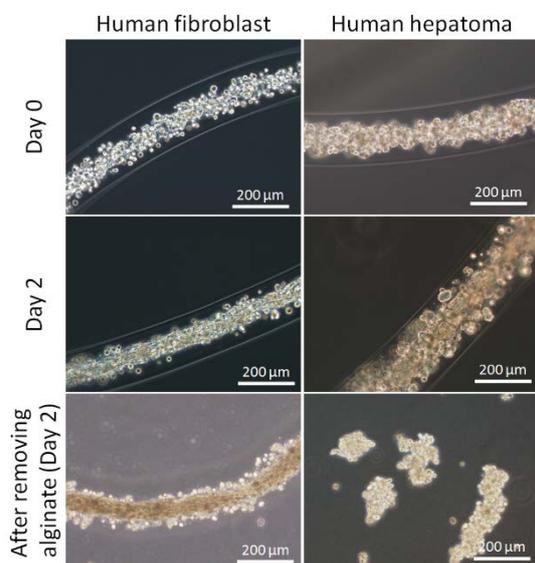


図 1 培養中の細胞ファイバの様子

かった(図 1)。そこで、HepG2 と hMSC を混合して細胞ファイバを作製したところ、hMSC の割合が 2 割以上含まれた場合には、アルギン酸除去後にコア部分がファイバ形状を保って回収することが可能であった(図 2)。アルギン

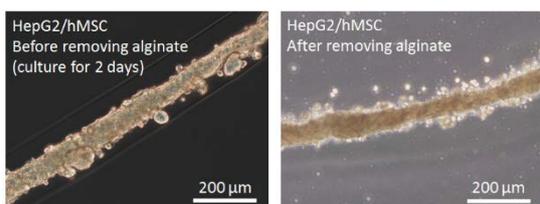


図 2 hMSC を混合した HepG2 細胞ファイバ

酸除去後の hMSC 混合 HepG2 細胞ファイバはピンセットでのハンドリングも可能な程度の強度を有していた。これらの結果より、細胞同士の接着性が低い場合でも、MSC を適当量混合することによってアルギン酸を除去した後もファイバ形状を保った状態で回収することが可能であった。

## (2) 中空状ハイドロゲル支持体の作製

細胞ファイバを支持体へ巻きつけて培養したのちに、支持体はマイルドな条件で除去できることが望ましいことから、支持体自体もアルギン酸ゲルを用いた。支持体に細胞ファイバを巻きつけて構造を作製しただけでは、組織のサイズが大きいほど、内部へ培養液の供給が困難になることから、支持体のコア部分を中空にし、内部に培養液を灌流可能な中空ハイドロゲル支持体を作製した。はじめはマイクロ流体デバイスをもちい、シェルにアルギン酸溶液を流し、コアに生理食塩水を流すことで中空ゲルファイバを作製した。しかしながら、内腔がゲル状態ではないため、非常にもろく、ハンドリングが困難であった。そこで培養温度ではゲル状態を保ち、低温処理だけで速やかにゾル状態へと変化するメビオールゲルをコアに持つハイドロゲルファイバを作製した。作製したハイドロゲルファイバは、ピンセットでハンドリング可能な強度を有していた。また、低温処理のみで速やかにコア内部をゲルからゾルへ転移することが可能であり、4°C の生理食塩水へ浸した直後にコア内部がゾルへと転化し、インク溶液を速やかに流しはじめることができた(図 3)。

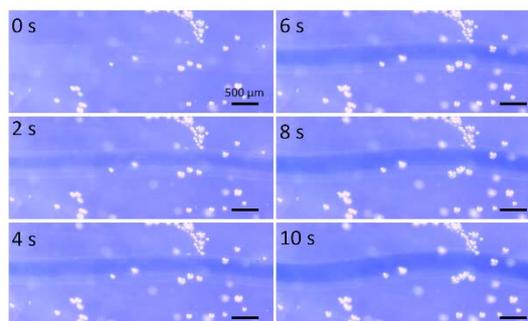


図 3 温度応答性ゲルを用いた中空状ハイドロゲル支持体へのインク溶液の灌流の様子

これにより、細胞ファイバを巻きつけるのに十

分な強度を有し、任意のタイミングで培養液を灌流可能な中空ハイドロゲル支持体の作製に成功した。

### (3) 細胞ファイバとハイドロゲル支持体を用いた 3 次元組織構造体の作製

アルギン酸シェルを除去した後の細胞ファイバのハンドリング性、および温度応答性ゲルでコア部を充填したハイドロゲル支持体のハンドリング性を確認できたので、ハイドロゲル支持体の周囲に 3T3 細胞で作製した細胞ファイバを巻きつけることで、灌流可能な 3 次元組織構造体の作製を行った(図 4)。アルギン酸を除去した細胞ファイバ

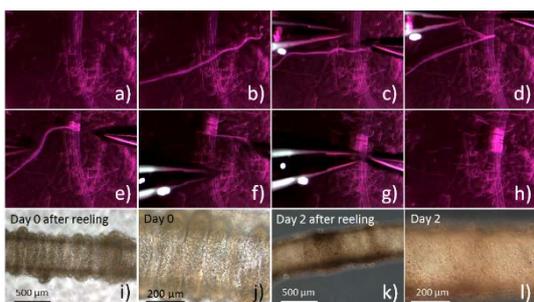


図 4 細胞ファイバを巻きつけて作製した 3 次元構造体の様子

はコアにもともと含まれているコラーゲンなどの ECM や培養過程で産生した ECM のおかげで、非常に粘着性が高く、ハイドロゲル支持体へ巻きつけた後も、ほどけることなく巻きつけた形状を維持していた。巻きつけた直後は細胞ファイバが 1 本ずつ独立しているのがみられるが(図 4i, j)、培養 2 日後には細胞同士が接着し、巻きつけた境界がわからない状態になっており、1 つの管状組織構造を作製することが可能であった(図 4k, l)。

続いて、階層化管状組織の作製の検討を試みた。3T3 細胞を蛍光色素 (CellTracker®

Green, Orange) を用いて染色し、細胞ファイバを作製した後でハイドロゲル支持体に順次巻きつけていった(図 5)。第 1 層に Green 標識し

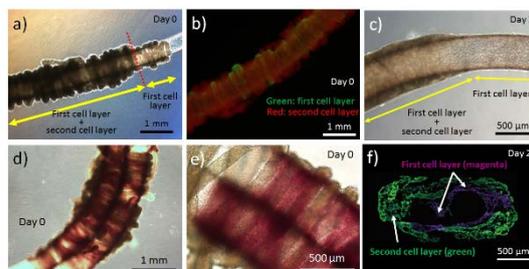


図 5 多層に階層化された 3 次元組織の作製

た細胞ファイバを巻きつけた直後に、上から第 2 層目の Orange 標識の細胞ファイバを巻きつけた。蛍光で観察したところ、階層化されており、単層と同様、培養 2 日目で細胞同士が接着して隣り合う細胞ファイバの境界が確認できなくなった(図 5a-c)。さらに、複数の構造を一度に巻きつけることで灌流腔を 2 つ有する 2 層構造の組織の作製も成功した(図 5d-f)。

### (4) 3 次元組織の機能性評価

階層化した 3 次元組織構造体の作製が可能になったので、機能的な 3 次元組織の作製が可能かどうかを検討した。HepG2 と hMSC からなる細胞ファイバ(HepG2 細胞ファイバ)を作製し、このファイバのみからなる 1 層の 3 次元組織と、第 1 層に HepG2 細胞ファイバを巻きつけ第 2 層に hFibro(OUMS-36T-1)細胞ファイバを巻きつけた 2 層の組織構造体を作製し、それぞれ、HepG2 細胞ファイバ単位長さあたりのアルブミン産生量の違いを比較した(図 6)。HepG2 細胞ファイバ単層で作製した組織および、HepG2 細胞ファイバと hFibro 細胞ファイバから作製した階層組織の凍結切片を作製し、HE 染色を行ったところ、いずれの組織も培養 3 日目において内部が密に詰まった状態であ

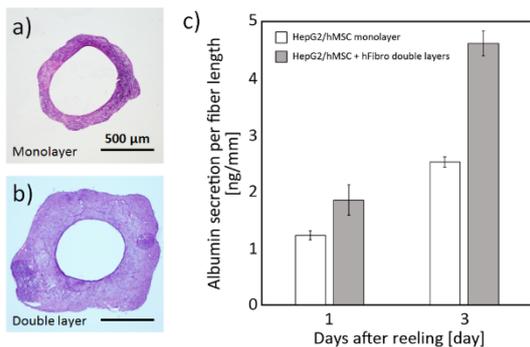


図 6 階層化 3 次元組織のアルブミン産生量

ることが確認された。また、ELISA より計量した単位 HepG2 細胞ファイバ長さあたりのアルブミン量は培養 1 日目、3 日目とも hFibro 細胞を巻きつけて階層化したもののほうが有意に高い値を示した。2 次元などで HepG2 と線維芽細胞を共培養した際と同様に、3 次元組織でも共培養によって機能性をより高めた組織を作製することに成功した。

以上の結果により、細胞ファイバとハイドロゲル支持体を用い、簡便に様々な細胞種で培養液の灌流可能な 3 次元組織の作製が可能であることが示された。本手法を適応することで、生体組織をミミックした 3 次元組織の再構築が可能になるため、組織工学や再生医療分野をより発展させることが期待できると考える。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Shintaroh Iwanaga, Hiroaki Onoe, Teru Okitsu and Shoji Takeuchi, Biofabrication of Hierarchical Tissue by Reeling Cell Fiber, International Symposium on 3D Tissue Fabrication, Tokyo, Japan (2014)
- (2) Shintaroh Iwanaga, Hiroaki Onoe, Teru Okitsu and Shoji Takeuchi, REELING-BASED CELL FIBER (CELL-F)

ASSEMBLY FOR THE RAPID CONSTRUCTION OF HIERARCHICAL TISSUES, the 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science, Texas, USA (2014)

- (3) Shintaroh Iwanaga and Shoji Takeuchi, ORDERLY-COCULTURED CELL FIBERS FOR HIERARCHICAL TISSUE ASSEMBLY, the 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science, Gyeongju, Korea (2015)
- (4) Shintaroh Iwanaga, Teru Okitsu and Shoji Takeuchi, Rapid fabrication of hierarchical tissues by reeling-based cell fiber assembly, Proceedings of The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Hawaii, USA (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：3 次元細胞構造体及びその製造方法並びに 3 次元細胞構造体の培養方法

発明者：竹内昌治, 岩永進太郎, 興津輝, 尾上弘晃

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2014-212945

出願年月日：2014 年 10 月 17 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 進太郎 (SHINTAROH IWANAGA)

東京大学生産技術研究所・特任助教

研究者番号: 70587972