

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02095

研究課題名(和文) ゲル転写共培養法による厚みのある複合組織体作製と応用

研究課題名(英文) Fabrication of 3-D cellular constructs using gel transfer methods

研究代表者

穴田 貴久 (Anada, Takahisa)

九州大学・先端物質化学研究所・准教授

研究者番号：30398466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体外における三次元細胞組織体は三次元オルガノイド、ミニチュア臓器とも呼ばれ、その構築は、組織再生工学における重要課題のひとつである。本研究は、独自開発した酸素透過性培養器による三次元細胞培養法を基盤技術として新たな三次元オルガノイド培養法を提案した。異なる種類の細胞をハイドロゲル内に埋めることによって細胞組織体の配列を高度に制御し、三次元的な血管構造を有する骨様組織を作製した。移植可能な「活きが良く、血の通った細胞組織体」を生体外で三次元的に再構成する技術は、骨芽細胞と血管内皮細胞における細胞-細胞間相互作用を促進し、細胞分化に効果的であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフェロイド培養法は、その直径が大きくなると内部の酸素が不足し、壊死を起こすため臨床応用への大きな障害となっている。組織体内部壊死を抑制する技術は、移植を目的とする *in vitro* 組織再構築を達成するために必須であり、ニーズが高い。代表者らは、従来のスフェロイド培養法の課題を解決し、壊死を抑制することができる細胞培養デバイスを開発した。また、組織構築には血管網作製が必須であり、生体外で血管網を予め形成させておくことで生体内で直ちに機能する組織体構築が可能となる。本手法は、血管網を有する構造体を生体外で作製することで厚みのある三次元組織体を得ることができ、再生医療分野に与える波及効果は大きい。

研究成果の概要(英文)：Three dimensional cellular constructs which are formed *in vitro* are called as 3D organoids or miniature organs. Construction of 3D organoids is one of the most important issue in tissue engineering. In this study, we have developed a novel 3D organoid culture system based on an oxygen permeable cell culture device. Three dimensional vascular-like structures were formed by use of different types of spheroids embedded in hydrogels. We found that the reconstruction techniques for the active and vascularized cellular constructs improve cell-cell interactions between osteoblasts and endothelial cells and are effective on the differentiation of cells.

研究分野：再生医工学

キーワード：細胞・組織工学材料 細胞培養デバイス

1. 研究開始当初の背景

骨の形成と吸収は常に血管を中心に営まれているが、骨は想像以上に複雑な構造を持ち、生体外で血管網を有する骨組織を構築する技術は未だ確立されていない。一方、疾病などにより骨に障害が起き、QOLが損なわれることが社会の高齢化に伴って大きな問題になっている。現在、骨修復のゴールドスタンダードは患者自身の骨を採取し、埋入する自家骨移植である。しかし、自家骨は少量しか取ることができず、採取には健全な部位への外科的侵襲が必要となる。このため、リン酸カルシウムに代表される骨代替材料が開発されているが、自家骨と比較すると再生能が十分とは言えず、新たなブレークスルーが望まれている。そこで、本研究は独自開発した培養装置を基盤とすることで、生体外で厚みのある三次元組織を構築し、骨再生治療へ応用することを目的とする。申請者はこれまでに独自の三次元細胞培養装置を開発し、特許出願および論文投稿を行った（特許5578779号、引用文献1）。この培養装置は、従来の三次元培養法の課題を解決し、さらに安定に酸素を供給することで細胞組織体の生存率を大幅に向上させることができる。さらに、2種類以上の三次元培養した細胞塊をハイドロゲルにより共培養し、血管網を構築することでこれまでには困難であった生体外で大きな細胞組織体を構築することで可能となる。

2. 研究の目的

本研究では独自培養技術により種々の組織へと応用可能な三次元組織培養技術を創出する。生体外で「生きが良く、血の通った細胞組織」を作製し、他に類をみない細胞組織・器官再構築を目標とした。このために複数種の細胞を三次元共培養するための培養技術、デバイス設計、三次元細胞共培養法の確立を目指した。具体的には、独自開発の酸素透過性細胞培養器に間葉系幹細胞と血管内皮細胞を播種する。培養器内で細胞が自己組織的に凝集し、球状塊（スフェロイド）が形成される。培養器から酸素が安定に供給されるため内部壊死がなく、高機能なスフェロイドを一度に大量調製することができる。細胞塊形成後に培養器に光架橋性ゼラチンを入れ、3Dプリンティング技術によって形成したハイドロゲル（足場）-細胞塊一体化ゲルを得る。ハイドロゲルには細胞が適切に分化するような成長因子、リン酸カルシウムなどを加えておき、酸素透過性培養器で培養することで細胞がゲル内を遊走し異細胞間相互作用により、血管網を有する細胞組織体ゲルが得られる。作製した組織体を生体へ移植することでホスト血管との迅速な結合、血管網の発達が起こり、自家骨に匹敵する広範囲骨欠損再生が可能になると期待できる。

3. 研究の方法

酸素透過性培養器に間葉系幹細胞（MSC）または血管内皮細胞（EC）を播種し、培養器および培養条件の最適化を図った。MSCは株化細胞やラット骨髄から採取したものをを用いた。ECはヒト臍帯血由来HUVEC細胞を用いた。スフェロイドをハイドロゲルに転写するために光架橋性ゼラチンゲルを用いた。これはスタンフォード大学医学部整形外科Yunzhi Peter Yangとの共同研

究により開発したもので、細胞へのダメージが少ない可視光照射により迅速にゲル化が起ることから本研究のスフェロイドアレイ化ゲルの作製に適している。また、ゼラチンからできているため細胞接着性が高く、血管内皮細胞などがゲル内でよく増殖し、血管様構造体を形成するのに適している。培養器にHUVEC細胞を播種し、細胞数などを最適化し、光架橋性ゼラチンゲルに内包することで血管様管腔形成の評価を行った。細胞遊走のための最適なゲル濃度を調整した。細胞を蛍光標識しておき、共焦点顕微鏡を用いて細胞組織体による管腔形成を経時的に観察した。培養はハイドロゲル用に作製した酸素透過性培養器を用いて行い、厚い組織体が形成しても酸素供給が行われるようにした。形成した組織体を固定し、組織切片を作製することで形態の経時変化を観察した。また、二つの細胞を共培養することによって骨芽細胞分化にどのような影響があるかについても検証した。骨芽細胞分化については骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性の評価、PCRによる検討（骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ、コラーゲンI、オステオカルシンなど）、切片作製による分化マーカーの免疫染色、アリザリンレッドによる石灰化量、表面抗原マーカーによる血管構造の評価を行った。細胞塊への酸素供給により好氣的代謝経路が優位となるため、ATP産生量や糖代謝に関して従来法との比較を行った。

4. 研究成果

酸素透過性培養器に間葉系幹細胞（MSC）または血管内皮細胞（EC）を播種し、培養器および培養条件の最適化を図った。MSCはD1細胞を用いた。ECはヒト臍帯血由来HUVEC細胞を用いた。また、細胞塊をハイドロゲルに埋入するために光架橋性ゼラチンゲルを合成した。HUVEC細胞は培養器を用いることで迅速にスフェロイド化し、光架橋性ハイドロゲル内で培養することで血管腔形成を評価した結果、管腔形成が起こるゲル作製条件や培養条件を決めることができた。MSCとECの共培養条件の検討を行った。

血管内皮細胞と間葉系幹細胞のような異なる細胞を共培養するのはそれぞれの細胞に適した分化培地の組成が大幅に異なるので、両細胞を維持、分化させるための培地選択が難しい。三次元プリント技術を応用することで2種類の細胞を培養できるハイドロゲル環境を作製することに成功した。このゲルは三次元化した血管内皮細胞が血管様構造体を形成するのに適した部位と間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化するのに最適化した部位を有するように設計した。それぞれの部位において骨芽細胞分化と血管様構造体が形成されることを確かめることができた。この成果は米国スタンフォード大学との共同研究として論文投稿を行い、受理された（引用文献2）。さらに、当研究で開発した技術を用いて骨再生用ゼラチン担体の改良と上皮細胞の三次元培養への応用を行い、その結果をまとめて論文投稿中である。

<引用文献>

T Anada, J Fukuda, Y Sai, O Suzuki. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials*, 33, 2012, 8430-8441

T Anada, C Pan, A Stahl, S Mori, J Fukuda, O Suzuki, Y Yang. Vascularized bone-mimetic hydrogel constructs by 3D bioprinting to promote osteogenesis and angiogenesis. *Int J Mol Sci*, 20, 2019, 1096.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anada Takahisa, Pan Chi-Chun, Stahl Alexander, Mori Satomi, Fukuda Junji, Suzuki Osamu, Yang Yunzhi	4. 巻 20
2. 論文標題 Vascularized Bone-Mimetic Hydrogel Constructs by 3D Bioprinting to Promote Osteogenesis and Angiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20051096	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 該当する
1. 著者名 Sato Tomoya, Anada Takahisa, Hamai Ryo, Shiwaku Yukari, Tsuchiya Kaori, Sakai Susumu, Baba Kazuyoshi, Sasaki Keiichi, Suzuki Osamu	4. 巻 88
2. 論文標題 Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict in vivo bone forming capability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 477 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurobane Tsuyoshi, Shiwaku Yukari, Anada Takahisa, Hamai Ryo, Tsuchiya Kaori, Baba Kazuyoshi, Iikubo Masahiro, Takahashi Tetsu, Suzuki Osamu	4. 巻 88
2. 論文標題 Angiogenesis involvement by octacalcium phosphate-gelatin composite-driven bone regeneration in rat calvaria critical-sized defect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 514 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.02.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y Sai, Y Shiwaku, T Anada, K Tsuchiya, T Takahashi, O Suzuki.	4. 巻 -
2. 論文標題 Capacity of octacalcium phosphate to promote osteoblastic differentiation toward osteocytes in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Biomater	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.actbio.2018.01.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R Iwama, T Anada, Y Shiwaku, K Tsuchiya, T Takahashi, O Suzuki.	4. 巻 -
2. 論文標題 Osteogenic cellular activity around onlaid octacalcium phosphate-gelatin composite onto rat calvaria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res A	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 穴田貴久, 鈴木治, Yunzhi Yang
2. 発表標題 血管と骨形成を促進するハイドロゲル構造体の作製
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穴田貴久
2. 発表標題 再生医療応用のための三次元細胞培養デバイスの開発
3. 学会等名 第8回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穴田貴久
2. 発表標題 ソフトマテリアル三次元細胞培養機材の開発と細胞分化制御
3. 学会等名 先端化学・材料技術部会 新素材分科会/ライフサイエンス技術部会 材料分科会 共催 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Suzuki, Takahisa Anada, Yukari Shiwaku
2. 発表標題 Mechanism of dissolution, hydrolysis and re-precipitation in OCP scaffold
3. 学会等名 European Materials Research Society 2017 Spring Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 穴田貴久, 平山闌一, 塩飽由香利, 宮武尚央, 土屋香織, 中村雅典, 高橋哲, 鈴木 治
2. 発表標題 ラット脛骨骨欠損部へ埋入した リン酸オクタカルシウムの初期組織反応及び細胞遊走性の評価
3. 学会等名 第37回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 穴田貴久, 鈴木 治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 321
3. 書名 歯科再生医学 第三章-6「3次元オルガノイド形成」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学先端物質化学研究所ソフトマテリアル学際化学分野 http://www.soft-material.jp/ 東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野 http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp/

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
研究 分 担 者	鈴木 治 (Suzuki Osamu) (60374948)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	