

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21693

研究課題名(和文) 自己組織化による生きた細胞立体構造物“セルカプセル”の開発と心筋再生治療への応用

研究課題名(英文) Development of core-shell cell structure called CELL CAPSULE for myocardial tissue regeneration by using cell self-organization inducible surfaces

研究代表者

岩井 良輔 (Iwai, Ryosuke)

岡山理科大学・付置研究所・講師

研究者番号：60611481

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、我々が開発した細胞の自己組織化を誘導する培養皿に細胞を播種するだけで異なる種類の細胞が核と被膜(コアシェル構造)を持って棲み分けられた細胞凝集塊を“セルカプセル”として作製することに成功した。セルカプセルを実験動物の体内(腹部大動脈表面)に移植すると良好に生着して、3週間後には核細胞が被膜細胞から侵出して組織を再構築し得ることが分かった。核細胞として心筋細胞を、被膜細胞として心筋保護作用や抗炎症部位への遊走能力のある間葉系幹細胞を用いた心筋/間葉系幹細胞のセルカプセルの心筋梗塞部位への移植による能動的かつ高効率な心筋再生が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have successfully prepared a novel cell aggregated construct having core-shell structure as we called “CELL CAPSULE” that contains therapeutic cells as core cells and support cells as shell cells by using our developed cell self-organization inducible culture surfaces. The core cells of CELL CAPSULE could reconstruct tissues within 3 weeks after their transplantation for outer surface of rat aorta. It is expected that aggressive regeneration of myocardial tissues could be achieved by the transplantation of CELL CAPSULE composed of cardiomyocytes as core cells and mesenchymal stem cells having anti-inflammatory and homing potential as shell cells.

研究分野：細胞工学

キーワード：自己組織化 スフェロイド 再生医療 細胞工学 DDS

1. 研究開始当初の背景

心筋再生治療のための細胞の移植形態として細胞の懸濁液を患部心筋に注入する方法が簡便であるが、注入細胞の大半が周囲組織へ拡散するため患部への生着率が低く心筋を実質的に補填するような高い再生効果は得られていない。一方で、我々は『細胞の自己組織化を誘導する表面コーティング剤 (CAT)』を開発した。例えば、CAT をコートした培養皿に細胞を播種すると、細胞は一度 CAT のコーティング表面に接着、伸展して細胞単層 (細胞シート) を形成した後に表面から自然と剥離して一体凝集化 (自己組織化) することにより播種細胞の全てからなる単一の細胞凝集塊 (スフェロイド) がわずか 10 時間程度の培養で得られた。

ここで、細胞の自己組織化によるスフェロイド形成を生じる前の細胞シートの上に、予め作製しておいたスフェロイドを添加すれば、自己組織化により細胞シートによりスフェロイドが内包された核と被膜からなるコアシェル構造を有する球体細胞組織体、言わば“セルカプセル”が作製できると考えた。間葉系幹細胞 (MSC) のような心筋梗塞部位への集積 (ホーミング) 能や心筋細胞への分化能を有していることが知られている細胞と心筋細胞から構成される心筋/MSC カプセルが作製できれば、それらの移植により MSC 被膜によるセルカプセルの心筋梗塞部位への能動的な集積と心筋細胞核による心筋の確実な置換により高い心筋再生効果が期待できると考えた (図 1)。

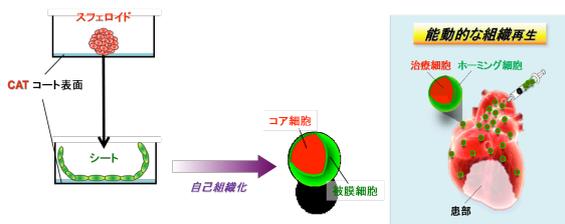


図 1 セルカプセルの作製法と心筋再生治療への応用コンセプト

2. 研究の目的

本研究では、細胞の自己集合化誘導剤である CAT を用いて、心筋細胞や MSC などの異種の細胞がコアシェル構造を持って棲み分けられた細胞構造体“セルカプセル”を作製し、動物実験によりそれらの体内動態を調べることで、心筋再生治療への応用可能性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セルカプセルの作製

我々がすでに開発している細胞の自己集合化誘導剤 CAT を用いて、心筋スフェロイドを作製するとともに、それらを被覆化する MSC シートの作製を行う。心筋スフェロイドと MSC シートを組み合わせることにより、コアシェル構造を有する細胞構造体“セルカ

プセル”を作製する。

① 心筋および心筋/MSC 混合スフェロイドの作製

CAT をコーティングした組織培養用の 24 穴プレートに Lewis 系の新生ラットの心室部から分離した心筋細胞、または心筋細胞と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 組み換え Lewis 系ラットの皮下脂肪より分離した MSC の混合懸濁液を 2.0×10^5 cells/cm² 以上の密度で播種し、DMEM 基礎培地に 10% のウシ胎児血清を加えた培養液 (増殖培地) を用いて 37°C、5%CO₂ 雰囲気下にて培養した。

② スフェロイド被覆化構造体の作製

CAT とフィブロネクチン (FN) の混合液 (FN 濃度: 40~160 ng/μL) を培養皿表面にコーティングすることで自己組織化表面を作製した。この上に MSC を 4.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、増殖培地を用いて 37°C、5%CO₂ 雰囲気下にて培養した。

③ セルカプセルの作製

CAT とフィブロネクチン (FN) の混合液 (FN 濃度: 80~160 ng/μL) を培養皿表面にコーティングすることで自己組織化表面を作製した。この上に MSC を 4.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、約 3 時間後に MSC がコンフルエントの MSC シートを形成したことを確認した後、予め作製しておいた MSC や心筋のスフェロイドを MSC シートの上に静置し、増殖培地を用いて 37°C、5%CO₂ 雰囲気下にて培養した。

(2) セルカプセルの in vivo 動態評価

赤色蛍光色素でラベリングした Lewis 系ラット皮下脂肪由来の MSC を核細胞、GFP で組み替え Lewis 系ラットの皮下脂肪由来の MSC を被膜細胞として作製した MSC/MSC カプセルを Lewis 系ラットの腹部大動脈の外膜表面に貼付し、1~3 週間後に摘出し組織学分析を行った。

4. 研究成果

(1) セルカプセルの作製

① 心筋スフェロイドの作製

CAT をコーティングした自己組織化表面に心筋細胞を播種すると、1 時間以内に細胞は接着、伸展してコンフルエントの細胞シートを形成した後、約 30 時間後に自己組織化することで、単一の心筋スフェロイドが形成した (図 2A)。心筋スフェロイドは協調拍動性を有しており、移植物として良好な状態であると考えられた。また、CAT のコーティング表面の面積を変えることで、心筋スフェロイドを 0.5 mm から 2 mm 以上まで任意の大きさで作製することができた。スフェロイドのサイズを制御することで、スフェロイドが壊死しないサイズを容易に検討することが可能となる。これは、移植実験の際に活かさ

れると考えている。さらに、心筋細胞に MSC を混合することで、任意の割合で心筋細胞と MSC を含む心筋/MSC 混合スフェロイドを作製することも可能であった (図 2B)。MSC は心筋梗塞部位への集積能力や心筋への分化能力に加えて、血管新生能力を有することが知られているため、心筋/MSC の混合スフェロイドとすることで、移植後の速やかな血管新生により移植した心筋スフェロイドが壊死することなく高効率に生着できると期待される。

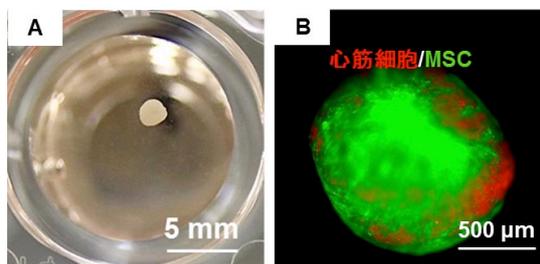


図 2 CAT をコーティングした自己組織化表面上で作製した心筋スフェロイド (A) と心筋 (赤色) /MSC (緑色) 混合スフェロイド

② スフェロイド被覆化構造体の作製

セルカプセルを作製するには、心筋スフェロイドや心筋/MSC 混合スフェロイドを MSC シートで被覆化する必要がある。そこで、CAT に FN を加えた混合液を培養皿表面にコーティングし MSC を播種したところ、FN を 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で CAT に加えることで、MSC シートは培養皿からシート形状を維持した状態で培養皿から剥離し、数時間かけて徐々に端部から収縮することで巾着袋様の構造体を形成した (図 3)。

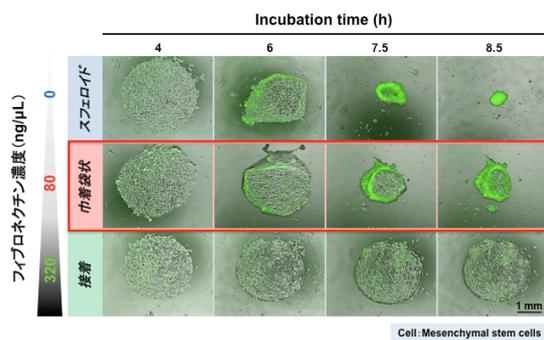


図 3 CAT へのフィブロネクチン添加による自己組織化の動的制御: 巾着袋状構造体の作製

このような、MSC シートの巾着袋状の構造体への変化の前に心筋や心筋/MSC のスフェロイドを添加しておけば、自動的にスフェロイドが MSC シートに被覆されることでセルカプセルが作製できると考えられた。

③ セルカプセルの作製

CAT と FN の混合液をコーティングした培養表面に GFP 組み換え MSC を播種し、3 時間後に MSC がコンフルエントの細胞シ

トを形成したのを確認した後、赤色蛍光色素で標識した MSC のスフェロイドを添加した。その結果、MSC スフェロイドは添加から 3 時間以内には MSC シートと接着し、約 10 時間後には MSC シートの剥離と収縮による巾着袋状構造体により被覆化された (図 4)。すなわち、スフェロイドが細胞シートで被覆化されたセルカプセルを作製することに成功した。

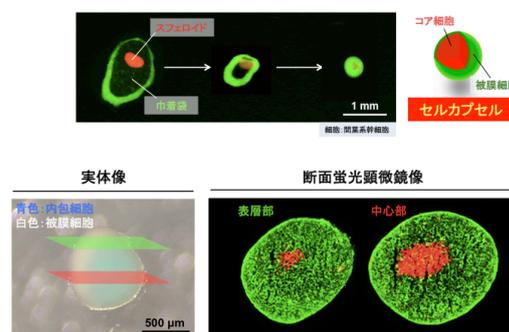


図 4 核構造を有するスフェロイド“セルカプセル”

(2) セルカプセルの in vivo 動態評価

セルカプセルの体内への生着と動態を調べるために、核として赤色蛍光色素で標識した MSC スフェロイドを、被膜として GFP 組み換え MSC からなるセルカプセルをラット腹部大動脈の外膜表面に移植した。その結果、移植 1 週間後には核および被膜のいずれの細胞も血管外膜に生着して、被膜細胞 (緑色) は血管周囲を覆うように拡散し、核細胞 (赤色) も一部は被膜細胞の外側にまで侵出していることが分かった (図 5A)。さらに、移植 3 週間後には核細胞と被膜細胞が混在した、細胞多重層構造体が血管の約 1/4 周を被覆するように形成していることが分かった (図 5B)。

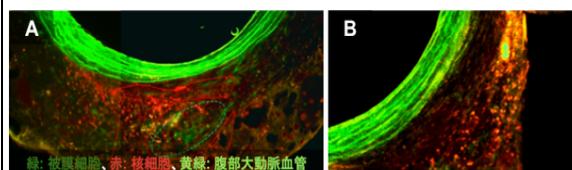


図 5 セルカプセルのラット腹部大動脈外膜への移植 1 週間後 (A) と 3 週間後 (B) の組織の蛍光顕微鏡像

以上、本研究では核と被膜からなるコアシェル構造を有するスフェロイド、“セルカプセル”の作製に成功した。セルカプセルは、体内に生着し 3 週間で核細胞と被膜細胞からなる厚みのある細胞多重層構造体を形成し得ることが分かった。心筋細胞と MSC からなるセルカプセルの心筋梗塞部位への移植により確実に高い心筋再生効果が得られると期待される。心筋梗塞モデル動物への移植による評価実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Iwai R, Haruki R, Nemoto Y, Nakayama Y: Induction of cell self-organization on weakly positively charged surfaces prepared by the deposition of polyion complex nanoparticles of thermoresponsive, zwitterionic copolymers., *J Biomed Mater Res B*, 105(5), 1009-15 (2017)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 岩井 良輔, 長島 諒, 根本泰, 中山 泰秀: 2次元接着細胞の自己凝集化技術を用いた3次元細胞回路の作製、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7日、宮城県仙台市
- ② 岩井 良輔, 根本 泰, 中山 泰秀: 細胞の自己集合化表面を基盤とする3次元組織構築の要素技術開発～形状とサイズ制御、大量生産化～、第54回日本人工臓器学会大会、2016年11月24日、鳥取県米子市
- ③ 岩井 良輔, 根本 泰, 中山 泰秀: 細胞の自己集合化誘導コーティング剤を用いたスキャホールドフリー軟骨リングの簡易作製、第68回日本生物工学会大会、2016年9月28日、富山県富山市
- ④ 岩井 良輔: 接着細胞の自己凝集化を誘導する培養表面の開発: 播種した翌日に任意の形とサイズの細胞凝集体が出来上がる、第4回細胞凝集研究会、2016年9月9日、北海道札幌市
- ⑤ 岩井 良輔, 八木 翔輝, 根本 泰, 中山 泰秀、**One-Day-Aggregated Spheroids (ODAS)**技術の展開: 再生医療および創薬用途を指向した細胞スフェロイドの作製、第15回日本再生医療学会、2016年3月15日、大阪国際会議場、大阪府大阪市
- ⑥ 岩井 良輔, 八木 翔輝, 根本 泰, 中山 泰秀、**CAT**を用いる組織形成技術の展開: スキャホールドフリー軟骨輪様組織体の作製～気管様組織体の開発、第15回日本再生医療学会、2016年3月14日、大阪国際会議場、大阪府大阪市

〔図書〕(計1件)

- ① 岩井 良輔, 中山 泰秀: バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線、シーエムシー・リサーチ、2016年

〔産業財産権〕

○出願状況(計13件)

- ①
名称: 立体構造体の作製装置、及び立体構造体の作製方法
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上

種類: 特許
番号: 特願 2016-124458
出願年月日: 2016年6月23日
国内外の別: 国内

②
名称: 細胞培養器
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT・JP2016/069565
出願年月日: 2016年6月24日
国内外の別: 外国

③
名称: 細胞構造体の製造方法
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2016-053082
出願年月日: 2016年3月16日
国内外の別: 国内

④
名称: 細胞構造体の製造方法
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2016-053081
出願年月日: 2016年3月16日
国内外の別: 国内

⑤
名称: 細胞構造体の製造方法、細胞構造体、細胞培養器
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2016-026293
出願年月日: 2016年2月15日
国内外の別: 国内

⑥
名称: 細胞構造体の製造方法
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2016-016436
出願年月日: 2016年1月29日
国内外の別: 国内

⑦
名称: 細胞培養器及び細胞培養器の製造方法
発明者: 根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2016-001765
出願年月日: 2016年1月7日
国内外の別: 国内

⑧

名称：細胞構造体の製造方法
発明者：根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-234947
出願年月日：2015 年 12 月 1 日
国内外の別：国内

⑨

名称：細胞培養器及び細胞培養器の製造方法
発明者：根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-209142
出願年月日：2015 年 10 月 23 日
国内外の別：国内

⑩

名称：カプセル化細胞構造体の製造方法、及
びカプセル化細胞構造体
発明者：根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-185841
出願年月日：2015 年 9 月 18 日
国内外の別：国内

⑪

名称：細胞培養器の製造方法
発明者：根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-129249
出願年月日：2015 年 6 月 26 日
国内外の別：国内

⑫

名称：細胞培養器の製造方法、細胞構造体
発明者：根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-129251
出願年月日：2015 年 6 月 26 日
国内外の別：国内

⑬

名称：細胞培養器
発明者：根本 泰、岩井 良輔、中山 泰秀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-129266
出願年月日：2015 年 6 月 26 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 良輔 (Ryosuke IWAI)
岡山理科大学・技術科学研究所・講師
研究者番号：60611481