

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12701

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0232

研究課題名（和文）電気化学を用いた三次元細胞組織の構築（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Engineering of three-dimensional tissues using electrochemical approach
(Fostering Joint International Research)

研究代表者

福田 淳二 (Fukuda, Junji)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80431675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：再生医療の実現には、立体的かつ高細胞密度の組織を作製する必要がある。しかしながら、送液可能な血管構造を作製する技術が未だ開発されておらず、このような組織を作製することは困難である。特に低酸素障害を回避するためには、このような血管構造作製方法は十分に素早い必要がある。研究代表者らは、電気化学的に細胞を培養表面から脱離させハイドロゲルに転写する方法を提案してきた。本研究では、この方法をニードル表面に応用することで素早く血管様構造を作製する技術を確立した。国際共同研究を通して、この血管構造作製技術を組織作製に応用し、組織作製に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞そのものを利用する新しい治療法として再生医療に期待が寄せられている。すでに皮膚や角膜などの薄い2次元組織は臨床応用が開始されており、その成果が示されている。しかし、肝臓や膵臓などの厚みのあるより重要な臓器・組織は、未だに作製が難しいのが現状である。これは、組織が厚くなると、酸素の供給が組織表面からの拡散のみでは不十分となるためである。つまり、cmサイズの立体的な組織の作製には、酸素や栄養素の運搬を担う血管網構造を作製する技術が必要であり、本研究プロジェクトでは、当該分野で独自の技術を有する海外の研究者と共同研究を実施し、この課題の解決に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：The lack of fabrication strategy of perfusable vascular networks is a fundamental barrier to engineer thick and cell-dense tissues and organs for regenerative medicine. Such fabrication processes should be sufficiently rapid to avoid severe hypoxic damage. We have proposed a rapid engineering approach of spatially-aligned and perfusable macrovasculatures for the supply of oxygen and nutrient throughout three-dimensional tissues. We designed an electrochemically cleavable oligopeptide which can be used for cell transfer from a culture surface to a hydrogel. Using this oligopeptide on a needle, macrovasculatures whose internal surface was covered with endothelial cells were fabricated in a hydrogel. Through this international collaboration project, we further applied this simple and versatile approach to engineer hepatic and pancreatic tissues in vitro.

研究分野：生物工学、再生医療

キーワード：血管内皮細胞 肝細胞 ティッシュエンジニアリング 再生医療 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

細胞そのものを利用する新しい治療法として再生医療に期待が寄せられている。すでに皮膚や角膜などの薄い2次元的な組織は臨床応用が開始されており、その成果が示されている。しかし、肝臓や膵臓などの厚みのあるより重要な臓器・組織は、未だに作製が難しいのが現状である。これは、組織が厚くなると酸素の供給が組織表面からの拡散のみでは不十分となるためであり、単純な拡散方程式から生存限界厚みは 500 μm 程度以下と見積られる。したがって、cm サイズの立体的な組織の作製には、酸素や栄養素の運搬を担う血管網構造を作製する技術が必要である。しかし、このような血管網構造を生体外で構築する技術はこれまでに確立されておらず、再生医療分野における最大の課題の1つとなっている。

2. 研究の目的

研究代表者は、電気化学的に細胞を培養表面から脱離させハイドロゲルに転写する方法を提案してきた。本研究では、この方法をニードル表面に応用することで素早く血管様構造を作製する技術を確認することを目的とした。特に、血管様構造の作製プロセスに要する時間に着目した。すなわち、組織や臓器を作製するには、ハイドロゲル内には臓器細胞をあらかじめ高密度に充填することになるが、作製プロセスに長時間(30分以上)を要するようでは、酸素枯渇により重大な悪影響が生じる。そこで、電気化学を用いた素早い細胞脱離を利用することで、10分以内にすべてのプロセスを完了し送液を開始できる手法の確立に取り組んだ。また、形成した血管構造がさらに自己組織化により分岐構造を形成すること、ハイドロゲル内の実質細胞(iPS由来肝細胞など)と相互作用して組織様構造を形成させることを目指した。このために、当該分野で独自の技術を有する海外の研究者と共同研究を実施し、この課題の解決に取り組んだ。

3. 研究の方法

電気化学的な細胞脱離の原理は、電極表面に形成した自己組織化オリゴペプチド分子層を介して細胞を接着させ、電気化学的にこの分子層を脱離させることで細胞も脱離させるものである。この方法は平面のみならず、ニードル(500 μm)にも適用可能であり、血管内皮細胞を電気化学的に脱離してハイドロゲルへと転写することで、内表面が血管内皮細胞に覆われた血管様構造を構築できる。一方、渡航先研究機関(ミラノ工科大)の Prof. Gabriele Dubini の研究室は、精密に流体の流れを制御した環境下で、血管新生のメカニズム解明や血管新生と他の種類の細胞との相互作用を解析している。独自の実験系および解析系を有するのみならず、医学や工学、生物学の様々なバックグラウンドを持つ研究者が集まっている。そのため、送液可能な血管網構造の構築技術を立体的な肝組織構築へと展開するための支配因子の探索を探索した。特に、本研究における独自の戦略は、毛細血管網の形成と iPS 由来肝前駆細胞の増殖・組織化を同期させ、血管網を備えた肝組織へと成長させるものであるが、渡航先研究室の持つ生体の発生プロセスに関する知見や血管新生の制御技術を取り込んだ。

4. 研究成果

従来は、評価デバイス一つ一つにシリンジポンプを接続し送液する必要があり、一度に多くの条件を検討することが困難であった。この課題を解決するために、ミラノ工科大学との共同研究でシーソー型培養ステージを作製した。ここに細胞培養デバイスを搭載するだけで、一度に複数条件の検討・評価が可能となった。また、細胞培養デバイスの底面はカバーガラスを配

置しているため、細胞の挙動を経時的に顕微鏡で観察可能であった。実際に送液培養を行ったところ、血管内皮細胞にせん断応力に起因する配向性が見られ、静置培養と比べて長期に渡って生理的な環境下で良好に細胞を培養することができた。さらに、培養デバイス内の流体シミュレーションを実施し、マイクロ流路内の突起構造により細胞を選択的に分離する手法を確立し、国際共同研究論文として掲載された。

ミラノ工科大学を拠点とした人的ネットワークは、研究期間中にオーストラリア（ウーロンゴン大学）、アメリカ（マサチューセッツ工科大学）、韓国（ソウル大学）などへ広がり、当初よりも幅広い国際共同研究へと展開した。特にオーストラリア（ウーロンゴン大学）と韓国（ソウル大学医学部）との共同研究は重点的に実施し研究成果が得られるとともに、相互に競争的研究費に採択され新たなプロジェクトへと展開した。オーストラリア（ウーロンゴン大学）との共同研究では、電気化学細胞脱離を利用し、血管内皮細胞のみからなる構造体のさらにその外側に高密度な平滑筋細胞層を付与した2層構造の血管様構造の構築を実現した。また、ミラノ工科大学とは大学間MOUをすでに締結していたが、本国際共同研究がきっかけでウーロンゴン大学と新たに大学間MOUを結び、日本人学生の数か月以上の留学を実施した。一方、研究代表者は、オーストラリアの21世紀COEプログラムであるACESのAssociate Investigatorに着任した。さらに、ウーロンゴン大学のポスドクが日本学術振興会の外国人特別研究員に採択されて、研究代表者の研究室に2年間滞在し、その後も文部科学省地域イノベーション・エコシステムの予算で雇用している。このように、国際共同研究が着実に強化されてきているといえる。

韓国（ソウル大学医学部）の研究グループは、細胞生理学が専門であり、特に細胞の低酸素応答に関連する低酸素誘導因子(HIF)とその下流遺伝子の解析を得意としている。HIF遺伝子は、血管新生やその成熟化、さらに構造維持に重要な役割を果たしている。そのため、血管を引き込みながら自己組織化を誘導するために必要不可欠である。研究代表者がソウル大学医学部の研究室を複数回訪問するとともに、ソウル大学医学部教授がサバティカルにて本研究室に約10ヵ月滞在した。ここでは、微細加工技術を用いて酸素透過性の培養容器を作製し、球状組織体(スフェロイド)の大量培養法を提供した。酸素センサにより組織近傍の酸素濃度を測定し、これを変化させることは可能であったが、細胞応答を解析しこれをもとに適切に制御することは難しかった。そこで、ソウル大学医学部教授の提案でHIF遺伝子を指標として細胞応答を評価するとともに、関連遺伝子についても解析を進めた。この検討を通して、単に酸素濃度を上昇させるだけでは活性酸素種による悪影響も生じること、むしろ適切な低酸素濃度に制御し、HIF関連遺伝子の発現を誘導することが血管構造の誘導において重要であるという新しい知見が得られた。このプロジェクトは、現在JSPS二国間交流事業（2019 - 2020）へと展開している。

ヒトiPS由来肝前駆細胞は、独自のスフェロイド培養器を用いてスフェロイドを形成させ、送液可能な血管ネットワークを作製するプロセスにおいてハイドロゲル内に導入した。微小血管構造と肝細胞スフェロイドの自発的な組織化が観察された。さらに、遺伝子発現解析により、未分化マーカーと肝成熟マーカーを解析したところ、血管様構造を進展させながら、肝前駆細胞の肝機能を成熟化させることが可能であることを示した。肝機能はヒト初代肝細胞の1/2から1/3程度まで上昇した。構築した肝組織が治療に有効であることを示すには、肝不全動物を用いた実験が不可欠である。そこで、肝芽腫由来Hep G2細胞をスフェロイドにして血管構造に導入し、このデバイスを門脈に直接吻合することでマウスに接続し、血液中のヒトアルブミンなどを評価した。その結果、血液がデバイス内の微小血管構造を流れること、安定した還流が可能であること、マウス血中のヒトタンパク濃度が時間とともに上昇することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2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 ~ 1096
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 Shimazu Yuka, Zhang Binbin, Yue Zhilian, Wallace Gordon G., Fukuda Junji	4. 巻 127
2. 論文標題 Engineering of perfusable double-layered vascular structures using contraction of spheroid-embedded hydrogel and electrochemical cell detachment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 114 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.07.006	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 該当する
1. 著者名 Enomoto Junko, Kageyama Tatsuto, Myasnikova Dina, Onishi Kisaki, Kobayashi Yuka, Taruno Yoko, Kanai Takahiro, Fukuda Junji	4. 巻 125
2. 論文標題 Gold cleaning methods for preparation of cell culture surfaces for self-assembled monolayers of zwitterionic oligopeptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 606 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2017.12.014	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 E. Bianchi, M. Piergiovanni, C. Arrigoni, J. Fukuda, A. Gautieri, M. Moretti, G. Dubini	4. 巻 48
2. 論文標題 Herringbone-like hydrodynamic structures in microchannels: A CFD model to evaluate the enhancement of surface binding	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Engineering and Physics	6. 最初と最後の頁 62-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.medengphy.2017.07.003	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 該当する

1. 著者名 J. Enomoto, T. Kageyama, T. Osaki, F. Bonalumi, F. Marchese, A. Gautieri, E. Bianchi, G. Dubini, C. Arrigoni, M. Moretti, and J. Fukuda	4. 巻 7
2. 論文標題 Catch-and-Release of Target Cells Using Aptamer-Conjugated Electroactive Zwitterionic Oligopeptide SAM	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 43375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43375	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 C. Arrigoni, M. Bongio, G. Dubini, S. Bersini, J. Enomoto, J. Fukuda, M. Moretti	4. 巻 5
2. 論文標題 Rational Design of Prevascularized Large 3D Tissue Constructs Using Computational Simulations and Biofabrication of Geometrically Controlled Microvessels	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 1617-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.201500958	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 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Junji Fukuda
2. 発表標題 Engineering 3D tissues in vitro
3. 学会等名 2019 Ischemic/hypoxic Disease Institute International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Sena Ozawa, Binbin Zhang, Junji Fukuda
2. 発表標題 4D tissue engineering using hydrogel swelling and shrinkage
3. 学会等名 APCCHE2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 山村友梨恵、福田淳二
2. 発表標題 複数の3次元組織モデルを搭載した薬剤評価チップデバイス
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第32回
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小澤聖奈、景山達斗、Binbin Zhang、福田淳二
2. 発表標題 ハイドロゲルの変形を利用した四次元組織構築法の確立
3. 学会等名 日本動物細胞工学会 2019
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 福田淳二
2. 発表標題 血管を含む立体組織をつくるアプローチ
3. 学会等名 第80回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 林慎也、大崎達哉、福田淳二
2. 発表標題 神経・血管相互作用を利用したダブルネットワークの形成誘導
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第31回大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 楢芳樹、榎本詢子、景山達斗、福田淳二、松下淳、秋本紗希、根本悠平
2. 発表標題 電気化学細胞脱離のための金表面洗浄法
3. 学会等名 化学工学会 第84年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Junji Fukuda
2. 発表標題 Engineering small and large tissues based on oxygen supply
3. 学会等名 TERMIS-WC 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hikaru Akieda, Yukie Sonoyama, Tatsuto Kageyama, Yohei Noda, Shoji Maruo, Junji Fukuda
2. 発表標題 Fabrication of vascularized bone grafts using bone beads
3. 学会等名 TERMIS-WC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 榎本詢子、Alfonso Gautieri、福田淳二
2. 発表標題 アプタマー修飾オリゴペプチド層を用いた選択的な細胞のキャッチ&リリース
3. 学会等名 第68回日本生物工学会大会(2016)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小林優香、Christopher E.J. Cordonier、永瀬史憲、本間英夫、丸尾昭二、福田淳二
2. 発表標題 マイクロ光造形法と生体適合性金めっきを用いた立体細胞シートの作製
3. 学会等名 第68回日本生物工学会大会(2016)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 篠原礼奈、榎本詢子、大崎達哉、小関智光、中尾裕利、福田淳二
2. 発表標題 送液可能な血管様構造を用いた血管新生評価デバイスの開発
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuka Kobayashi, Christopher E.J. Cordonier, Fuminori Nagase, Hideo Honma, Shoji Maruo, Junji Fukuda
2. 発表標題 Transplantation of tailored cell sheets using micro stereolithography and electrochemical cell transfer
3. 学会等名 International Conference on Biofabrication 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rena Shinohara, Junko Enomoto, Tatsuya Osaki, Yuka Kobayashi, Tomomitsu Ozeki, Hirotohi Nakao, Junji Fukuda
2. 発表標題 Array of perfusable three-dimensional microvasculatures on active tilting stage
3. 学会等名 2016MRS Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kisaki Onishi, Junko Enomoto, Rena Shinohara, Dina Myasnikova, Junji Fukud
2. 発表標題 Engineering 3D tissues using oxygen-permeable spheroid plate
3. 学会等名 Termis-AM 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Junko Enomoto, AlfonsoGautieri, Junji Fukuda
2. 発表標題 Surface Design for Catch-and-release of Target Cells using Electrochemical Cell Detachment
3. 学会等名 12th Annual International Electromaterials Science Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 培養装置及び培養方法	発明者 小関智光、中尾裕利、福田淳二、篠原礼奈、大崎達哉	権利者 株式会社アルバック、横浜国立大学
産業財産権の種類、番号 特許、2016-091020	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ドゥビーニ ガブリエレ (Dubini Gabriele)	ミラノ工科大学・Orthopedic Institute・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	チョン ヨンソク (Chun Yang-Sook)	ソウル大学・College of Medicine・Professor	

6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ゴードン ウォレス (Wallace Gordon)	ウーロンゴン大学・Intelligent Polymer Research Institute・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カム ロジャー (Kamm Roger)	マサチューセッツ工科大学・Department of Biological Engineering・Professor	