

令和元年6月12日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02322

研究課題名(和文) マグネットファイバーの局所磁場操作による3次元細胞組織の構築

研究課題名(英文) Fabrication of three dimensional tissue structures by micromanipulation of magnetic fibers

研究代表者

福田 敏男 (Fukuda, Toshio)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：70156785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管構造を有し機能する3次元細胞組織を生体外で作製することを目的として研究を行った。その手法として、自己組織的組み立て及びマイクロマニピュレーション技術の併用による1次元マグネットファイバーから血管構造を含む3次元細胞組織の構築を提案し、用いた。その結果、肝小葉を模した六角形状の3次元的な血管形状をフィブリンゲル内に実現した。さらに、フィブリンゲル内にラット肝臓細胞及び肝臓スフェロイドを分散させることで、肝臓組織を作製することに成功した。作製した生体外肝臓組織の機能評価を行い、磁力操作のためのフェライト粒子が肝機能を低下させることはないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、臓器移植希望登録者に対する移植件数は僅か数%と移植件数が圧倒的に少なく、この問題を解決する方法として再生医療は大きな注目を集めている。しかしながら、血管を含む3次元の組織を生体外で構築するためには、まだ課題も多い。また、3次元の細胞組織を生体外にて作製することで、薬剤の効能試験など臓器モデルとして使用することが可能であり、実験動物を使った薬剤テストを削減することにもつながる。このように、本研究で目的としている生体外3次元細胞組織は、実現すれば社会的なインパクトも大きく、臓器機能の発現原理の解明など学術的な意義も併せて大きなものである。

研究成果の概要(英文)：Without vascular networks, three dimensional tissues populated with cells cannot maintain a living condition. To construct 3D tissues, a well-organized vascular network is required. In this research, a new method for constructing a hepatic lobule-like vascular network in 3D cellular structure by using magnetic fields is proposed. To realize channel networks that mimic hepatic lobule, steel rods and magnetic fibers were utilized as a sacrificial mold in fibrin gel. The steel rods and fibers were connected by magnetic fields generated from magnetic tweezers. A tissue made of fibrin gel and rat liver cells or spheroids with 3D channel network was cultured for a week. The viability of cells in the tissue was checked and higher viability was achieved when the cells were placed near the channel structure. The hepatic function was not decreased even if ferrite particles were mixed inside the fabricated tissue for magnetic manipulation.

研究分野：マイクロ・ナノ知能ロボティクス

キーワード：3次元細胞組織 自己組織的組み立て マイクロマニピュレーション 磁場操作

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

日本臓器移植ネットワークによると、平成 27 年 8 月 31 日現在、臓器移植希望登録者数に対しこの 1 年間の臓器移植件数は僅か 2 %程度と、移植件数が圧倒的に少ない。そのため再生医療が大きな注目を集めており、細胞シートによる皮膚や角膜等の患者への移植が実現されてきている。しかし、肝臓細胞は 3 次元塊で機能が発現することが知られているように、肝臓や腎臓等の複雑な構造を持つ臓器を機能させるには 3 次元的な細胞組織構築が必要である。また、生体外 (in vitro)での臓器機能発現は細胞組織の機能解明及び再生医療の発展における重要課題である。これまで肝臓の種となる肝原基の in vitro での作製は実現しているが (T. Takebe et al., Nature, 2013)、肝原基内部の毛細血管へ血液を流し臓器として機能させるために生体内 (in vivo)に戻す必要がある。

2. 研究の目的

再生医療の発展には、血管構造を有し機能する 3 次元細胞組織を生体外(in vitro)で作製することが必要不可欠である。本研究は自己組織的組み立て及びマイクロマニピュレーション技術の併用により 1 次元マグネットファイバーから血管構造を含む 3 次元細胞組織を作製し、in vitro での臓器機能発現を目指す。我々がこれまで開発してきた磁性粒子を含むマイクロゲルマイクロファイバーを基に、①着磁装置によるファイバーの磁化、②自己組織的組み立て及びマイクロ磁気操作を用いたマグネットファイバーによる血管構造を模した 3 次元構造の構築、③ファイバー周囲への細胞播種、④ファイバーの融解による血管構造の作製及び臓器機能評価、を行う。これにより血管構造及び臓器機能を有する cm スケール in vitro 細胞組織の構築を世界に先駆けて実現する。

3. 研究の方法

本研究では血管構造作製のために、直径 50~1000 μm の磁性材料入りマイクロゲルマイクロファイバーの作製技術及び局所磁場操作による 3 次元ファイバー操作技術 (図 1) を用いる。磁力による自己組織的組み立てとマイクロマニピュレーション技術を組み合わせ、マグネットファイバーによる 3 次元血管形状を模した構造を作製する。その後、ファイバー周囲に細胞を懸濁させたコーラゲン溶液を流し込み固め、ファイバーのみを選択的に溶かし出すことにより細胞構造体内に血管構造を作り出す上記研究目的を実現するため、下記の 4 つの主要な研究課題を本研究で設定する。①着磁装置によるファイバーの磁化、②自己組織的組み立て及びマイクロ磁気操作を用いたマグネットファイバーによる血管構造を模した 3 次元構造の構築、③ファイバー周囲への細胞播種、④ファイバーの融解による血管構造の作製及び臓器機能評価。これにより、in vitro 3 次元細胞組織、特に肝臓組織の実現を目指す。

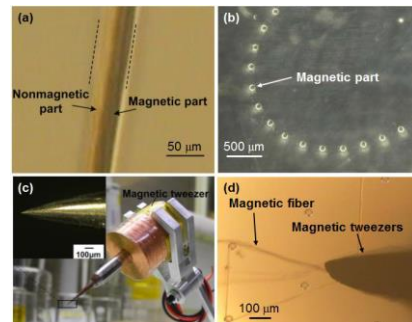


図 1 磁性マイクロゲルマイクロファイバー (a)(b) セグメント化された磁性ファイバー、(c) マグネットツイザー、(d) ファイバー操作

4. 研究成果

マグネットファイバーを操作し、狙った血管形状へと配置するためには、局所的な磁場操作が必要となる。特に、本研究では肝小葉に着目をし、六角形形状の各頂点及び中心の 7 点において磁場を操作するためのマグネットツイザーシステムを構築した。図 2 にそのシステムを示す。このように、上下それぞれ 7 本ずつのマグネットツイザーがあり、上下一組のマグネットツイザーは鉄心を把持するようになっている。

このマグネットツイザーシステムを用いて 3 次元血管構造の構築を行った。構築手順を図 3 に示す。まず、フェライト粒子を内包するマイクロファイバーをアルギン酸ゲルで作製する。このファイバーを着磁装置に入れ着磁することにより、マグネットファイバーができる。このマグネットファイバーを図 2 に示すマグネットツイザーシステムに入れると、マグネットファイバーが中心の鉄心から周辺の鉄心を橋渡しする形で接着する。その後、マグネットファイバーの周りを細胞入りのフィブリンゲルで満たし、鉄心を抜いた後にマグネットファイバーを融解させると、肝小葉のような血管形状を有する細胞組織を作製することができる。

このようにして作製した 3 次元血管構造を図 4 に示す。

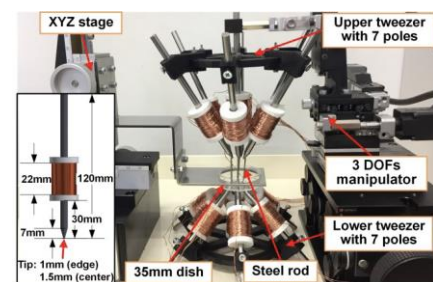


図 2 上下 7 本ずつのマグネットツイザーシステムによるマグネットファイバーの操作

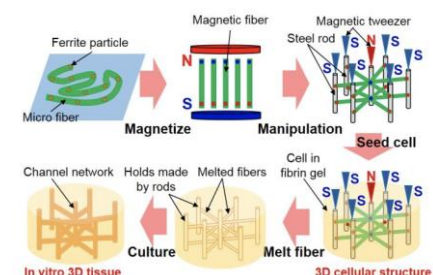


図 3 マグネットファイバーを用いた 3 次元血管構造構築手法

このように、中心の静脈に当たる箇所に赤色に染色した純水を入れると、作製した血管構造を通り細胞組織全体に純水が広がっていく様子が確認できた。

最後に、作製した細胞組織内での細胞生存率を評価した。その結果を図 5 に示す。緑色蛍光が生細胞、赤色蛍光が死細胞を示しており、血管構造に近い細胞ほど生存率が高く保持されていることが明らかとなった。この結果より、大きな細胞組織を構築する際には酸素や栄養を供給する血管構造を入れることが重要であることが裏付けられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Zeyang Liu, Minmin Lu, Masaru Takeuchi, Yue Tao, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, Toshio Fukuda, In Vitro Mimicking the Morphology of Hepatic Lobule Tissue Based on Ca-Alginate Cell Sheets, *Biomedical Materials*, vol. 13, p. 035004, 2018.
- ② Huaping Wang, Jianing Li, Juan Cui, Zhiqiang Zheng, Qing Shi, Tao Sun, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Microrobotic Assembly of Shape-customized Three-Dimensional Microtissues based on Surface Tension Driven Self-alignment, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, vol. 17, pp. 684-687, 2018.
- ③ Xiaoming Liu, Huaping Wang, Tao Sun, Ning Yu, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Automated Fluidic Assembly of Microvessel-Like Structures Using a Multi-Micromanipulator System, *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 23, pp. 667-678, 2018.
- ④ Masaru Takeuchi, Tomoyuki Oya, Akihiko Ichikawa, Akiyuki Hasegawa, Masahiro Nakajima, Yasuhisa Hasegawa, Toshio Fukuda, Multi-Layered Channel Patterning by Local Heating of Hydrogels, *IEEE Robotics and Automation Letters*, vol. 2, pp. 958-963, 2017.
- ⑤ Zeyang Liu, Masaru Takeuchi, Masahiro Nakajima, Chengzhi Hu, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Three-dimensional hepatic lobule-like tissue constructs using cell-microcapsule technology, *Acta Biomaterialia*, vol. 50, pp. 178-187, 2017.
- ⑥ Huaping Wang, Juan Cui, Zhiqiang Zheng, Qing Shi, Tao Sun, Xiaoming Liu, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Assembly of RGD-Modified Hydrogel Micromodules into Permeable Three-Dimensional Hollow Microtissues Mimicking in Vivo Tissue Structures, *ACS Applied Materials & Interfaces*, DOI: 10.1021/acsami.7b10960, pp. 41669-41679, 2017.
- ⑦ Xingfu Li, Qing Shi, Huaping Wang, Tao Sun, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Magnetically-guided assembly of microfluidic fibers for ordered construction of diverse netlike modules, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 27, p. 125014, 2017.
- ⑧ Tao Sun, Huaping Wang, Qing Shi, Masaru Takeuchi, Masahiro Nakajima, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Micromanipulation for Coiling Microfluidic Spun Alginate Microfibers by Magnetically Guided System, *IEEE Robotics and Automation Letters*, vol. 1, pp. 808-813, 2016.
- ⑨ Zeyang Liu, Masaru Takeuchi, Masahiro Nakajima, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Shape-controlled high cell-density microcapsules by electrodeposition, *Acta Biomaterialia*, vol. 37, pp. 93-100, 2016.
- ⑩ Tao Sun, Qiang Huang, Qing Shi, Huaping Wang, Chengzhi Hu, Pengyun Li, Masahiro Nakajima, Toshio Fukuda, Assembly of alginate microfibers to form helical structure with micromanipulation using magnetic field, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 26, doi:10.1088/0960-1317/26/10/105017, 2016.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Taro Kozuka, Masaru Takeuchi, Akiyuki Hasegawa, Eunhye Kim, Akihiko Ichikawa and Toshio Fukuda, Studing Making Micro Structure with Biodegradable Materials, 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2018.
- ② Takuto Nomura, Masaru Takeuchi, Akihiko Ichikawa, Eunhye Kim, Akiyuki Hasegawa and Toshio Fukuda, Cultured Muscles with Tendon Structures for Modular Bio-Actuators, 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2018.
- ③ Eunhye Kim, Masaru Takeuchi, Taro Kozuka, Takuto Nomura, Ryohei Sakurai, Akiyuki Hasegawa, Akihiko Ichikawa and Toshio Fukuda, Magnetic Assembly of Hydrogel Fiber for Constructing Three-dimensional Hepatic Lobule-like Channel Network, 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2018.
- ④ Masaru Takeuchi, Taro Kozuka, Eunhye Kim, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda and Yasuhisa

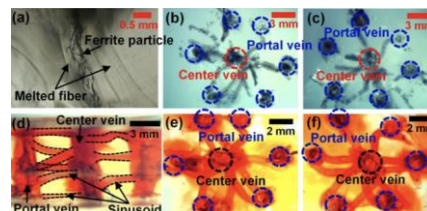


図 4 作製した 3 次元血管構造

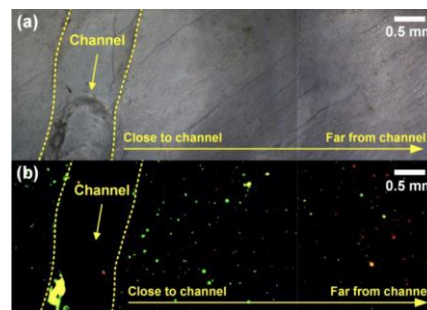


図 5 血管構造を有する細胞組織の細胞生死判別結果

- Hasegawa, Cell Culture on Biodegradable Microstructures using On-chip Fabrication of Photocrosslinkable Hydrogel, International Conference on Manipulation, Automation and Robotics at Small Scales, Nagoya, Japan, July, 2018.
- ⑤ Eunhye Kim, Masaru Takeuchi, Wataru Atou, Yuta Iwamoto, Takuto Nomura, Taro Kozuka, Akiyuki Hasegawa, Akihiko Ichikawa, and Toshio Fukuda, Construction of Hepatic Lobule-like Vascular Network by using Magnetic fields, 2018 IEEE International Conference on Robotics and Automation, Brisbane, Australia, May, 2018.
 - ⑥ Masaru Takeuchi, Mamoru Hattori, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Yasuhisa Hasegawa, Magnetic self-assembly of Toroidal Microstructures by Shaking, 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2017.
 - ⑦ Eunhye Kim, Masaru Takeuchi, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Construction of Vascular Network in 3D Cellular Structure by using Magnetic Field, 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2017.
 - ⑧ Zeyang Liu, Minmin Lu, Masaru Takeuchi, Yue Tao, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, Toshio Fukuda, In Vitro Mimic of Hepatic Lobule Tissue using Ca-alginate Cell-containing Hydrogel Modules, 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2017.
 - ⑨ Yuta Iwamoto, Kenichi Ohara, Masaru Takeuchi, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Fabrication Consideration of Three-dimensional Skeletal Muscle Fiber using Biomaterial, 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2017.
 - ⑩ Zeyang Liu, Masaru Takeuchi, Yasuhisa Hasegawa, Toshio Fukuda, Qiang Huang, Bio-fabrication of Ca-alginate cell sheets with the electrodeposition method for hepatic lobule tissue reconstructs, 21th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Savannah, USA, Oct., 2017.
 - ⑪ Masaru Takeuchi, Yuki Nakamura, Akihiko Ichikawa, Akiyuki Hasegawa, Yasuhisa Hasegawa, Toshio Fukuda, On-Chip Fabrication of Movable Toroidal Cell Structures Using Photo-Crosslinkable Biodegradable Hydrogel, 2017 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, Vancouver, Canada, 2017.
 - ⑫ Zeyang Liu, Minmin Lu, Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Yasuhisa Hasegawa, Toshio Fukuda, Qiang Huang, Fabrication of Multilayered Hepatic Lobule Tissues Using Ca-Alginate Hydrogel Platforms, 17th IEEE International Conference on Nanotechnology, Pittsburgh, USA, July, 2017.
 - ⑬ Yuta Iwamoto, Kenichi Ohara, Masaru Takeuchi, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Fabrication method of artificial integrated muscle fiber toward bio-actuator, 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Nov., 2016.
 - ⑭ Tomoyuki Oya, Masaru Takeuchi, Kenichi Ohara, Akihiko Ichikawa, Masahiro Nakajima, Toshio Fukuda, Selective channel fabrication by local heating for cell patterning, 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Nov., 2016.
 - ⑮ Masaru Takeuchi, Mamoru Hattori, Akihiko Ichikawa, Kenichi Ohara, Masahiro Nakajima, Toshio Fukuda, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, Self-assembly of toroidal magnetic microstructures towards in vitro cell structures, 2016 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, Deajeon, Korea, Oct., 2016.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：竹内 大

ローマ字氏名：(TAKEUCHI masaru)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院工学研究科

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁)：20713374

研究分担者氏名：市川 明彦

ローマ字氏名：(ICHIKAWA akihiko)

所属研究機関名：名城大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20377823

研究分担者氏名：中島 正博

ローマ字氏名：(NAKAJIMA masahiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：工学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：80377837

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。