

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19016

研究課題名(和文)細胞風呂敷による異種細胞集塊複合構造体の形成と機能評価

研究課題名(英文)Formation and characterization of heterocellular aggregates prepared with cellular furoshiki

研究代表者

神谷 典穂(Kamiya, Noriho)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：50302766

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、酵素反応を用いて調製される酸化還元応答型ハイドロゲルを利用し、異なる細胞から構成される凝集構造(ミニ組織構造)を得ることを試みた。まず、ハイドロゲル上で2次元状細胞集塊(細胞シート)を調製した。その上に、3次元球状細胞集塊(スフェロイド)を添加した後、還元剤を添加することでハイドロゲル構造を崩壊すると、細胞シートの自発的収縮に伴いスフェロイドがラッピングされる様子が観察された。得られた細胞集塊構造の機能は、細胞の種類と組み合わせ、添加剤により変化することが確認された。以上のことから、細胞シートを風呂敷と見立て、これによりスフェロイドを包括・培養する新たな系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体系を構成する様々な組織は、多様な細胞から構成される。1993年に米国研究者により提唱された組織工学という学問分野は、細胞からの組織構築を標榜し、再生医療や薬物スクリーニングのための細胞アッセイ技術へと広く展開されている。そこでは、より天然の生体組織に近い構造や機能を有する複数種の細胞からなる組織構造体の構築が必要とされている。本研究で提案する細胞風呂敷によるラッピングという新たな概念は、ミニ組織構造体を調製するための1つの技術として位置付けられ、また、特別な装置を必要としないことから、ハイドロゲルを基材として利用する細胞培養技術に新しい汎用的な選択肢を提示するものである。

研究成果の概要(英文):Herein we present a potential strategy for constructing three-dimensional cellular architectures comprising different types of viable cells. The strategy uses a redox-responsive hydrogel that degrades under mild reductive conditions. A confluent monolayer of cells (i.e., cell sheet) cultured on the hydrogel surface was used to wrap other cells. Wrapping a different cell type and collagen beads in the co-culture improved cell viability and metabolism in the proliferation rate of the cells when compared with a two-dimensional culture under the same conditions. We designated the method of using a cell sheet to wrap other cells, the 'cellular Furoshiki'. A key concept of this study to wrap biological entities by cellular Furoshiki would provide a new, simple and fast method to generate higher-order cellular aggregates wherein different types of cellular components are included.

研究分野：生体分子工学

キーワード：細胞培養 ハイドロゲル 細胞集塊 酵素 酸化還元反応 細胞シート 増殖因子 区画化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生細胞を主要構成要素とする細胞集塊の形成は、目的とする細胞を空間的に配置し、より天然に近い3次元状組織様構造を形成するための第一歩となる。1993年に Langer と Vacanti により細胞からの組織構築を標榜して提唱された組織工学という学問分野は、近年、再生医療や薬物スクリーニングのための細胞アッセイ技術へと展開され、天然の生体組織を構造・機能的に模倣した複数種の細胞からなる組織構造体の構築が必要とされている。その基本となる細胞培養法に目を向けると、多様な基材を用いた細胞培養法が提案されているが、多くは2次元平面上での培養が主流であり、より高次の細胞集塊構造を自在に設計するための技術は限定的である。従って、3次元的に細胞を培養する場を提供が可能な足場となる基材を用いて、異種細胞からなる高次の細胞集塊複合構造体を、意図する様式で簡便に形成するための基盤技術の構築は、細胞を対象とする基礎研究から開発研究まで幅広い学術領域において求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、当研究室で開発された独自技術により得られる酸化還元応答型ハイドロゲル (Redox-Gel) を用いて、異なる形態と次元を有する細胞集塊からなるミニ組織構造を形成することを目標とした。具体的には、2次元状に細胞が伸展・集積化した板状細胞集塊 (細胞シート) を Redox-Gel 上で形成し、そこに3次元状に細胞が集積・凝集した球状細胞集塊 (スフェロイド) を播種する。スフェロイドが細胞シート上に接着・培養することを確認した後、細胞シート形成を担保する足場となっている Redox-Gel を還元条件下で崩壊することで、細胞シートが自己収縮する性質を利用して、スフェロイドをラッピングし、そのまま包括培養を継続してより高い次元の細胞集塊構造を形成するという戦略である。これにより、スフェロイドを形成する細胞を核として、シートを構成する細胞がその周囲を効果的に覆うことで、異種細胞界面が広く存在する細胞凝集構造を、極めて簡便に得られる可能性がある。異なる次元を有する細胞集塊を同一反応場で融合して得られる複合構造体の機能評価を通して、本手法の有用性と頑強性を示し、3次元組織構造形成における新たな概念を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (3-1) 異種細胞増殖因子の捕捉・徐放可能なハイドロゲルの設計と評価

多様な細胞を長期間に渡り安定に培養することが可能なハイドロゲル基材の調製を目的として、細胞外マトリクスの主要成分であるコラーゲン由来のゼラチンと、生体内で様々な増殖因子を捕捉することが知られているヘパリンを構成成分とするハイブリッド型 Redox-Gel ゲルを調製し、NIH3T3 線維芽細胞ならびにヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 細胞の培養挙動に与える影響を検討した。

#### (3-2) 同一ゲル基材を用いた異次元細胞集塊の形成と細胞集塊ラッピング技術の確立

(3-1)で確立した Redox-Gel ハイドロゲルを足場とした細胞培養系を用いて、当初目標である細胞シート (二次元シート状細胞構造体) を風呂敷と見立てたスフェロイド (三次元細胞集塊) の包括・培養系を構築する。具体的には、NIH3T3 線維芽細胞により細胞シートを形成した後、別途調製したヒト肝癌由来 HepG2 細胞からなるスフェロイドを細胞シート上に播種・接着する。その後、還元条件下においてハイドロゲル基材を崩壊させ、細胞シートの自発的な収縮に伴うスフェロイドのラッピング挙動を追跡する (図1)。ハイドロゲル基材の物理的・化学的特性が細胞増殖に与える影響を総合的に評価し、形状と性質の異なる異種細胞集塊を同一反応場で得るために必要な細胞培養条件を精査することで、本手法を確立する。

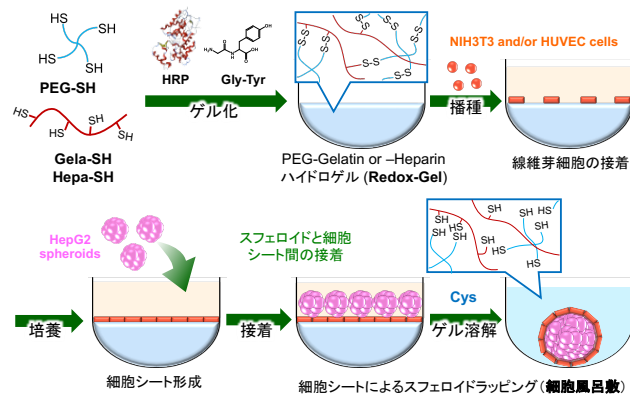


図1 球状細胞集塊(スフェロイド)の板状細胞集塊(細胞シート)による包括法。細胞シートを風呂敷に見立てたラッピング技術: '細胞風呂敷法'の提案

#### (3-3) リキッドマーブルのハイドロゲル化による新たな細胞集塊構造形成法の確立

新しい細胞培養の場としてリキッドマーブル (Liquid Marble) を取り上げ、その内水相をゲル化したハイドロゲルマーブルを細胞培養の場として利用することを試みる。本項目は、(3-2)におけるスフェロイド形成の新たな手法を模索する中で生まれた新しい課題である。

### 4. 研究成果

#### (4-1) 異種細胞増殖因子の捕捉・徐放可能なハイドロゲルの設計と評価

チオール基修飾 4 分岐型ポリエチレングリコール、チオール基修飾ゼラチンならびにヘパリンからなるハイブリッド型 Redox-Gel を調製し、その物理化学的特性を評価した。その結果、

前処理方法の異なるゼラチンがヘパリンとのハイブリッドゲル形成と、得られるハイドロゲルの物理化学特性に多大な影響を与えることが明らかとなった。最適化されたハイブリッド型 Redox-Gel に複数の増殖因子を包括固定し、ゲル上で NIH3T3 線維芽細胞ならびにヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 細胞を培養したところ、ハイドロゲル上に接着・伸展しながら細胞が増殖する様子が確認された。2次元状細胞シートの形成速度は、足場となるゲルの特性と増殖因子の有無により大きく異なり、シート形成を効果的に促進可能な条件を決定することができた。(研究成果：ACS Applied Bio Materials, 2(6), 2600-2609 (2019))

#### (4-2) 同一ゲル基材を用いた異次元細胞集塊の形成と細胞集塊ラッピング技術の確立

(4-1) で確立した条件下、NIH3T3 線維芽細胞シートを形成し、市販のスフェロイド形成用プレートで作製したヒト肝癌由来 HepG2 細胞スフェロイドを細胞シート上に播種し、伸展した細胞シートの足場を還元条件下で崩壊させた。この時、還元剤濃度を適切に調整することで崩壊速度を制御することで、細胞シートの自発的な収縮過程を利用してスフェロイドを包括ラッピング可能なことを実証した(図2)。さらに、既報を参照し、ゼラチンを基材として調製したマイクロビーズとヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 細胞を、スフェロイドのラッピングの過程で

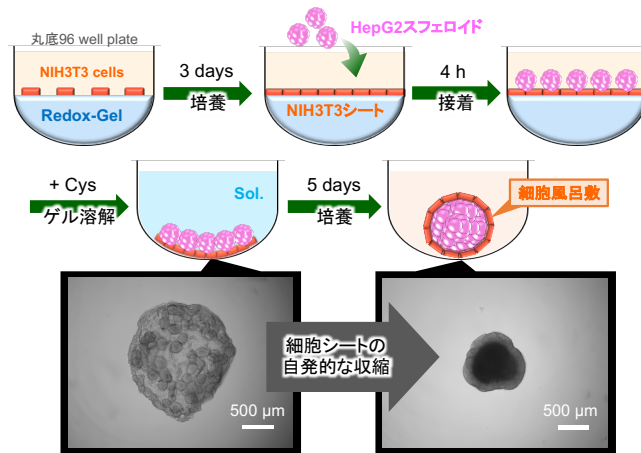


図2 酸化還元応答性ハイドロゲル基材の崩壊に伴うヒト肝癌由来HepG2スフェロイドのNIH3T3線維芽細胞シートによるラッピング例

同時包括することで、HepG2 細胞の機能が向上可能なことを確認した。結果として得られる異種細胞からなる巨大な高次細胞集塊複合構造体について、HUVEC 細胞を選択的に染色することでその内部構造を観察したところ、ゼラチンビーズの周囲で HUVEC 細胞が選択的に増殖し、細胞外マトリクスを介したネットワーク構造が形成されていることを見出した。以上より、細胞シートを風呂敷に見立て、球状細胞スフェロイドをラッピングし、コアシェル型異種細胞複合構造体の形成を可能にする新しい細胞培養方法を提案することができた。(研究成果：Scientific Reports, 10, Article number: 6710 (2020))

#### (4-3) リキッドマーブルのハイドロゲル化による新たな細胞集塊構造形成法の確立

新しい細胞培養の場としてリキッドマーブル (Liquid Marble, LM) を取り上げ、その内水相をゲル化したハイドロゲルマーブル (Hydrogel Marble, HM) を調製し、細胞培養の場として利用することを試みた。チオール基修飾4分岐型ポリエチレングリコール、Gly-Tyr ならびに HRP を含む HepG2 細胞懸濁液を調製し、Poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) 微粒子上に滴下して転がすことで LM を作製した。これを湿潤条件下、CO<sub>2</sub> インキュベーター内、37°C で数時間温置することで HM を得た。HM 表面の PTFE 粒子を除去した後、培地中に添加することで培養を継続したところ、スフェロイドの形成が確認された(図3)。さらに、得られる HM の物理的特性が細胞特性に与える影響を検討したところ、(4-1) で検討したチオール化ゼラチンの同時封入によりサイズの異なるスフェロイドが形成されることを見出し、高次細胞集塊構造の簡易調製に新たな選択肢を提示する成果を得た。(研究成果：J. Biosci. Bioeng., in press. (2020))

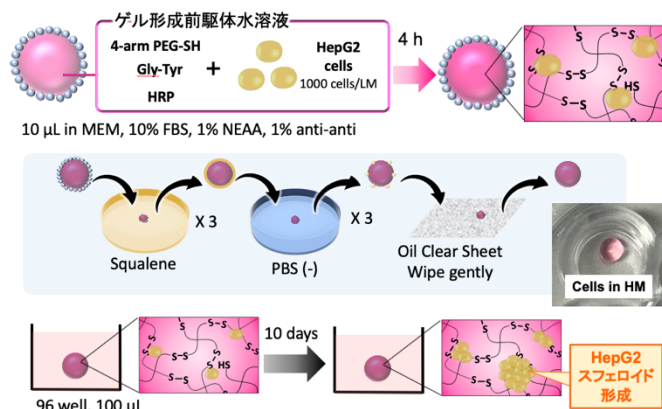


図3 Liquid Marble内水相のハイドロゲル化と機能性高分子導入により得られるスフェロイド培養が可能な Hydrogel Marble の設計

以上のように、チオール基が導入された多様な高分子基材を機能ユニットとするハイドロゲルを利用した異次元細胞集塊からなる異種細胞複合構造の構築とその応用について多角的に検討を実施し、新たな学術的知見(原著論文4報)を得た。また、本成果の学会発表を通して、新たな社会的価値を包含する成果に繋がる企業との共同研究に繋がった。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ramadhan Wahyu, Kagawa Genki, Hamada Yusei, Moriyama Kousuke, Wakabayashi Rie, Minamihata Kosuke, Goto Masahiro, Kamiya Noriho	4. 巻 2
2. 論文標題 Enzymatically Prepared Dual Functionalized Hydrogels with Gelatin and Heparin To Facilitate Cellular Attachment and Proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 2600 ~ 2609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.9b00275	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 Wahyu Ramadhan, Genki Kagawa, Kousuke Moriyama, Rie Wakabayashi, Kosuke Minamihata, Masahiro Goto, Noriho Kamiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Construction of higher-order cellular microstructures by a self-wrapping co-culture strategy using a redox-responsive hydrogel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63362-4	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 -

1. 著者名 Rie Wakabayashi, Wahyu Ramadhan, Kousuke Moriyama, Masahiro Goto, Noriho Kamiya	4. 巻 accepted.
2. 論文標題 Poly(ethylene glycol)-based biofunctional hydrogels mediated by peroxidase-catalyzed cross-linking reactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Journal,	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-020-0344-7	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 Kamiya Noriho, Ohama Yuki, Minamihata Kosuke, Wakabayashi Rie, Goto Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Liquid Marbles as an Easy to Handle Compartment for Cell Free Synthesis and In Situ Immobilization of Recombinant Proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1800085 ~ 1800085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201800085	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 Wahyu Ramadhan, Yuki Ohama, Kosuke Minamihata, Kousuke Moriyama, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya	4. 巻 accepted.
2. 論文標題 Redox-responsive functionalized hydrogel marble for the generation of cellular spheroids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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24件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Noriho Kamiya
2. 発表標題 Enzymatic biomolecular engineering toward designer bioconjugates and biomaterials
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (ACB 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Ohama, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya
2. 発表標題 Cell-free protein synthesis inside liquid marbles toward molecular evolution
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriho Kamiya
2. 発表標題 Biomolecular engineering by biocatalysis for designer bio-based functional materials
3. 学会等名 International Symposium of Innovative Bio-production Indonesia on Biotechnology & Bioengineering (ISIBio2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 W. Ramadhan, G. Kagawa, K. Moriyama, R. Wakabayashi, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya.
2. 発表標題 A self-wrapping co-culture strategy for the construction of higher-order cellular architecture by using redox-responsive hydrogel
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 九州ブロック第9回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大瀨有紀、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 微小ゲル内での無細胞合成系を利用したタンパク質スクリーニング系の構築
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 九州ブロック第9回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 W. Ramadhan, G. Kagawa, K. Moriyama, R. Wakabayashi, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya.
2. 発表標題 A 'cellular furoshiki' strategy for the construction of higher-order cellular architecture by using redox-responsive hydrogel
3. 学会等名 12th AFOB Regional Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山幸祐、山口恭平、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 酵素仲介型ゲル化プロセスの高効率化に向けた添加剤の効果
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大瀨有紀、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 Liquid marble内でのタンパク質合成とその固定化系の確立
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大瀨有紀、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 機能化タンパク質固定化Hydrogel marbleのオンデマンド作製
3. 学会等名 第29回九州若手ケミカルエンジニア討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田祐成、南畑孝介、W. Ramadhan、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 機能性分子の直交型固定によるハイドロゲル基材への細胞培養機能の付与
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大瀨有紀、南畑孝介、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 Liquid marbleを反応場とする無細胞タンパク質合成系とゲル化による産物の捕捉
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田祐成, 南畑孝介, W. Ramadhan, 後藤雅宏, 神谷典穂
2. 発表標題 機能性分子の直交型固定によるハイドロゲル基材への細胞培養機能付与
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Ohama, Kosuke Minamihata, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya
2. 発表標題 Enzymatic hydrogelation of liquid marbles for in situ immobilization of cell-free synthesized recombinant proteins
3. 学会等名 The 24th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大瀧有紀, 南畑孝介, 若林里衣, 後藤雅宏, 神谷典穂
2. 発表標題 分子進化系を志向した自立液滴中での無細胞タンパク質合成系の構築
3. 学会等名 化学工学会第84年会学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田祐成, 香川元気, 南畑孝介, 若林里衣, 後藤雅宏, 神谷典穂
2. 発表標題 タンパク質を機能性ユニットとして導入可能なハイドロゲル基材の設計
3. 学会等名 第54回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 濱田祐成、香川元気、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 細胞包括培養への利用を志向した機能化ハイドロゲル基材の設計
3. 学会等名 第28回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会、熊本
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Noriho Kamiya
2. 発表標題 Biocatalyst Engineering toward Biomedical Applications
3. 学会等名 ACB 2017, Khon Kaen, Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G. Kagawa, Y. Hamada, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya
2. 発表標題 Design of redox-responsive hydrogel with functional biomolecular units for cell culture
3. 学会等名 Biomaterial International 2017, 福岡国際会議場 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神谷 典穂, 濱田 祐成, 香川 元気, 南畑 孝介, 若林 里衣, 後藤 雅宏
2. 発表標題 タンパク質成分の導入による酸化還元応答性ハイドロゲルの細胞培養基材としての機能化
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会、早稲田大学
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱田祐成、香川元気、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 Development of hydrogels capable of presenting heterogeneous functional molecules and application to cell culture
3. 学会等名 化学工学会第49回秋季大会、名古屋大学
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 N. Kamiya, G. Kagawa, Y. Hamada, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto
2. 発表標題 Redox-responsive hydrogel functionalized with biomolecular units for biomedical applications
3. 学会等名 YABEC 2017 Symposium, Xi ' an, China (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香川元気、濱田祐成、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 細胞培養基材としての増殖因子固定化酸化還元応答性ハイドロゲルの設計
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G. Kagawa, Y. Hamada, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto., N. Kamiya
2. 発表標題 Disulfide-linked hydrogel scaffold designed with functional proteins as a cell culture platform
3. 学会等名 30th International Symposium on Chemical Engineering, KAIST, Korea (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱田祐成、香川元気、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂
2. 発表標題 異種機能性分子を提示可能な直交型ハイドロゲル基材の設計
3. 学会等名 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会、福岡
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	水本 博  (Mizumoto Hiroshi)	九州大学・工学研究院化学工学部門・准教授	