

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20105

研究課題名(和文)光反応性マトリックスによる幹細胞凝集体に対する光形態制御技術の開発

研究課題名(英文)Development of photo-controlled morphogenesis for stem cell aggregates using photo-reactive matrices

研究代表者

山本 雅哉 (Yamamoto, Masaya)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：10332735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞凝集体から立体組織の形成を誘導する技術は、オルガノイドなどを用いた再生医療や創薬において注目されている。本研究では、細胞の自発的な形態制御をハイドロゲルと光反応とを組み合わせた光形態制御により修飾する技術について検討した。その結果、ハイドロゲルの物性や細胞接着分子のパターニングが、細胞が自発的に形成する形態に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、磁力を用いた新しいサンドイッチ培養法により容易に3次元培養が可能となることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞から体外で立体組織を構築する技術は、広範囲の学術的・社会的意義が期待される。すなわち、発生生物学の学術的発展に加え、再生医療で用いる移植組織や創薬に用いる動物実験代替物まで、様々な“ものづくり”に成り得る。このため、再生医療、創薬、材料科学など広い学術分野への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The technique of inducing the formation of a three-dimensional tissue from an aggregate of stem cells has attracted attention in regenerative medicine and drug discovery using organoids. In this study, we investigated a technique for modifying the spontaneous morphology control of cells by photo-controlled morphogenesis that combines hydrogel and photoreaction. As a result, it was clarified that the physical properties of hydrogel and the patterning of cell adhesion molecules influence the morphology of cells spontaneously forming. Furthermore, it was also shown that the new sandwich culture method using magnetic force facilitates three-dimensional culture.

研究分野：再生医療

キーワード：立体組織 光加工 幹細胞凝集体 オルガノイド 光形態制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立により (Yamanaka et al., *Cell* 2007)、再生医療の加速化が世界的に期待されている。特に、幹細胞から体外で立体組織を構築する技術は、広範囲の学術的・社会的意義が期待される。すなわち、発生生物学の学術的発展に加え、再生医療で用いる移植組織や創薬に用いる動物実験代替物まで、様々な“ものづくり”に成り得る。しかし、細胞だけでは立体組織を形成させることはできない。このため、複数の細胞からなる細胞凝集体を部品として利用して、立体組織を人工的に組み立てる技術が注目されている。

立体組織を人工的に組み立てるためには、部品となる細胞凝集体を再現性よくつくる必要がある。しかし、骨や軟骨など、数 cm の組織をつくるための従来の再生医療技術を、数百 μm の細胞凝集体に適用することはできない。このため、マイクロ流体デバイスを用いて、細胞からなる部品を機械的につくる技術が研究されている (S. Takeuchi et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015)。

幹細胞凝集体から立体組織を自発的に形成させるオルガノイド培養 (M. Eiraku et al., *Nature Commun.* 2015) が開発され、一部のオルガノイドは体内で機能することも示されている (T. Takebe et al., *Dev. Biol.*, 2016)。すなわち、自発的に形づくられたオルガノイドは、機械的に形づけられた細胞凝集体と比べて、より生理的に機能することが期待される。

本研究では、従来の発生生物学にはない、幹細胞凝集体の光形態制御技術という材料科学に基づく新規性の高いアイデアによって、立体組織を構築する技術を発展させる。得られる研究成果には、発生生物学のみならず、再生医療、創薬、材料科学など広い学術分野への波及効果が期待できる。本研究は、発生生物学、材料科学、いずれの分野にも類を見ない萌芽的なチャレンジであり、挑戦的研究として意義深いことは疑いないと考えられる。

2. 研究の目的

細胞結合の制御は、組織や器官の形づくりに必要不可欠である。細胞は、自ら細胞接着分子を産生したり、分解したりすることによって、結合する細胞を選択する。この細胞結合の選択は、自発的な組織や器官の形づくりの基盤となる生理的機能である。本研究の目的は、細胞の持つ、細胞結合に基づく組織や器官の形づくりと光加工とを有機的に結びつけることによって、組織や器官を模倣した立体組織を構築する、光形態制御技術、および3次元培養技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞の3次元培養のためのサンドイッチ培養

基材として貯蔵弾性率の異なる PAAm ハイドロゲルを作製した。すなわち、アクリルアミド水溶液 (30 w/v%) と *N,N'*-methylene-bisacrylamide (BIS) の混合溶液 (10 ml) に ammonium peroxodisulfate (100 μl)、および *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (4 μl) を室温で 20 分間反応させた。BIS の濃度を変化させることで異なる弾性率をもつ PAAm ハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルの貯蔵弾性率は動的粘弾性測定装置 (Haake RheoStress 1, Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて評価した。

PAAm ハイドロゲルを直径 14 mm、厚さ 0.3 mm に成型した。次に、*N*-hydroxysuccinimide (NHS) 基と azide 基とを末端にもつ sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitro-phenyl-amino)hexanoate (sulfo-SAMPAH) のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (1 mg/ml, PBS 溶液, pH=7.4) を PAAm ゲル表面に滴下し、紫外光照射 (照射強度 120 mW/cm²、照射時間 3 分) を行うことで、PAAm ハイドロゲル表面に NHS 基を導入した。導入した NHS 基を利用してフィブロネクチン (FN) を固定化した。得られた FN 固定化 PAAm ハイドロゲル上でイヌ腎臓尿細管上皮細胞 (MDCK 細胞) を培養した。

(2) 光反応を利用した細胞接着因子のパターン固定化による3次元培養の空間的制御

光反応を利用して、PAAm ハイドロゲルの表面に対して、FN をパターン固定化した。まず、シリコンウェハー (信越化学工業株式会社製) の表面にネガ型フォトリソをスピナーにより厚み 40 μm にコーティングした後、フォトマスクを介して紫外光照射 (照射強度 20 mW/cm²、照射時間 7 秒) を行った。アセトンにより、非感光部を除去後、主剤 (SILPOT 184 東レ・ダウコーニング株式会社製) と硬化剤 (CATALYST SILPOT 184 東レ・ダウコーニング株式会社製) の混合溶液 (重量比 10:1) を流し込み、100°C で 1 時間加熱することで硬化させ、表面に凹凸を有する PDMS スタンプを作製した。FN 水溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を PDMS スタンプ表面に滴下、乾燥後、種々の重合度 (500, 1000, 1800, 2400, 3300 けん化度 86~90%) のポリビニルアルコール (PVA) フィルムに密着させた。次に、(1) と同様の方法により、光反応を利用して NHS 基を表面に導入した PAAm ハイドロゲルと PVA フィルムとを 30 分間密着させた後、重炭酸緩衝液 (pH=8.0) で PVA フィルムを洗い流すことで、PAAm ハイドロゲル上に FN をパターン固定化した。

より簡便な方法で細胞接着因子をパターン固定化するために、光塩基発生剤と紫外光照射とを組み合わせることに、塩基性の高い部分を PAAm ハイドロゲル表面に対して、パターン導入した。すなわち、1,2-Diisopropyl-3-[bis(dimethylamino)methylene]guanidium 2-(3-benzoylphenyl) propionate (WPBG-266) 水溶液にハイドロゲルを浸漬後、フォトマスクを介して紫外光照射 (照射強度 2.67 mW/cm²、2 min) を行った。得られたハイドロゲルを 50% 酢酸で洗浄後、ハイドロゲル

ルを 52°C で異なる時間処理することによって、PAAm のアミド基をパターン加水分解した。このパターン加水分解した PAAm ハイドロゲルに対して、ペプチド合成により作製した様々な細胞接着分子をパターン固定化した。

(3) 3次元培養としての磁気誘導を利用したサンドイッチ培養

官能基を付与した酸化鉄ナノ粒子として、カルボキシ基を有するポリアクリル酸(PAAc)を被覆した酸化鉄ナノ粒子を作製した。すなわち、塩化鉄(II)、塩化鉄(III)、水酸化ナトリウムおよび PAAc を溶解させた水溶液を 95°C に加温することによって、PAAc 被覆酸化鉄ナノ粒子を得た。得られた PAAc 被覆酸化鉄ナノ粒子に対する評価として、透過型電子顕微鏡(TEM)、動的光散乱(DLS)、試料振動型磁力計(VSM)、X線回折を用いた測定を行った。次に、PAAc 被覆酸化鉄ナノ粒子のカルボキシ基とコラーゲンゲル内のアミノ基とを縮合することによって、酸化鉄ナノ粒子を化学固定した酸化鉄ナノ粒子含有コラーゲンゲルを作製した。得られたゲルを細胞培養液に浸漬し、異なる表面磁束密度をもつネオジム磁石を用いて磁力を付加した。コラーゲンゲルから細胞培養液中に漏出した酸化鉄ナノ粒子を、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)を用いて定量した。

次に、コラーゲンゲル内で MDCK 細胞が 3次元管腔構造を形成する性質を利用して、コラーゲン固定化ハイドロゲルでサンドイッチした MDCK 細胞から管状上皮形成を誘導する 3次元細胞培養技術について検討した。すなわち、磁性粒子を含有したハイドロゲルで MDCK 細胞を挟み込み、磁力によりハイドロゲルを用いた MDCK のサンドイッチ状態を維持した。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞の 3次元培養のためのサンドイッチ培養

図 1 にコラーゲンゲル培養した MDCK 細胞の光学顕微鏡観察結果を示す。図から明らかのように、MDCK 細胞は、3次元培養することによって、形態が変化する。この形態変化を指標にして、サンドイッチ培養に用いるハイドロゲルの貯蔵弾性率が MDCK 細胞の形態変化に与える影響について検討した。その結果、図 2 に示す通り、軟らかいハイドロゲルを用いた場合、形態変化が認められるものの、その度合いは、ハイドロゲルの貯蔵弾性率が高くなるにつれて減少した。以上より、細胞形態変化の制御のためには、用いるハイドロゲルの硬さを最適化する必要があることがわかった。

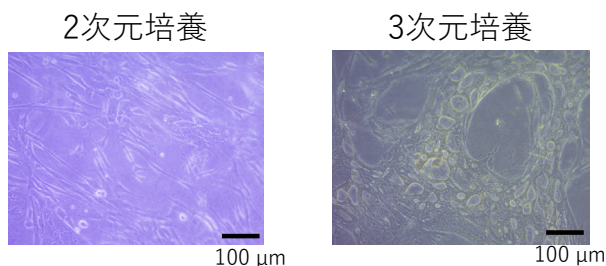


図 1 MDCK 細胞の 3次元培養

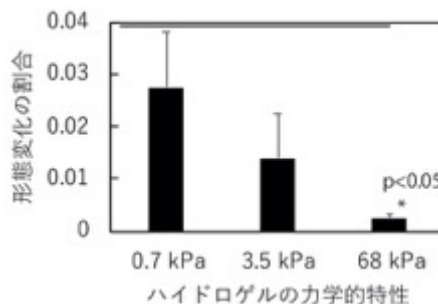


図 2 形態変化に与える貯蔵弾性率の影響

(2) 光反応を利用した細胞接着因子のパターニングによる 3次元培養の空間的制御

図 3 は重合度 3300 の PVA フィルムを用いて FN をパターン固定化した蛍光顕微鏡画像ならびに輝度を示す。PDMS の凸部と輝度の高い部位とが一致し、FN がパターン固定化されたことを示している。また、種々の重合度の PVA フィルムを用いて PAAm ハイドロゲル上に FN をパターン固定化し、PDMS スタンプの凸部ならびに FN 固定化パターンとの相関性を RMS により評価したところ (図 4)、PVA の重合度が 3300 では PAAm soft, mid, stiff の RMS 値がそれぞれ 0.108 ± 0.082 , 0.09 ± 0.038 , 0.108 ± 0.076 となり、よい一致を示した。一方、PVA の重合度が 1000 より低くなると RMS 値が大きくなるということがわかった。これは、重合度が低い PVA ではハイドロゲル中の水を吸収し、ハイドロゲルの形が大きく変化するためだと考えられる。

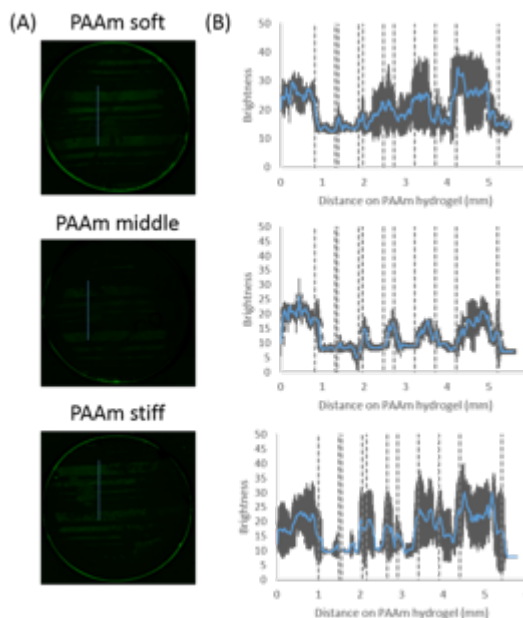


図 3 FN のパターン固定化 (右図)

(A) FN 染色、(B) 染色輝度

PAAm soft (0.7 kPa), PAAm-middle (3.5 kPa), PAAm stiff (68 kPa)

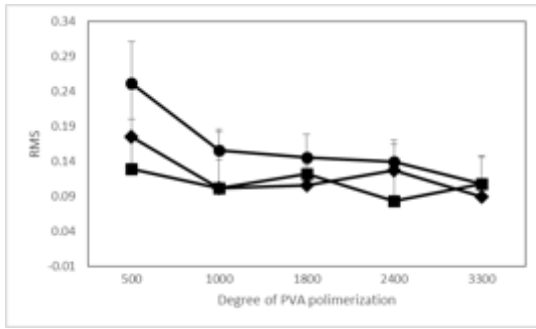


図 4 PVA のケン化度が FN 固定化に与える影響
PAAm soft (■), PAAm middle (▲), PAAm stiff (●)

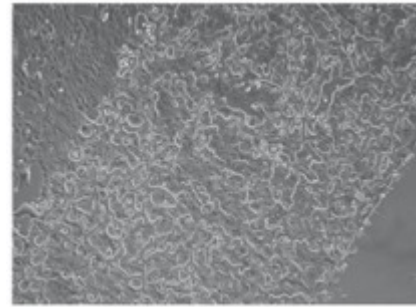


図 5 FN パターン固定化ハイドロゲルを用いたサンドイッチ培養による MDCK の形態変化

FN をパターン固定化した PAAm ハイドロゲル上で、MDCK 細胞を培養したところ、パターン上に細胞が接着していることがわかった。(図 5) これは、固定化された FN に生物活性があることを示している。この方法に基づき、細胞接着分子をパターン固定化することにより、3次元培養の空間的制御が可能であることがわかった。

一方、光塩基発生剤と紫外線照射とを組み合わせることにより発生したパターン塩基によって、アミド基の加水分解をパターンニングすることができた(図 6)。これにより、より簡便な方法でハイドロゲル表面の細胞接着分子をパターンニングできることがわかった。

フォトマスク

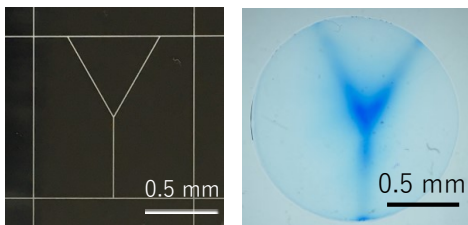


図 6 光塩基発生剤を利用したパターン加水分解導入されたカルボキシ基をトルイジンブルーにより染色

(3) 3次元培養としての磁気誘導を利用したサンド

塩化鉄(II)ならびに塩化鉄(III)の水溶液を混合後、水酸化ナトリウム水溶液を添加することにより、酸化鉄を得た。X線回折や磁化率測定により、磁性粒子の合成を確認した。得られた磁性粒子を含有した PAAm ハイドロゲルを調製し、コラーゲンを固定化した。2次元培養した MDCK 細胞を、磁性粒子を含有したハイドロゲルによりサンドイッチ後、ネオジウム磁石を用いてサンドイッチ状態を維持した。位相差顕微鏡を用いて観察したところ、ハイドロゲルでサンドイッチした MDCK 細胞の形態は、2次元培養とは異なり、3次元構造を形成していた。一方、ネオジウム磁石を用いない場合、この3次元構造の形成は認められなかった。(図 7) 以上の結果は、磁力により維持されたサンドイッチ培養により、2次元培養した上皮細胞から管状上皮形成が誘導されることを示唆している。

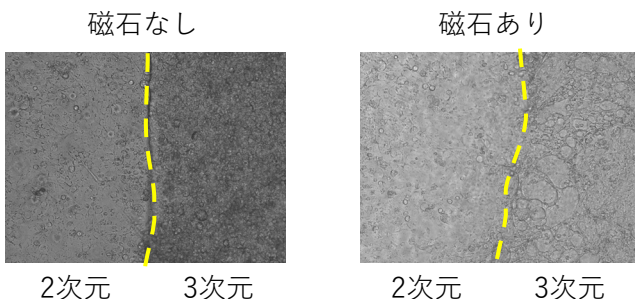


図 7 磁気誘導を利用した MDCK 細胞のサンドイッチ培養

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Nobuyuki, Oishi Yoshifumi, Yamamoto Masaya	4. 巻 221
2. 論文標題 The Design of Sulfobetaine Polymers with Thermoresponsiveness under Physiological Salt Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Macromolecular Chemistry and Physics	6. 最初と最後の頁 1900429 ~ 1900429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/macp.201900429	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 Morii Chiharu, Tanaka Hiroyoshi Y., Izushi Yasuhisa, Nakao Natsumi, Yamamoto Masaya, Matsubara Hiromi, Kano Mitsunobu R., Ogawa Aiko	4. 巻 8
2. 論文標題 3D in vitro Model of Vascular Medial Thickening in Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.00482	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 Inoo Kanako, Yamamoto Masaya, Tabata Yasuhiko	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Preparation of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres of sugar-responsive water-solubilization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	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) 10.1002/term.3076	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 山本雅哉	4. 巻 36
2. 論文標題 未来を担う・未来に繋ぐ組織工学	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオマテリアル	6. 最初と最後の頁 324-327
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 無
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16件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Yamamoto Masaya
2. 発表標題 Engineering Cell Aggregates with Biomaterials
3. 学会等名 2019 BK21 Plus (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Masaya
2. 発表標題 Smart Responsive Materials in Drug Delivery and Tissue Engineering
3. 学会等名 ASEAN + 5 Course on Bioceramics and Tissue Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Masaya
2. 発表標題 3D Tissue Processing Using Stimuli-Responsive Biomaterials
3. 学会等名 PRICM 10 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Masaya
2. 発表標題 In vitro tissue engineering by stimuli-responsive biomaterials
3. 学会等名 GFMAT/Bio-4 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤泰河、山本雅哉
2. 発表標題 3次元培養のための酸化鉄ナノ粒子含有コラーゲンゲルの作製
3. 学会等名 日本金属学会2019年秋期講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suto Taiga、Yamamoto Masaya
2. 発表標題 Magnetic Force - Assisted Sandwich Culture for Epithelial Cells
3. 学会等名 TERMIS-AP/ABMC2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雅哉、最上譲二
2. 発表標題 細胞膜上の生体分子と相互作用する生体材料の分子設計
3. 学会等名 高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 再生医療
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤泰河、山本雅哉
2. 発表標題 3次元管状上皮形成誘導のための磁性粒子含有ハイドロゲルの作製
3. 学会等名 日本人工臓器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Masaya
2. 発表標題 Bioengineering Challenges Toward Regenerative Medicine
3. 学会等名 ICBD 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 生体機能性材料の再生医療への応用
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suto Taiga, Tokuda Mayumi, Yamamoto Masaya
2. 発表標題 Magnetic Force-Assisted Sandwich Culture to Create 3D Microenvironment for Epithelial Cells
3. 学会等名 MRM2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 Design of a Sacrificial Template to Fabricate Collagen Hydrogels with a Microchannel Structure
3. 学会等名 第35回国際フォトポリマーコンファレンス（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 ハイドロゲルを用いたin vitro組織形成
3. 学会等名 第1回日本金属学会第4分野講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 再生医療における組織工学の新展開
3. 学会等名 第55回再生医療ネットワーク研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 Organs-on-a-Chip開発における再生医療技術の重要性
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019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 分担 者	田畑 泰彦 (Tabata Yasuhiko) (50211371)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	