

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K12088

研究課題名（和文）立体臓器チップ構築に向けた細胞単層の自動3D化技術の基盤開発

研究課題名（英文）Development of platform technologies for automated three-dimensional aggregation of cell monolayers for constructing organ chips.

研究代表者

岩井 良輔（Iwai, Ryosuke）

岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・講師

研究者番号：60611481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本課題においては、我々の開発した細胞単層の自己凝集誘導技術（CAT）と任意形状に加工した臓器チップ用の培養区画（チャンバー）を組み合わせることで、血管内皮細胞、骨格筋細胞や軟骨細胞などをチャンバー内に播種して単層形成させるだけで、細胞種の由来組織の形状を有する3次元組織体（毛細血管、骨格筋様のファイバー形状や気管軟骨様のリング形状など）を作製することに成功した。また、CATを誘導する領域をデザインすることで、細胞単層と3次元細胞組織体が連結した特殊な構造体を作製することもできた。一方、CATによって作製した組織体への薬剤添加によって生体組織と同様の反応性を示すことを確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身の薬物動態である吸収、分布、代謝と排泄を評価できる培養系、即ち人体の臓器を培養皿に再現した「生体/臓器チップ」が実現すれば、莫大な試験費用と倫理的な問題を抱える動物実験に代わる次世代の創薬試験系となり得ると期待されている。本研究では、臓器チップのための培養区画内（チャンバー）に機能的な3次元組織体を細胞を播くだけで簡易かつ再現性良く作製することができた。臓器チップを用いた次世代創薬試験系の基盤技術と成り得ると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we succeeded in automatically forming three-dimensional (3-D) tissue constructs mimicking living tissue structures such as capillaries, skeletal muscle-like fibers, and tracheal cartilage-like rings fixed at specific positions in arbitrarily shaped culture dishes by inducing the self-aggregation of cell monolayers using our cell monolayer self-aggregation induction technology (CAT). In the same manner, we have also succeeded in preparing a unique structure in which cell monolayers and 3-D tissues are seamlessly connected by designing CAT induction area. Then, we demonstrated the responsiveness similar to that of living tissues by adding drugs to such tissue constructs.

研究分野：組織工学

キーワード：臓器チップ 細胞自己凝集化 培養皿加工 薬剤応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身の薬物動態である吸収(A)、分布(D)、代謝(M)と排泄(E)(ADME)を評価できる培養系、即ち人体の臓器を培養皿に再現した「生体/臓器チップ」は、莫大な試験費用と倫理的問題を抱える動物実験に代わる次世代の創薬試験系となり得ると期待されている。この実現のためには、培養皿上でADMEの役割を担う細胞を生体内の環境に近い薬剤反応性を発揮できるように、それぞれの細胞種に適した2次元(2D)細胞単層、あるいは3次元(3D)細胞組織の形態に作り分け、さらに臓器チップのための培養区画(チャンパー)内の任意の位置に固定し得るような組織工学的な基盤技術の開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発した「接着細胞単層の自己凝集化技術(CAT)」を用いて、臓器チップへの応用を想定したチャンパー内に細胞を播種して形成させた細胞単層シートの自己凝集を誘導することで、チャンパー内に位置固定された3Dの細胞組織体や、2Dの細胞単層と3D細胞組織体が連結した構造体を、細胞を播種するだけの単純操作で自動的に形成させる組織工学的基盤技術を開発すること目的とした。

3. 研究の方法

3 - 1 チャンパーの作製

3D細胞組織体を作製して固定化するための培養区画であるチャンパーは、シリコン板(厚さ1mm)を任意形状に切り抜き、市販の細胞培養皿上に貼付することで作製した。

3 - 1 - 1 3D細胞組織体の作製

長方形やダンベル形状(長辺幅約1~5cm)に切り抜いたシリコン板を培養皿底面に貼付して作製したチャンパーの長辺両端から数mm内側の短辺中央部に直径2~6mmの円盤状のシリコン板を細胞凝集塊の位置固定のための支持材として貼付した(図1)。CAT用のポリマー水溶液(日産化学株式会社より供与)をチャンパーの底面に塗布した後、細胞を播種し培養した。

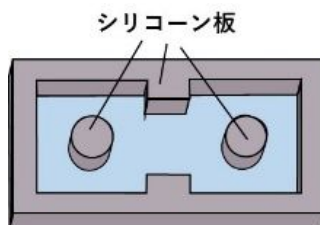


図1 3D細胞組織体作製のためのチャンパー設計

3 - 1 - 2 2D細胞単層-3D細胞組織連結構造体の作製

長方形に切り抜いたシリコン板を培養皿の底面に貼付してチャンパーとし、底面中央部の限定した領域(3D組織化領域)にのみCAT用のポリマーを塗布した後、細胞をチャンパー底面全体に播種して培養した(図2)。ここで、CAT用のポリマーを塗布していない領域は、2D細胞単層維持領域となる。

水色: CATポリマー塗布領域 (3D細胞組織化)
橙色: CAT未塗布領域 (2D細胞単層維持)

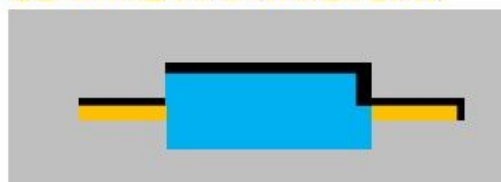


図2 2D細胞単層-3D細胞組織連結構造体作製のためのチャンパー設計

3 - 2 薬剤反応評価

チャンパー内に形成した毛細血管様ファーバー状組織体に血管毒性試薬である塩化カドミウムを添加して培養した。

4. 研究成果

4 - 1 - 1 3D 細胞組織体の作製

チャンバー底面に細胞が接着して形成した細胞単層の自発的な剥離と凝集化がチャンバーの辺縁から中心に向かって生じた。細胞単層の凝集化は播種 1 日後には支持材によって塞ぎ止められ、2 点の支持材の間にファイバー状の細胞凝集塊がチャンバー内に位置固定された状態で形成した (図 3)。続いて、約 2 週間培養する間に、血管内皮細胞と血管間質細胞の混合懸濁液を播種した場合は、ファイバー内部に複数の毛細血管様管腔構造体、外表面に緻密な敷石状の内皮層が形成、筋芽細胞を用いた場合は筋管形成した筋線維が形成するなど、成熟した 3D ファイバー状の細胞組織体を得ることができた。さらに、異なる種類の細胞をチャンバー内の任意の領域に分けて播種して培養することで、筋線維と腱組織が連結した生体骨格様の構造体を得ることもできた。また、チャンバー内の 2 カ所に設置した支持材を、チャンバー中央部の 1 カ所のみにするすることで、円盤形的支持材の周囲にリング状の細胞凝集塊を形成させることもでき、軟骨細胞を用いることで気管様の軟骨リングを作製することも可能であった。

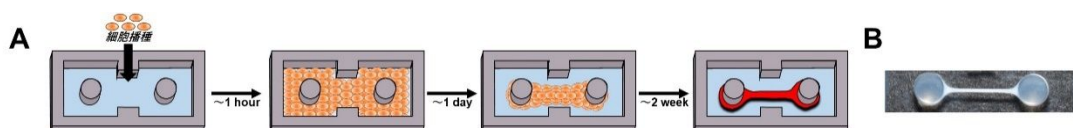


図 3 チャンバー内に播種した細胞の単層形成に続く自己凝集。組織化の模式図 (A) と血管内皮細胞と血管間質細胞を用いて作製した毛細血管様ファイバー状組織体 (B)

4 - 1 - 2 2D 細胞単層-3D 細胞組織連結構造体の作製

チャンバー内に播種した細胞は、3D 細胞組織化領域と 2D 細胞単層維持領域のいずれの培養表面にも接着して隙間のない細胞単層を形成し、約 1 日後には 3D 細胞組織化チャンバー内の細胞のみが単層細胞との細胞間接着を維持した状態で自己凝集・3D 化することで細胞接着単層と 3D 細胞組織体が連結した構造体が形成した (図 4)。

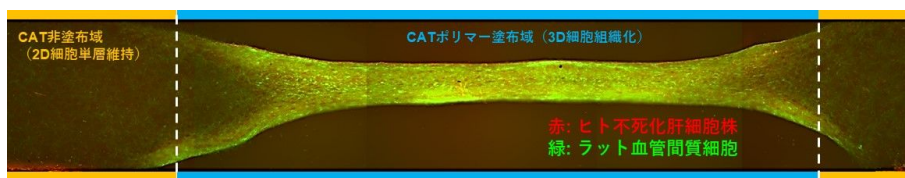


図 4 肝細胞と血管間質細胞から成る 2D 細胞単層-3D 細胞組織連結構造体

4 - 2 薬剤反応評価

毛細血管様ファイバー状組織体を例に、D 細胞組織体の薬剤反応性を調べるために、組織体を塩化カドミウム含有培地で培養した結果、組織体は断裂することなくファイバー形状を維持した一方で、その外表面の内皮層は細胞間結合が失われて敷石状の内皮層が消失することが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 2件）

1. 著者名 Hiwatashi Shohei, Iwai Ryosuke, Nakayama Yasuhide, Moriwaki Takeshi, Okuyama Hiroomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Successful tracheal regeneration using biofabricated autologous analogues without artificial supports	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-022-24798-y	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 Ota Tomoyuki, Iwai Ryosuke, Kitaguchi Yohei, Takarada Takeshi, Kimata Yoshihiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Fabrication of scaffold-free mesenchyme tissue bands by cell self-aggregation technique for potential use in tissue regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 065021 ~ 065021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1748-605X/ac9c7f	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 Ayumi Yoshitsuru, Kei Fujiwara, Taiju Yoneda, Yayoi Izu, Shingo Hashimoto, Takeshi Moriwaki and Ryosuke Iwai	4. 巻 4
2. 論文標題 Optimization of culture protocols of myoblasts and tenocytes for the preparation of skeletal-like muscle-tendon connected tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bull. Inst. Front. Sci. Tech., Okayama Univ. of Sci., No.4	6. 最初と最後の頁 21-24
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 森脇健司, 高野祐哉, 藤崎和弘, 笹川和彦, 太田風輝, 岩井良輔	4. 巻 32
2. 論文標題 接着力分布が計測できるフィルムセンサの開発：培養細胞のカモニタリングを目指して	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 第32回バイオエンジニアリング講演会講演論文集	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 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 -

1. 著者名 太田風輝, 森脇健司, 岩井良輔	4. 巻 32
2. 論文標題 接着細胞の自己凝集化技術を用いたスキャホールドフリー骨格筋線維構造体の自動作製	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 第32回バイオエンジニアリング講演会講演論文集	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 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 -

1. 著者名 Takeshi MORIWAKI, Kazuhiro FUJISAKI and Kazuhiko SASAGAWA	4. 巻 4
2. 論文標題 Adhesion Force Measurement with a Flexible Film-type Sensor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Experimental Mechanics	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 -

1. 著者名 長島諒, 岩井良輔, 中山泰秀	4. 巻 47
2. 論文標題 立体臓器チップの構築に向けた細胞の自己集合化技術を用いた3次元組織化チャンパーの設計と作製	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 41
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36件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥山宏臣, 樋渡勝平, 岩井良輔, 中山泰秀
2. 発表標題 Scaffold-free軟骨リングで強化されたコラーゲンチューブによる気管再生技術-ラットモデルにおける全周性気管置換-
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤 魯鵬, 福島宗一郎, 小泉 誠, 岡野ジェイムス洋尚, 岩井良輔
2. 発表標題 動脈瘤治療用途を指向した長尺ファイバー状幹細胞凝集塊の作製と評価
3. 学会等名 日本組織培養学会 第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田智之, 太田智之, 高尾知佳, 岩井良輔, 山田大祐, 北口陽平, 北口陽平, 森脇健司, 中村正裕, 大曾根達則, 木股敬裕, 宝田剛志
2. 発表標題 自己凝集化技術を応用した形状型スキャフォールドフリー三次元培養軟骨の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北口陽平, 太田智之, 太田智之, 高尾知佳, 岩井良輔, 山田大祐, 藤澤祐樹, 大曾根達則, 森脇健司, 中村正裕, 木股敬裕, 宝田剛志
2. 発表標題 形成外科領域における細胞自己凝集化技術を用いたスキャフォールドフリー三次元軟骨培養法の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lupeng Teng, Soichiro Fukushima, J. Hirotaka Okano, Ryosuke Iwai
2. 発表標題 Preparation of contrast agent-loaded cell aggregates by using cell self-aggregation technology
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森脇健司, 橋本真悟, 小栗大侑, 岩井良輔
2. 発表標題 スキャホールドフリー骨格筋細胞組織体の形成とその発揮力計測
3. 学会等名 第 33 回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 細胞凝集化技術の開発と生体模倣組織体の作製～再生医療、創薬試験や 研究ツールへの応用を目指して～
3. 学会等名 第65回日本平滑筋学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 細胞の自己凝集化技術の開発と組織形成への応用展開
3. 学会等名 日本組織培養学会 第95回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 滕魯鵬, 中桐僚子, 木股敬裕, 岩井良輔
2. 発表標題 細胞自己凝集化技術を用いたファイバー状細胞凝集塊の作製とex vivo組織培養評価
3. 学会等名 日本組織培養学会 第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 荷電高分子で細胞の接着力を制御し凝集化させる～接着細胞の自己凝集化誘導技術の開発と組織工学への応用展開～
3. 学会等名 日本生物工学会 生物工学シンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田風輝, 森脇健司, 岩井良輔
2. 発表標題 One-step fabrication and evaluation of scaffold-free skeletal muscle-like fiber tissues by using a novel cell self-aggregation technology with specifically designed culture chamber
3. 学会等名 日本生体医工学学会 生体医工学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本真悟, 杉山晶彦, 岩井良輔
2. 発表標題 細胞自己凝集化技術と培養チャンバー設計による ファイバー状組織体の作製と血管内皮毛細管の配向化検討
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本真悟, 滝澤 昇, 岩井良輔
2. 発表標題 接着細胞の自己凝集化技術 (CAT) を用いた毛細血管構造を有するスフェロイドの作製
3. 学会等名 日本組織培養学会 第92回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoyuki Kusaka, Shingo Hashimoto, Natsuki Abe, Kohei Suzuki, Yoshiomi Hiroi, Taito Nishino, Ryosuke Iwai
2. 発表標題 Development of a novel cell self-aggregation technology for the quick preparation of 3D cell aggregated tissues having various sizes and shapes
3. 学会等名 The European Society for Artificial Organs Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本真悟, 滝澤 昇, 岩井良輔
2. 発表標題 接着細胞の自己凝集化技術を用いた3次元毛細血管集合体の作製と形状制御
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森脇健司, 岩井良輔, 太田風輝, 藤崎和弘, 笹川和彦
2. 発表標題 フレキシブルフィルム力分布センサシステムの開発：動物細胞計測に向けて
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島竜弥, 神吉けい太, 岩井良輔
2. 発表標題 細胞外マトリクス含有培地を用いた血管内皮細胞を含む細胞凝集体作製
3. 学会等名 第7回細胞凝集研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田風輝, 森脇健司, 岩井良輔
2. 発表標題 接着細胞の自己凝集化技術を用いたスキャホールドフリー骨格筋線維構造体の自動作製
3. 学会等名 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森脇健司, 高野祐哉, 藤崎和弘, 笹川和彦, 太田風輝, 岩井良輔
2. 発表標題 接着力分布が計測できるフィルムセンサの開発: 培養細胞のカモニタリングを目指して
3. 学会等名 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島竜弥, 岩井良輔, 神吉けい太
2. 発表標題 細胞二段階凝集法による肝小葉模倣組織作製の可能性
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

1. 発表者名 草加直幸, 橋本慎吾, 太田風輝, 長島諒, 滝澤昇, 安部菜月, 鈴木康平, 広井佳臣, 西野泰斗, 岩井良輔
2. 発表標題 接着細胞の自己凝集化技術の開発と薬物評価用3D細胞組織体作製への応用
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

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 動物細胞の自己凝集化誘導技術の開発と医療応用に向けた取り組み
3. 学会等名 次世代アニマルセルインダストリー研究部会 設立記念シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 接着細胞の自己凝集化技術を用いたOrgans on a Chip作製のための組織作製法の開発
3. 学会等名 第6回細胞凝集研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 培養皿上で人体の組織を再現 (生) する ~ 培養細胞から老いへの挑戦状 ~
3. 学会等名 油化学シンポジウム in 岡山 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井良輔, 長島諒
2. 発表標題 接着細胞単層の自動凝集3D化技術の開発とOrgans-on-a-chipへの応用検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会 (CHEMINAS37)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草加直幸, 安部菜月, 鈴木康平, 広井佳臣, 西野泰斗, 岩井良輔
2. 発表標題 接着細胞の自己集合化誘導剤を用いた新規スフェロイド作製法の開発と評価
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高木 睦、岩井 良輔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 コロナ社	5. 総ページ数 230
3. 書名 セルプロセッシング工学 (増補)	

〔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	神吉 けい太 (Kanki Keita) (10516876)	岡山理科大学・工学部・准教授 (35302)	
研究 分担者	船山 麻理菜 (Marina Funayama) (30713599)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員 (24403)	
研究 分担者	森脇 健司 (Takeshi Moriwaki) (50707213)	弘前大学・理工学研究科・准教授 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------