

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21911

研究課題名(和文) 光合成能を有する立体細胞組織作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of engineered 3D tissue constructs having photosynthetic capacity

研究代表者

清水 達也 (SHIMIZU, Tatsuya)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40318100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞用の培養液中で長期に生存・増殖し光合成能を保持することが可能な藻類株を選別し、動物筋細胞と選別された藻類を用いて、共培養組織作製条件および組織培養条件について詳細に検討した。その結果、厚みが0.3 mm未満であれば細胞損傷のない良好な藻類・動物細胞共培養組織が作製できる条件が確認された。また得られた知見をもとにヒトiPS細胞由来心筋細胞と藻類との共培養組織を作製し、自立拍動を呈する藻類含有心筋組織の作製に成功した。本結果は光合成能と収縮能をあわせ持つ立体筋組織の開発における第一歩とみなせる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてはヒトiPS細胞由来心筋細胞と藻類との共培養組織を作製し、自立拍動を呈する藻類含有心筋組織の作製に成功した。光合成で生体エネルギーを供給できる立体組織の作製は、これまでの学術に革新をもたらす世界的にも極めて独創的で挑戦的なものである。本研究成果は光合成能と収縮能をあわせ持つ立体筋組織の開発における第一歩とみなせる。今後より厚みを有した立体組織の作製が可能となれば、再生医療のみならず広範な学術分野に応用展開される可能性を有しており、学術的にも社会的にも大きな意義を持っていると考える。

研究成果の概要(英文)：Algal strains that can survive and retain photosynthetic ability in the culture medium for animal cells were selected. The conditions for co-culture tissue engineering and culturing were examined in detail using animal muscle cells and the selected algae. As a result, we confirmed that algae/animal cell co-cultured tissues without cell damage can be prepared when the thickness is less than 0.3 mm. Based on the obtained results, we succeeded in engineering algae-containing myocardial tissue that beats spontaneously by using human iPS cell-derived cardiomyocytes. These results can be regarded as the first step toward the development of three-dimensional muscle tissue with both photosynthetic and contractile capabilities.

研究分野：再生医療、組織工学、心筋再生、循環器内科

キーワード：組織工学 藻類 光合成 筋細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞から生体組織を工学的手法により構築する技術、およびその研究分野は「組織工学」と呼ばれる。組織工学の大きな目的の一つは、細胞を用いて病気を治療する「再生医療」のための移植用組織を作製することである。組織工学の現状における大きな課題として、通常の培養方法において厚みが100 μmを越える組織を構築すると、組織内部において酸素・栄養不足と老廃物の蓄積が生じ、細胞が壊死してしまうという問題が挙げられる。これを解決するため我々は、酸素・栄養を供給し老廃物を取り除くための血管網を組織の中に構築する研究を進めてきた (Shimizu T, et al. FASEB J. 2006;20:708, Sakaguchi K, et al. Sci Rep. 2013;3:1316, Sekine H, et al. Nat Commun. 2013;4:1399)。このように実際の生体組織を模倣した組織構築を目指す研究アプローチは世界的にも一般的なものであり、極めて競争が激しい研究領域となっている。このような正攻法の研究アプローチに加え、同時に我々は世界的にも極めて独創的なアプローチでも研究を実施すべく準備を進めてきた (Haraguchi Y, et al. Sci Rep. 2017;7:41594)。それが本研究課題「光合成能を有する立体細胞組織作製技術の開発」である。動物細胞組織の中に藻類を組み込むことにより光合成で生体エネルギーを供給できる立体組織の作製を目指す本研究は、これまでの学術に革新をもたらす世界的にも極めて独創的で挑戦的なものである。またこの新技術が確立されれば、再生医療のみならず広範な学術分野に応用展開される可能性を有しており、挑戦的研究として極めて大きな意義を持っていると考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、微細藻類を内包する厚みのある細胞組織を構築することである (図1)。組織内部に組み込まれた微細藻類が動物細胞の排出する二酸化炭素とアンモニアを取り込み光合成により酸素とグルコースを産生することにより、組織内部において細胞が壊死せずに生存し続けることができる厚みのある細胞組織の構築を目指す。これにより、実際の生体とはまったく異なるメカニズムで、生体エネルギーを光合成により得ることができる未来の立体細胞組織の作製を可能とする、組織工学におけるまったく新しい基盤技術を開発する。この新技術が確立されれば、複雑な血管網の構築と血流を必要とせず、細胞組織内に微細藻類を組み込んで外部から光を照射することにより、厚みのある組織を簡単に作製することが可能となる。また本研究終了時までの具体的な目標を、厚みが1 mm以上の藻類含有筋組織を作製することに設定する。その理由は、本研究の一つの大きな未来目標が、重症心不全を治療するための移植可能な拍動ポンプを作製することにあるからである。患者の血液循環を力学的に補助するためには、大きな収縮力を生み出すことができる筋組織を構築しなければならない。そのためには厚みのある筋組織を構築する必要性が存在する。またこの技術が確立されれば、未来の義手・義足開発や未来のロボットにおけるアクチュエータ開発などへ応用を図ることも可能となる。すなわち本研究によって開発する新技術は、再生医療をはじめとする広範な分野において技術革新を起こし、これまでの学術の方向性を大きく変革して未来へと前進させる潜在性を有している。

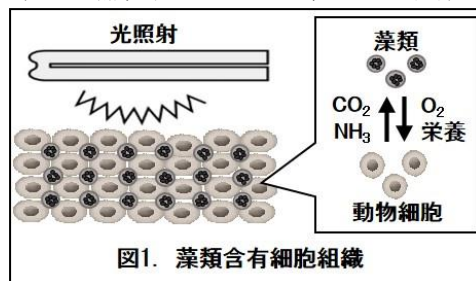


図1. 藻類含有細胞組織

3. 研究の方法

(1) 本研究目的に適した藻類の探索

動物細胞用培養液中で光合成能とアンモニア吸収能を保持することができ、動物細胞と共培養した際に動物細胞に傷害を与えない藻類を探索・選定する。

(2) 光照射フィードバック制御による溶存酸素濃度制御培養システムの開発

藻類の光合成能を利用し、藻類と動物細胞を共培養する培養液中の溶存酸素濃度を光照射によってフィードバック制御する培養システムを開発する。これにより、作製する細胞組織の生存に適した溶存酸素濃度への制御を可能とする。

(3) 藻類含有筋組織作製法の開発

選定した藻類と筋細胞 (心筋または骨格筋) を用い、藻類含有筋組織を作製する。組織作製法として、先行研究による細胞シート積層法に加え、遠心力を利用した新たな方法も検討する。2年次終了時に厚み0.3 mm以上の藻類含有筋組織を作製することを目標とする。

(4) 藻類含有筋組織の収縮機能評価

作製した藻類含有筋組織の収縮機能を計測する。先行研究で開発した収縮力測定システム (Sasaki D, et al. PLoS One. 2018;13:e0198026) を本研究用に改良して計測を実施する。

(5) グルコース分泌藻類の開発

遺伝子組換え技術や酵素の利用により藻類から細胞外にグルコースを供給する手法を開発する。これにより細胞組織内部に酸素のみならずグルコースを供給することが可能となる。これにより厚み1 mm以上の藻類含有筋組織を作製することを目標とする。

4. 研究成果

(1) 本研究目的に適した藻類の探索

動物細胞用の培養液中で長期に生存・増殖し光合成能を保持することが可能な藻類株を4種選別した。

(2) 光照射フィードバック制御による溶存酸素濃度制御培養システムの開発

培養液中の溶存酸素濃度に応じて光合成を誘起するための照射光をON/OFF制御するシステムを開発した。また照射光の波長制御条件を検討し、波長560 nm以上の光を使用することにより光合成を誘起しつつ光照射による動物細胞へのダメージを低減可能なことを明らかにした。

(3) 藻類含有筋組織作製法の開発

立体組織の作製には遠心力を利用した組織作製法を利用した。動物細胞としてはマウス筋芽細胞株(C2C12)、マウス線維芽細胞(NIH3T3)を用い、また藻類としては、動物用培養液にて一定期間培養が可能であることを確認した4種の藻類株を用いた。動物細胞と藻類種を様々な組み合わせ及び配合比において用いることにより共培養組織を作製した(図2)。さらに光合成を誘起する照射光の強度と波長を様々に変化させて数日間培養し、組織学的解析および培養液成分解析による細胞損傷の解析・評価をおこなった。厚みが0.3 mm未満であれば細胞損傷のない良好な藻類・動物細胞共培養組織が作製できる条件が確認された。しかしながら厚み0.3 mmを超える組織においては、藻類を内包させることによる細胞損傷の抑制を確認できる共培養組織作製・培養条件を見出すことができなかった。

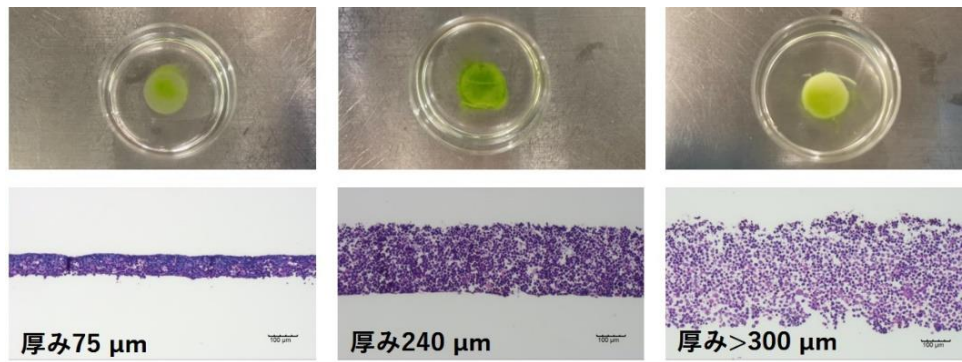


図2. 藻類含有筋組織の作製

(4) 藻類含有筋組織の収縮機能評価

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて藻類との共培養組織作製条件を検討した。また組織は収縮力測定システムに取り付け可能な形状となるようフィブリングルを土台として作製した(図3)。その結果、自律拍動する藻類・心筋共培養組織を作製することに成功した。本結果は光合成能と収縮能を合わせ持つ立体筋組織の開発における第一歩とみなせる。一方で拍動は微弱であり収縮力を検出可能な程の力強い拍動を得るには至らず、今後の課題として残った。

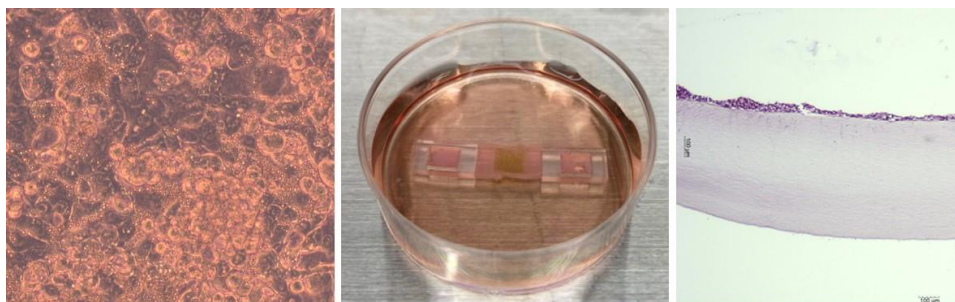


図3. 藻類含有拍動心筋組織の作製

(5) グルコース分泌藻類の開発

動物細胞と藻類との共培養系において、藻類細胞壁分解酵素であるセルラーゼを培養液に添加することにより、藻類から動物細胞へグルコースを供給できる可能性が示唆された。一方、厚み1 mm以上の藻類含有筋組織を作製することを目標としていたが、現状においては組織の厚みを0.3 mm以上に増加させることにもなう細胞損傷の促進を解決するに至らなかった。その原因としては、組織内部における栄養素の欠乏、および光合成により発生する酸素が逆に動物細胞にとっての酸化ストレスとなる可能性が考えられ、今後の課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐々木 大輔 (SASAKI Daisuke) (70439842)	東京女子医科大学・先端生命医科学研究所・特任助教 (32653)	
研究協力者	原口 裕次 (HARAGUCHI Yuji) (80272251)	東京女子医科大学・先端生命医科学研究所・特任准教授 (32653)	

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