

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01299

研究課題名（和文）三次元培養環境場の計測・制御プラットフォームによる組織形成ダイナミクス解析

研究課題名（英文）Dynamic analysis of tissue development by 3D culture platform

研究代表者

萩原 将也（Hagiwara, Masaya）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・理研白眉研究チームリーダー

研究者番号：00705056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：幹細胞からミニ臓器（オルガノイド）の形成においては、個々に解離されて位置情報を失った細胞の集合体を単一の条件で培養し、細胞の自律形成に依存して作られる場合がほとんどであるため、形態が臓器本来のものとはかけ離れている。本研究課題では、我々が開発したCUBE型培養器の中に複数の工学技術を詰め込むことにより、細胞の位置情報、細胞外マトリックスの空間情報、液性因子の濃度勾配を制御する手法を確立した。これにより、培養環境に非対称な場を与え、細胞から組織への自律形成を恣意的に誘導することができるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において開発した手法は、オルガノイドに体軸方向を付与し、より高次な臓器へ成長させるための基盤技術になることが期待できる。実験自体はシンプルなCUBE型培養器に落とし込んでおり、ポンプなどのような外部装置を一切排除して培養できるように落とし込んだため、高い汎用性が期待できる。本技術によりオルガノイドの高次形態を達成することにより、より高精度な創薬モデルとして活用することが期待でき、またデザインされた臓器連関への道筋も見えてくる。

研究成果の概要（英文）：In the formation of mini-organs (organoids) from stem cells, it is common to culture a collection of individually dissociated cells that have lost their positional information under a single condition, relying on the autonomous formation of cells. As a result, the morphology often deviates significantly from that of the original organ. In this research project, we have established a method to control the positional information of cells, the spatial information of the extracellular matrix, and the concentration gradients of humoral factors by incorporating multiple engineering technologies into the CUBE-type culture device we developed. This allows us to provide an asymmetric environment in the culture, thereby enabling the intentional induction of autonomous formation from cells to tissues.

研究分野：バイオエンジニアリング

キーワード：オルガノイド 培養環境制御 三次元培養

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織の形成メカニズムに関しては分子生物学の発展に伴い何の遺伝子がこういった役割を果たしているのか明らかになりつつある。一方で、遺伝子発現の結果として発生する分子濃度勾配変化や集団内応力分布変化といった、場に働くダイナミクスについては、その計測の困難さから驚くほど研究が進んでいない。組織形成過程において、各細胞は逐次変化する場からの情報を取得することで自身の位置情報を取得し、全体として協調して成長方向を決定していると考えられていることから、場に働くダイナミクスを解析することは組織形成システムを理解する上で必要不可欠である。この解析手法の不足は現在急速に研究が進んでいる体外組織再生の分野においてもボトルネックとなっており、有効な手段の確立が急務である。そこで化学相互作用や力学相互作用を反応拡散モデル (T. Miura, J. Biochem., 2015) や vertex モデル (S. Okuda et al., Biomech. Model Mechnobiol., 2013.) を用いて数理モデル化することにより、形態形成における現象の解明を行う研究が進められている。しかし組織サイズのサンプルを高精度に3次元イメージング可能な技術は世界的にも極わずかに限定されており、かつ三次元培養実験に必要なソフトマテリアル内での再現性の高い実験系が不足している。結果としてシミュレーションと実験は何となく似ているといった曖昧性を含むものとなり、実験と数理モデルの間にギャップを生じる要因となっている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、組織培養実験系において圧倒的に不足している時空間計測・制御技術を確立し、得られたデータを数理モデルに還元することで、長年理解が進まなかった組織形成ダイナミクスの解析を目的としている。細胞の三次元動態を計測可能な実験系において細胞培養環境を制御することにより、遺伝子操作とは異なり細胞本来の能力を変えことなく場に定量的な摂動を加えた細胞動態データを取得可能となり、数理モデル内に仮説した現象の立証およびシミュレーションの高精度化による組織形成システムの解明に挑む。

### 3. 研究の方法

まず、気管支上皮細胞の細胞行動における細胞と細胞外マトリックス (ECM) の相互作用を明らかにするため、2次元の実験系において細胞・ECMの両方を任意形状にパターンニングできる手法を開発した (図1)。本手法を用いて、フィブロネクチンを気管支上皮細胞の周囲にパターンニングし、細胞行動を解析した。次に、細胞にマトリゲルを被せ、周囲の非細胞組織が及ぼす細胞行動への影響を、光ピンセットおよび数理モデルを用いて解析した。さらに、3次元の空間制御へと展開するため、我々が開発した CUBE 型培養器を用いて、液性因子およびECMの空間制御技術を開発した。

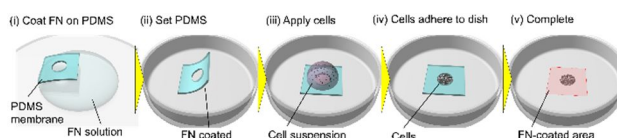


図1：細胞・ECMパターンニング手法

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞 - ECM 相互作用による細胞行動解析

人為的にフィブロネクチンを細胞集団の周囲にコーティングし、細胞行動を解析すると、フィブロネクチンがコーティングされている領域とその外側のコーティングされていない領域の境界まで、単独で近づいた細胞は全て、境界の外に出ることなく引き返すことが確認できた (図2)。一方、集団で境界まで近づいた細胞は、境界の外に出ないようにしながらも、周囲の細胞に押し出され境界の外に出たのち、外に出た細胞はそこでフィブロネクチンを新たに分泌する様子が観察された。このことから、細胞はフィブロネクチンの領域内にとどまろうとする一方、一旦領域外に出た場合は新たに場にマーキングをし、領域を拡大していることが確認された。次に、細胞周囲に存在する細胞外マトリックスの細胞への影響を調べるため、マトリゲルを細胞の上から被せた場合とそうでない場合で細胞行動を観察した。すると、マトリゲルを被せない場合は、細胞は周囲の細胞と接着し集団サイズが大きくなった一方、マトリゲルを被せた場合は、初めは散在していた細胞は動くことができずにいた

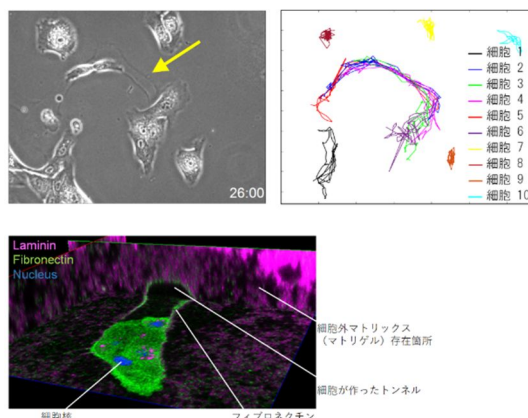


図2：細胞 - ECM 相互作用解析結果

細胞が、時間経過とともに徐々に活動範囲を広げていくことが確認された。また、細胞が通った後の一部には道が残されており、同じ道を他の細胞も追隨しており、この道を染色すると、マトリゲル内で細胞がトンネルを作り、壁にフィブロネクチンが塗布されていることが確認できた。これらの結果から、細胞は周囲にある細胞外マトリックスから抵抗を受けて動きを制限されているものの、時間経過とともにこの周囲からの抵抗を弱めることで細胞外マトリックス内に通りやすい道を作り出して、他の細胞もその道を積極的に通ると仮説した。この仮説を立証するため、光ピンセットを用いた実験データとともに、数理モデルにより細胞行動をしミュレーションし、整合性を取ることができた。

(2) 細胞外マトリックスの空間局在制御技術の確立  
細胞の周囲を取り囲んでいる、非細胞素材であるコラーゲンなどの細胞外マトリックスは、細胞に対して力学的・生化学的なシグナルを与えることで、臓器の成長に大きく関わっている。臓器周辺の細胞外マトリックスの構造・成分は多様であり、細胞が集団として組織を形成する際に位置情報を与える役割も果たる一方、現行の細胞培養はこのマトリックスが細胞周りに均一に配置されるため、細胞に対し適切な空間情報を与えることができていない。本年度は、この細胞外マトリックスの空間多様性を体外で再構築するため、複数のゲルを自在にヒア加工な MultiCUBE の開発を行った(図3)。

断面がL字型のフレームで囲まれた空間(ユニット)を複数持ち、ゲルを表面張力のみで各ユニットにとどめることで、複数のゲルを空間的に配置するプラットフォームを作製した。隣り合うユニット間でゲル同士は接触しているが、ゲルの粘性が高いこともあり、すぐには混じり合わない。ゲルの配置が終わった後にゲルを架橋し固めると、ゲル間に物理的境界がなく細胞が行き来できる一方、位置によってゲル内部の成分が異なる状態をつくり出すことができ、細胞に空間的な情報を与えられるようになる。これにより、異なる物性を持つゲルを立体的に配置するだけでなく、特定の成長因子や細胞をあらかじめゲルに混ぜておくことで、細胞に複数要素の空間的局在を与えることが可能となった。

本プラットフォームを用いて、ヘパリン結合 EGF 様成長因子を混ぜたゲルを、何も混ぜないゲルと隣り合わせに配置し、気管支上皮細胞を一列に並べて培養すると、成長因子を混ぜたユニットのみに分岐が多数形成され、それ以外のユニットは凝集して棒状の形態を形成するという非対称の組織を導くことができた(図4)。このように、細胞周囲環境において成長因子とともに空間的な局在を人為的に作り出すことで、単離した個々の細胞を多細胞組織へと誘導する過程を空間的に操作でき、より複雑な形態へと成長させられることが示された。

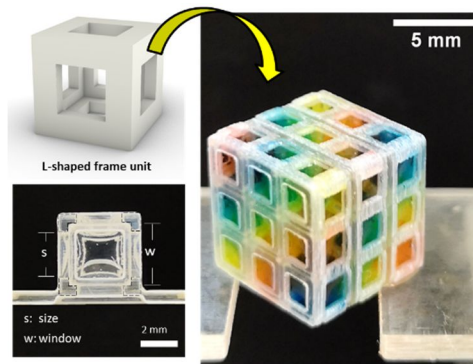


図3: MultiCUBE による ECM 局在制御

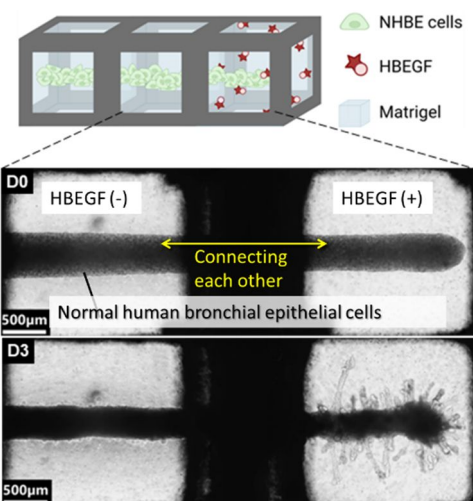


図4: 成長因子局在による非対称パターン形成

(3) 液性因子濃度勾配制御  
臓器の発生において、細胞は周囲環境から特定因子の濃度勾配を位置情報として受け取り、背腹、尾頭、左右といった体軸を形成しているため、因子の濃度勾配を体外での培養実験系に与えることは、オルガノイドを高次形態に成長させるために重要で

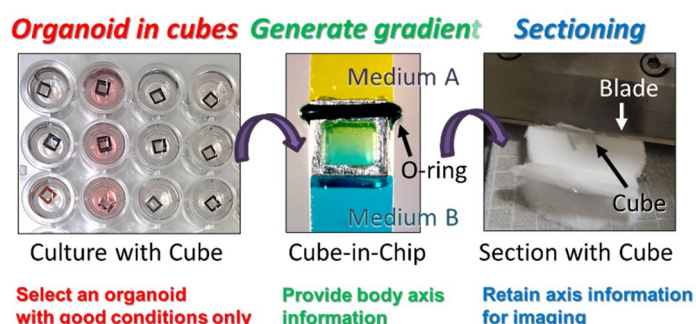


図5: Gradient-in-CUBE システムによるワークフロー

ある。そこで本研究では、簡便な方法で、細胞に因子濃度勾配を与えて体軸形成を行い、濃度勾配情報を失うことなく解析可能なオルガノイド作製ワークフローの開発を行った（図5）。

我々がこれまでに開発した CUBE 型培養器は、培養中のオルガノイドを細胞外マトリックスごとピンセットでつまんで別の容器に移すなどの操作が可能となる。この操作性の良さを生かして、CUBE をオルガノイドのキャリアとして用いる。CUBE 内のオルガノイドが成熟した段階で、PDMS 製の流体チップの中にオルガノイドを CUBE ごと内包し、CUBE を挟んだ対向のチャンバーにそれぞれ成長因子が入った培地を入れることで、CUBE 内に因子の濃度勾配ができる「Gradient-in-CUBE システム」を構築した。本システムを用いて、数日間培養した iPS 細胞塊を CUBE 中心に入れ、神経外胚葉と中胚葉の分化因子を流体チップ内のそれぞれのチャンバーに滴下して 5 日間培養し、切片作製後にイメージングした結果、一つの細胞塊に神経外胚葉、中胚葉それぞれの分化マーカーである Brachyury および SOX2 がの局在させることができた（図6）。

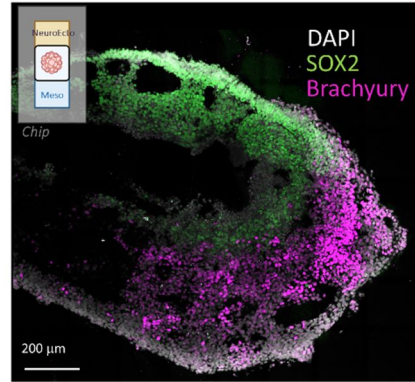


図6：因子濃度勾配による  
分化局在

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suthiwanich Kasinan, Hagiwara Masaya	4. 巻 8
2. 論文標題 Localization of Multiple Hydrogels with MultiCUBE Platform Spatially Guides 3D Tissue Morphogenesis In Vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Materials Technologies	6. 最初と最後の頁 2201660 ~ 2201660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/admt.202201660	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 Koh Isabel, Hagiwara Masaya	4. 巻 6
2. 論文標題 Gradient to sectioning CUBE workflow for the generation and imaging of organoids with localized differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-023-04694-5	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 Koh Isabel, Hagiwara Masaya	4. 巻 -
2. 論文標題 Modular Tissue-in-a-CUBE Platform to Model Blood-brain-Barrier (BBB) and Brain Interaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2023.02.25.529996	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 Takano Atsushi, Koh Isabel, Hagiwara Masaya	4. 巻 13
2. 論文標題 3D Culture Platform for Enabling Large-Scale Imaging and Control of Cell Distribution into Complex Shapes by Combining 3D Printing with a Cube Device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 156 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi13020156	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 Hagiwara Masaya, Maruyama Hisataka, Akiyama Masakazu, Koh Isabel, Arai Fumihito	4. 巻 4
2. 論文標題 Weakening of resistance force by cell-ECM interactions regulate cell migration directionality and pattern formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-021-02350-4	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 -

[学会発表] 計14件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masaya Hagiwara
2. 発表標題 Organoid platform: Design and control of microenvironments to achieve organ architecture
3. 学会等名 2023 RIKEN BDR - CuSTOM Joint Organoid Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩原将也
2. 発表標題 細胞周り微小環境制御によるオルガノイド形態制御
3. 学会等名 R031ハイブリッド量子ナノ技術委員会 第8回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩原将也
2. 発表標題 MPSとオルガノイドを繋ぐ生体模倣システムの構築
3. 学会等名 情報計算科学生物学会 (CBI学会) 2022年大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩原将也
2. 発表標題 オルガノイド培養プラットフォーム：微小環境制御によるオルガノイド形態制御
3. 学会等名 細胞を創る研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩原将也
2. 発表標題 MPSとオルガノイドを繋ぐ次世代in vitroモデルの構築
3. 学会等名 日本薬剤学会第37回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kasinan Suthiwanich, Masaya Hagiwara
2. 発表標題 Guiding anisotropic morphogenesis in vitro through hydrogel localization with MultiCUBE
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Isabel Koh, Masaya Hagiwara
2. 発表標題 Gradient-in-CUBE to Control Organoid Differentiation and Sample Orientation during Analysis
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩原将也、Isabel Koh, Kasinan Suthiwanich
2. 発表標題 培養制御プラットフォームによるオルガノイド形態制御
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Isabel Koh, Masaya Hagiwara
2. 発表標題 オルガノイド培養プラットフォーム：体軸形成から切片イメージまでシームレスなワークフロー
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaya Hagiwara, Isabel Koh, Kasinan Suthiwanich
2. 発表標題 Design and control of microenvironments to achieve organoid architecture.
3. 学会等名 From stem cells to human development (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Isabel Koh, Masaya Hagiwara
2. 発表標題 Cube-in-Chip: An in vitro Platform to Control Organoid Differentiation by Morphogen Gradient
3. 学会等名 From stem cells to human development
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 I. Koh, K. Suthiwanich, A. Takano, M. Hagiwara
2. 発表標題 Designing Organoid Architecture
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Hagiwara, I. Koh, K. Suthiwanich, A. Tkano
2. 発表標題 Design and control of cellular dynamics to reconstruct sophisticated 3D tissues
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原将也
2. 発表標題 次世代オルガノイド開発のための培養環境設計・制御手法の構築
3. 学会等名 第39回日本ロボット学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 観察用切片作製用のブロック、及びその利用	発明者 萩原将也、コウイザ ベルシュイン	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-140997	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞培養容器、観察装置、顕微鏡、培養方法及び観察方法	発明者 萩原将也	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/ JP2021/036555	出願年 2021年	国内・外国の別 国内・外国

産業財産権の名称 細胞培養容器、固定具、観察装置、顕微鏡および観察方法	発明者 萩原将也	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/017794	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ウェブサイト  
<https://hbms.riken.jp/>

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	稲木 美紀子  (Inaki Mikiko)  (10747679)	大阪大学・大学院理学研究科・講師    (14401)	

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
---------	---------