様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　９ 月　２ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ１９８８６

研究課題名（和文）インスタント細胞・組織の開発

研究課題名（英文）Development of "instant" cells and tissues

研究代表者
西川　昌輝（Nishikawa, Masaki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・講師

研究者番号：４０８４３１４９

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、細胞組織を、これまで生細胞への適用報告のない加圧凍結や極低温乾燥という特殊な条件下で凍結乾燥することで、室温で保存できいつでも復水により使用可能なインスタント細胞の開発を試みた。まず、ヒト肝ガン由来細胞株HepG2を用い、加圧凍結と従来の凍結法を比較したところ、細胞形態、増殖、グルコース消費量において有意な差は見られなかった。次に、極低温乾燥・再水和法の検討を行った。細胞形態は通常培養細胞と変わらず、グルコース消費も確認されたが、増殖は見られなかった。以上のように、加圧凍結法が従来凍結法と同等であることが示されたが、極低温乾燥、再水和のプロセスの改善が必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究のさらなる進展により、細胞保存、創薬試験、再生医療の分野において、技術的な革新が起こると想定する。細胞保存においては、保存、輸送、スペースといったコストや災害時リスクの最小化が期待される。創薬試験においては、複数の臓器オルガノイドをひとつのチップに搭載するような複雑なデバイスであっても、復水するだけで簡単に使用可能なデバイスとして、一つの機関で大量に生産し、安定した品質で販売することが容易となると期待され、近未来の創薬試験デバイスで必須の技術となると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop "instant" cells that can be stored at room temperature and used anytime by rehydration. The process included high-pressure freezing and cryogenic drying, which have not been reported for living cells. First, using HepG2 (a human hepatocellular carcinoma-derived cell line), we compared high-pressure freezing and conventional freezing methods and found no significant differences in cell morphology, proliferation, or glucose consumption. Next, the cryogenic drying and rehydration method was examined. Cell morphology was not different from that of normally cultured cells, and glucose consumption was also observed, but no proliferation was observed. In summary, the high-pressure freezing method was shown to be as effective as the conventional freezing method, but the cryogenic drying and rehydration process needs to be improved.

研究分野：細胞生物工学

キーワード：細胞　凍結　保存

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開発当初の背景

創薬プロセスの主要ステップである非臨床試験では、より生体に近い細胞培養系、臓器モデル培養系の開発が近年非常に重要視されている。

申請者らは、薬効･毒性試験などへの応用を目指し、肝臓を中心として様々な臓器モデル培養系を開発してきた。特に酸素透過性材料を培養底面に用いることで実現可能となった生体内の構造を模倣する重層化肝組織は、肝臓モデル培養系として完成度の非常に高いものである。しかし、重層化に限らす高度な培養系の構築にはある程度の技術的習熟と手間がかかるため、実際に創薬スクリーニング系として普及するには、培養系構築の簡便化、マニュアル化が必須となる問題があった。

一方、申請者らは、3次元組織構築手法として清華大学との共同研究で3D バイオプリンターを用いた研究も進めている。現状の多くの3D バイオプリンターでは、細胞組織構築に際しては、ゲルに包埋した細胞を打ち出す手法がとられている。しかし、この手法ではゲルの体積によって細胞密度が低くなるだけでなく、組織構築に非常に時間がかかるため、その間の細胞の生存率低下や変性が避けられない問題があった。

そこで、細胞組織の凍結･乾燥プロセスが確立できれば、上記の問題を一気に解決可能な基礎技術となるのではないかと考えた(**図 1**)。

凍結乾燥の試みは、動物の精子で試みられ、高い生存率や生殖機能の維持が報告されている。しかし、ヒト上皮細胞での報告にある低い生存率からも明らかなように、通常の凍結乾燥では、より複雑な内部構造を持つ通常の細胞に応用することは困難である。そこで我々は、様々な手法を組み合わせてこの問題を克服することを考えた。

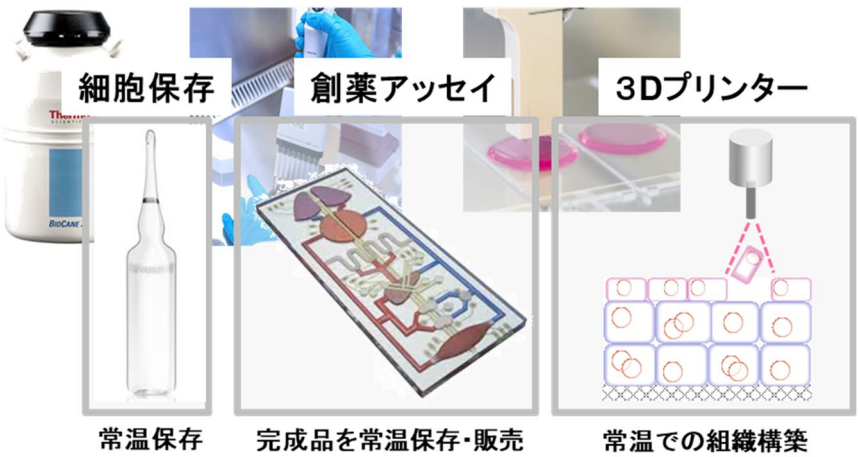

図 1. 本研究の意義と可能性 ― 3つの革新的応用

2. 本研究の目的

室温で保存でき、復水により使用可能な「インスタント細胞組織」の開発を目的とした。

3. 研究方法

[凍結法･乾燥法]

本研究は細胞組織の凍結と乾燥の２つの工程からなる。細胞へのダメージの少ない新たな凍結法と乾燥法を用いた。

[使用する細胞･組織] 扱いが容易な株化細胞（ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2）をモデルとして用いた。

[評価法] 生存率、増殖能、基本的な細胞機能（グルコース消費量、アルブミン分泌能、CYP 代謝活性など）を測定することでプロセスを評価した。

4. 結果とまとめ

[結果]

凍結 まず HepG2 を平面で培養し、凍結後に融解、**生存率や増殖率、基本的な細胞機能を**評価した。コントロールとして接着状態のままガラス化凍結および緩慢凍結を行い、再融解後、同様に**評価した（従来凍結法）。細胞形態に大きな違いはなく、培養 0 日目と 4 日目の比較で細胞の増殖が観測された。細胞のグルコース消費量を測定したところ、凍結無しの通常培養との比較では凍結プロセスからの回復を要するため消費量の低下がみられるが、従来凍結法との比較では有意な差は見られなかった。**

乾燥･再水和 乾燥と再水和を経た細胞は、形態観察では通常培養細胞と変わらず、グルコース消費も確認され、細胞の生存と機能が確認された。しかし、培養 8 日目でも増殖は見られず、グルコース消費量も凍結のみの条件と比較して低下していた。

[まとめと今後の展望]

検討した凍結法が、従来凍結法と少なくとも同等であることが示された。現時点では乾燥、再水和の過程に問題があると考えている。今後は、細胞内オルガネラを直接観察して構造評価を行い、ATR-IR などで含水率を測定する。また、氷晶の昇華界面の移動速度などを数理モデル化する。以上のプロセス評価と細胞機能評価を総合して問題点を抽出し、プロセスの改善と最適化を図ることが重要と考える。

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
研究分担者	酒井　康行 (Sakai Yasuyuki) (00235128)	東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授 (12601)	
研究分担者	佐藤　繭子 (Sato Mayuko) (80550376)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・技師 (82401)	
研究分担者	木村　聡 (Kimura Satoshi) (00420224)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・技術専門職員 (12601)	

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