

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19893

研究課題名（和文）超高速ブロックビルド法の確立による臓器オルガノイドの実スケール化への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to real scale organ organoids by establishing ultrafast block building method

研究代表者

吉野 大輔（Yoshino, Daisuke）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80624816

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、基本要素となる数mmサイズのオルガノイドブロックを高速で接着し、組み上げる方法により、臓器移植に耐え得る実物大の臓器オルガノイドを高効率かつ高速で作製する技術の確立を目的とした。接着に用いる細胞・組織接着性に優れるタンパク質溶液を生成するための誘電体バリア放電を用いたナノミスト生成技術の開発に成功し、そのミスト生成メカニズムを明らかにした。また、様々な形状を持つオルガノイドブロックの作製手法を確立し、それらを接着し積み上げることで複雑かつ巨大な組織様の複合構造体を作製することに成功した。ヒト臓器構造を完全に模倣し長期培養を実現するためには、作製手法の更なる最適化が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植によってのみ根治が望める疾患は、医療技術が発展した現在でも数多く存在する。患者の多くはQOLが著しく低下するため、根治を目指し臓器移植を希望するが、移植待機者数に対する移植臓器の供給は世界的に不足している。したがって、ドナー依存型の臓器供給を根本的に転換する実物大の移植可能臓器を人工的に作製する手法の確立が社会的急務となっている。本研究により、これまで不可能であった巨大なサイズのオルガノイド複合体を効率的に構築することが可能となった。今後、臓器構造の再現、長期培養と高次機能の発現が達成できれば、移植への適用が視野に入り、治療法の1つとして提案できる可能性が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish a technology for the highly efficient and rapid fabrication of full-size organoids that can withstand organ transplantation. This was achieved by the high-speed adhesion and assembly of organoid blocks of several millimeters in size, which are the basic elements. We successfully developed a nano-mist generation technique using dielectric barrier discharge to generate protein solutions with excellent cell/tissue adhesion properties, and elucidated the mist generation mechanism. We also established a method for fabricating organoid blocks of various shapes and succeeded in constructing complex and giant tissue-like composite structures by gluing and stacking them. Further optimization of the fabrication method is needed to fully mimic human organ structures and realize long-term culture.

研究分野：生体医工学

キーワード：オルガノイド ブロックビルド プラズマ 誘電体バリア放電 沿面放電 ナノミスト

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の発明以降の 10 年間において、関連研究分野で最もエキサイティングな進歩の 1 つが 3D 培養システム (オルガノイド) の開発である。このオルガノイドシステムの導入により、これまで困難だった遺伝疾患、変性疾患、がんなどの疾患のモデル化 (Osaki *et al*, *Sci Adv* 2018 など) が可能となり、治療法の確立に革新的な進歩をもたらした。しかし、オルガノイドは臓器の高次機能の発現 (Koike *et al*, *Nature* 2019 など) は可能であるが、“ミニ臓器”と呼ばれるように数 mm の大きさが現状限界である。したがって、再生医療の究極的な目標の 1 つである“オルガノイドによる臓器複製と移植の実現”には大きな壁がある。臓器移植に耐え得る大きさのオルガノイドの作製は、培養期間を無視すれば現状の技術でも可能と考えられるが、歩留まりや費用の面から非現実であり、一般的な臨床応用は期待できない。

2. 研究の目的

以上の学術的・社会的背景を踏まえ、本研究では、臓器移植に耐え得る実物大の臓器オルガノイドを高効率かつ高速で作製する技術の確立を目指す。我々が開発に成功した組織結合性を高めるプラズマ荷電タンパク質溶液の生成機構をマイクロスポット化し、数 mm サイズのオルガノイド同士の接着剤として適用する。また、独自に確立した高速オルガノイド作製技術を用いて、基本要素となる数 mm サイズのオルガノイドブロックを作製する。これらの技術を組み合わせ、オルガノイドブロック同士を高速で接着し、組み上げる方法 (ブロックビルド法) を確立し、臓器オルガノイドの実スケール化を実現する。

3. 研究の方法

本研究では、研究目的達成に向けて 3 つの項目に取り組んだ。

(1) プラズマ荷電タンパク質溶液を生成する機構のマイクロスポット化

これまでに低温プラズマ処理を施したタンパク質溶液は細胞・組織接着性に優れることを明らかにした (特許第 6408689 号)。この細胞・組織接着性に優れるタンパク質溶液の生産には、直径 8 mm のガラス管中で発生させた沿面放電プラズマ (特許第 6713795 号) を使用するが、数 mm サイズのオルガノイド同士の接着に適用するには、スケールが大きすぎる。したがって、オルガノイドの任意部位の局所接着に応用可能なプラズマ荷電タンパク質溶液の生成機構のマイクロスポット化の実現を試みた。併せて、プラズマと溶液との相互作用のメカニズムを高速度撮影により明らかにすることに取り組んだ。

(2) 基本要素となる任意形状のオルガノイドブロックを作製する技術の確立

独自に開発した超撥水性のモノリス型多孔体を用いた高効率で再現性の高いオルガノイド作製技術 (Hayase and Yoshino, *ACS Appl Bio Mater* 2020) を基盤に、マイクロウェルの形状を変化させることで、任意形状のオルガノイドの基本要素 (オルガノイドブロック) を作製する技術の確立を試みた。

(3) オルガノイドの高速ブロックビルド技術の確立

項目 (1) と (2) を組み合わせ、任意形状のオルガノイドブロック要素を接着しながら組み上げる形で臓器オルガノイドの実スケール化に挑戦した。本研究で対象とする臓器は腎臓とし、腎臓の内部構造に合わせて各種細胞で構築した数十 mm サイズのオルガノイドブロック複合体の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) プラズマ荷電タンパク質溶液を生成する機構のマイクロスポット化

外径 8 mm、内径 6 mm の硼珪酸ガラス管の内側に注射針 (16 ゲージ、先端 90 度カット) を差し込み、この注射針に高電圧 (12.5 kV、10 kHz) を加え、ガラス管外側に巻き付けた電極を接

地することでガラス管内部に誘電体バリア放電 (図 1(a)) を発生させ、液体と相互作用させることで 400 nm サイズのナノミストの生成に成功した (図 1(b))。また、プラズマ反応場の高速度撮影により、(1) 液体ジェットの不安定性による微小液滴の分離、(2) プラズマストリーマ (注 3) の衝突による液滴の物理的破砕、(3) プラズマストリーマ噴出に伴う煙状ミストの発生と液滴表面の崩壊、の 3 つの物理的反応 (図 2) が複合的に起こることによってマイクロ・ナノサイズのみストが生成されることが明らかになった。加えて、誘電体バリア放電によるタンパク質溶液ナノミストと沿面放電によるタンパク質溶液について、先端が細径化されたノズルによって射出することでマイクロスポット化が実現可能との結論に至った。

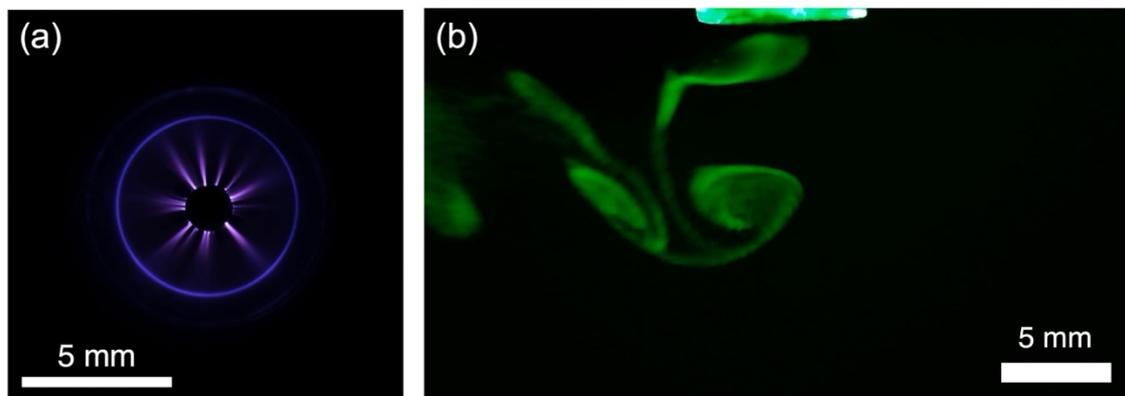
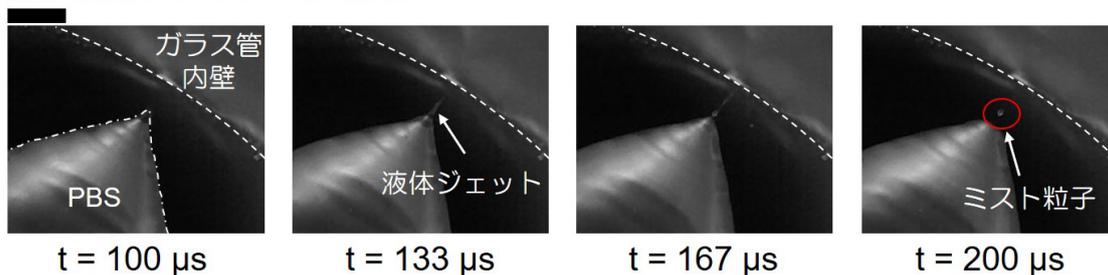
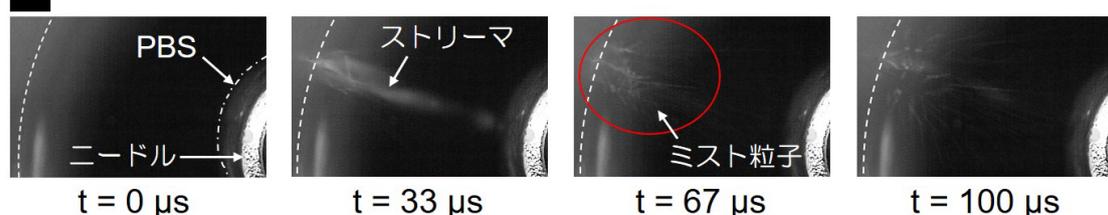


図 1: 誘電体バリア放電を応用したナノミスト生成技術: (a)ガラス管電極内の誘電体バリア放電の様子, (b)ガラス管電極先端より放出されるナノミストの可視化像.

(1) 液体ジェットの不安定性



(2) プラズマストリーマの衝突による液滴の物理的破砕



(3) プラズマストリーマの噴出に伴う煙状ミストの発生と液滴表面の崩壊

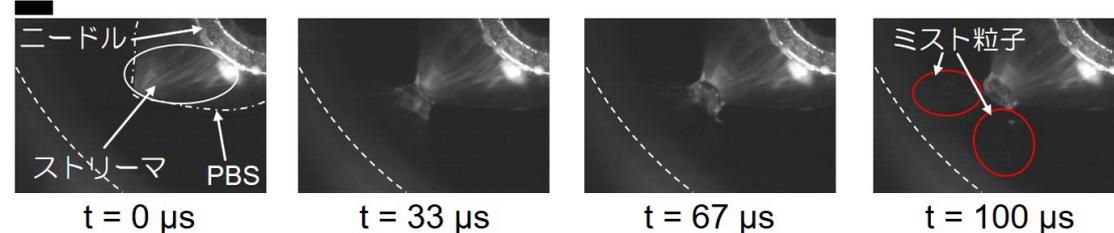


図 2: プラズマナノミスト生成装置は 3 つの異なる物理的反応で液体を微粒化する。(1)液体ジェットの不安定性による微小液滴の分離, (2)プラズマストリーマの衝突による液滴の物理的破砕, (3)プラズマストリーマ噴出に伴う煙状ミストの発生と液滴表面の崩壊. スケールバーは 500 μm . 秒間 30,000 枚の速度で撮影. 撮影開始時刻を $t = 0$ とした. 図は (Watanabe *et al*, 2024. *J Phys D: Appl Phys* 57 23LT01) を改変.

(2) 基本要素となる任意形状のオルガノイドブロックを作製する技術の確立

オルガノイドブロックの作製にあたっては、腎臓糸球体の構造を再現可能な形状を選定した。各形状に合わせて超撥水性モノリス型多孔体あるいはフッ素樹脂を素材とするバルク材に切削加工を施すことでブロック形状の反転型を作製した。その後、滅菌処理した型にヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞と I 型コラーゲン溶液を含む細胞懸濁コラーゲン溶液をブロック形状から計算した容量を分注し、CO₂ インキュベーター内に静置することで溶液をゲル化させ、ブロックを作製した (図 3(a))。ブロックの寸法誤差はいずれの形状においても 10% 以下であり、高い精度で作製可能であることを確認した。

腎臓糸球体の組織構造の再現が可能であることを確認するために、ヒト腎臓糸球体上皮細胞、メサンギウム細胞、血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の 3 種類の共存培養下でオルガノイドブロックの形成を試みた。血管内皮細胞が糸球体上皮細胞の周囲に血管網を形成し、メサンギウム細胞がそれらに点在する、複雑に絡み合った組織様構造を示した (図 3(b))。本研究で作製したオルガノイドは、ヒトの腎臓糸球体の組織学的構造 (Straube *et al*, *J Exp Clin Cancer Res* 2011; Lake *et al*, *Nature* 2023) と異なるため、方向性を持たせた培養などの手法の最適化が必要であることが示唆された。

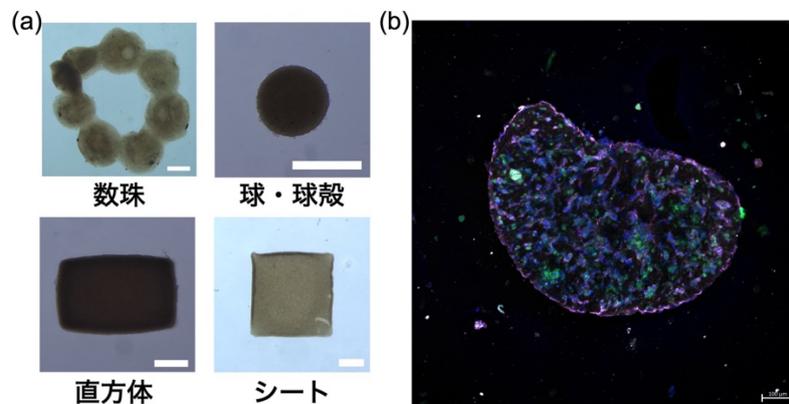


図 3: 基本要素となるオルガノイドブロックの作製: (a) 作製手法を確立した様々な形状のオルガノイドブロック。スケールバーは 1 mm. (b) ヒト腎臓糸球体を構成する 3 種類の細胞種の共存培養により作製したオルガノイドブロック。スケールバーは 100 μm .

(3) オルガノイドの高速ブロックビルド技術の確立

プラズマ処理コラーゲン溶液あるいは無処理のコラーゲン溶液をオルガノイドブロック間の接着したい部分に塗布し、CO₂ インキュベーターで 5 分静置したところ、ブロック同士が接着されることを確認した (図 4)。長期に亘る培養においても接着部分の剥離は認められなかった。複数個のオルガノイドブロックも同様の手順で接着可能であり、培養日数の経過に伴い、接着部位に向かって徐々に細胞が遊走し、ブロック間を埋めて組織化していく様子も確認できた。以上の結果から、コラーゲン溶液を接着剤としたブロックの積み上げが可能であり、ブロックビルド法の基礎を確立したといえる。しかし、現状の手法ではオルガノイドブロック同士を接着した複合体の長期培養が栄養や酸素供給の面から困難であるため、その供給路となる階層性のある血管網の構築が必要である。

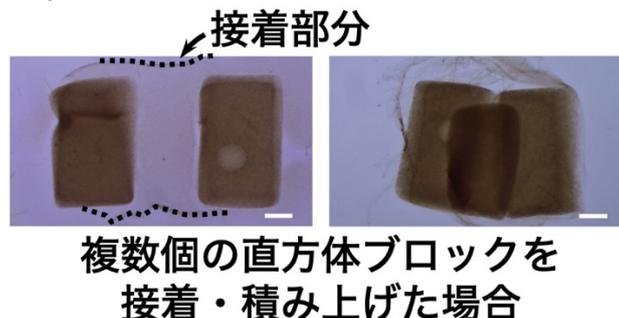


図 4: オルガノイドブロックの接着・積み上げの様子。スケールバーは 1 mm.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 4件）

1. 著者名 Kadotani Ayaka, Hayase Gen, Yoshino Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Geometrically-engineered organoid units and their assembly for pre-construction of organ structures	5. 発行年 2024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） 10.1101/2024.05.06.592718	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 Watanabe Ryosuke, Sugata Natsuki, Yoshino Daisuke	4. 巻 57
2. 論文標題 Micro-sized droplet formation by interaction between dielectric barrier discharge and liquid	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 23LT01 ~ 23LT01
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6463/ad30af	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 Iijima Yuta, Uenaka Norino, Morimoto Mayu, Sato Daiki, Hirose Satomi, Sakitani Naoyoshi, Shinohara Masahiro, Funamoto Kenichi, Hayase Gen, Yoshino Daisuke	4. 巻 3
2. 論文標題 Biological characterization of breast cancer spheroid formed by fast fabrication method	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 In vitro models	6. 最初と最後の頁 19 ~ 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44164-024-00066-3	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 角谷綾夏、早瀬元、吉野大輔	4. 巻 5
2. 論文標題 ブロックビルド法による移植可能な臓器オルガノイド開発への挑戦	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 33(259) ~ 35(261)
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 Watanabe Ryosuke, Tanaka Shiori, Miyaji Godai, Yoshino Daisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Potential generation of nano-sized mist by passing a solution through dielectric barrier discharge	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10526-1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-14670-4	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 -

1. 著者名 Watanabe Ryosuke, Tanaka Shiori, Miyaji Godai, Yoshino Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of nano-sized mist by passing a solution through dielectric barrier corona discharge	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research Square (Preprint)	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) 10.21203/rs.3.rs-1507373/v1	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 角谷綾夏、早瀬元、吉野大輔
2. 発表標題 実物大臓器作製を実現するブロックビルド法の提案と検討
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 角谷綾夏、早瀬元、吉野大輔
2. 発表標題 移植可能臓器作製に向けたブロックビルド法の検討
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Block building to fabricate transplantable organoids , Kuala Lumpur, Malaysia, November 2023.
2. 発表標題 Kadotani Ayaka, Hayase Gen, Yoshino Daisuke
3. 学会等名 12th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP-BIOMECH 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯嶋雄太、早瀬元、吉野大輔
2. 発表標題 高速がんスフェロイド作製法を応用した転移性表現型の発現誘導の検討
3. 学会等名 日本機械学会2023年度年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角谷綾夏、早瀬元、吉野大輔
2. 発表標題 オルガノイド・ブロックビルドにおける血管網自己組織化の検討
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角谷綾夏、飯嶋雄太、早瀬元、吉野大輔
2. 発表標題 任意形状のオルガノイドブロック作製方法の確立
3. 学会等名 日本機械学会バイオエンジニアリング部門 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊良輔, 宮地悟代, 吉野大輔
2. 発表標題 低温プラズマ放電による液体微粒化技術の開発
3. 学会等名 日本機械学会 2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊良輔, 宮地悟代, 吉野大輔
2. 発表標題 プラズマ - 液体相互作用を用いた液体の微粒化
3. 学会等名 日本液体微粒化学会 第31回微粒化シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角谷綾夏, 早瀬元, 吉野大輔
2. 発表標題 腎臓構造の再現に向けたオルガノイド・ブロックビルド
3. 学会等名 日本機械学会バイオエンジニアリング部門 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 Ryosuke Watanabe, Yuya Haraguchi, Yoshikazu Hattori, Hiroko A. Katori, Gen Hayase, Tomohide Saio, Daisuke Yoshino
2. 発表標題 Plasma induces polymorphization of crystal structures in sugar alcohol
3. 学会等名 15th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials/16th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 プラズマナノミスト生成装置	発明者 吉野大輔, 渡邊良輔, 田中詩織	権利者 国立大学法人東 京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/013003	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 プラズマナノミスト生成装置	発明者 吉野大輔, 渡邊良輔, 田中詩織	権利者 国立大学法人東 京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-057334	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	早瀬 元 (Hayase Gen) (70750454)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・独立研究者 (82108)	

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