

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20415

研究課題名(和文)細胞から構築した組織への灌流可能な機能的血管導入のための灌流培養技術の開発

研究課題名(英文)Development of perfusion culture technology for the introduction of perfusable functional vascular networks into three-dimensional tissues made up of cells

研究代表者

戸部 友輔 (TOBE, Yusuke)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：00907082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、様々な組織工学的技術の開発により生体外で作製した組織の医療分野、創薬分野への応用が期待されている。一方、生存可能な組織厚は培養液の拡散に依存するため限界が存在する。そこで、より厚みのある機能的な立体組織の創生に向け、血管網の導入、および血管を介した培養液の供給を生体外で同時に達成する技術の開発を行った。その結果、立体組織内に高密度、かつ広範囲に灌流可能な血管網を再現性高く付与可能とする生体外灌流培養法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外における血管新生研究モデルはハイドロゲル内を対象としたものが大半である。一方、本研究で開発した生体外灌流培養システムは、高い細胞密度の組織に対して再現性高く灌流可能な血管網を導入可能である。従って、従来のモデルでは解析し得ない高細胞密度組織内における血管新生条件の解明に寄与する、新たな血管新生モデルとしての利用が可能である。また、灌流可能な血管網を備えた機能的な立体組織を作製可能とする技術であるため、これまでにない再生医療組織や創薬試験モデルへの応用が期待され、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Currently, the development of various tissue engineering techniques has led to the application of tissues produced in vitro in the medical and drug discovery fields. However, there is a limitation in the survivable tissue thickness because it depends on the diffusion of the culture medium. Therefore, we developed a technology to introduce a network of blood vessels and to supply culture medium through the vessels at the same time in vitro for the creation of thicker and more functional three-dimensional tissues. As a result, we found an in vitro perfusion culture system that enables the introduction of a high-density, widely perfused vascular network in three-dimensional tissue with high reproducibility.

研究分野：知能機械、組織工学

キーワード：バイオリアクター 血管床 組織工学 血管新生 細胞シート 3次元組織 毛細血管網

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞を始めとした細胞から組織や臓器を作製する組織工学技術が発展し、新たな再生医療技術への応用、また創薬モデルとしての活用が注目を浴びている。より機能的な組織を作製するためには組織の厚み増大を図る必要がある。しかし、組織厚の増加に伴う酸素や栄養素の欠乏、および老廃物の蓄積により立体組織の生体外構築は困難であることが広く知られている。そのため、栄養供給と老廃物の除去を担う血管構造を組織内に構築する手法の開発が重要である。

所属研究室では、血管内皮網を付与した 3 層の細胞シートを 1 日置きに毛細血管網が発達したラット皮下組織、すなわち血管床に段階的に移植することで 10 日間で 30 層、約 1 mm の立体心筋組織を生体内で作製することに成功した。また上記手法を模し、コラーゲンゲル内に発達させた新生血管網や血管付きの生体組織を利用した血管床を開発することで、生体外においても約 100 μm の立体心筋組織を構築可能であることを示した。これらは、培養液の灌流が可能な流路構造を有する培養の土台である血管床上での細胞シートの灌流培養により、血管新生因子を流路から拡散させることで細胞シート内に血管新生を誘導する手法である。しかし、本手法は血管網の導入に最低でも 5 日以上要し、更に付与可能な血管数も少ない。従って、より機能的な立体組織を構築するためには、効果的に血管導入が可能な灌流培養技術の開発が急務である。

2. 研究の目的

様々な組織工学的技術の開発により生体外で作製した組織の医療分野、創薬分野への応用が期待されている。より厚みのある機能的な立体組織を生体外で作製するには血管網を導入することが有効であると考えられているが、高細胞密度の立体組織に対して効果的に血管網を導入する技術は未だ研究段階である。そこで本研究では、細胞シートを積層化することによって得られる高細胞密度の組織内への灌流可能な機能的血管網の短期間での大量付与を実現する灌流培養技術の開発を目的とした。本技術によって血管網付与効率を向上させることができれば、これまでにない厚みを有する立体組織の構築が可能になり、再生医療組織や創薬試験モデルの応用研究に資する知見を提供可能であると考えられる。また、生体外における血管新生研究モデルはハイドロゲル内を対象としたものが大半である中、本技術は従来のモデルでは検証し得ない高細胞密度の立体組織への血管新生研究モデルとしての応用が期待される。

3. 研究の方法

初めに、効果的な血管付与を実現するため従来の血管床と全く異なる流路構造を有する血管床を考案した。続いて、コラーゲンゲル、およびフィブリンゲルを候補として選択し、新規血管床の作製に適正なハイドロゲルの検討を行った。GFP 陽性のヒト臍帯静脈内皮細胞 (GFP-HUVEC) とヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を 1:9 の比率で 3 日間共培養することで、血管内皮網付細胞シートを作製した。各ハイドロゲルで構築した血管床上で 3 層の血管内皮網付細胞シートを 5 日間静置培養し、血管床の流路構造が最も安定なハイドロゲルを適正なハイドロゲルとして選択した。最後に、新規血管床の立体組織への血管付与効果を検証するため、血管床上で 3 層の血管内皮網付き細胞シートを 5 日間灌流培養した。培養後、血管床の流路から墨汁などを灌流することで細胞シート内に付与された血管網の可視化や組織学的観察を行うことで評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞シート直下への培養液灌流を実現する新規血管床の考案

従来のハイドロゲルや生体組織内の血管網を利用した血管床では、血管床の流路と細胞シートが構造上物理的に乖離する。この物理的な距離が血管導入の律速ではないかと考えた。そこで、高細胞密度の立体組織への血管網導入効率の向上に向け、2 本の送液流路、および送液流路と連なる穴隙構造、橋渡し流路を有するハイドロゲル製の血管床を考案した (図 1)。2 つの穴隙構造をつなぐ橋渡し流路の直上を覆うように細胞シートを生着させる

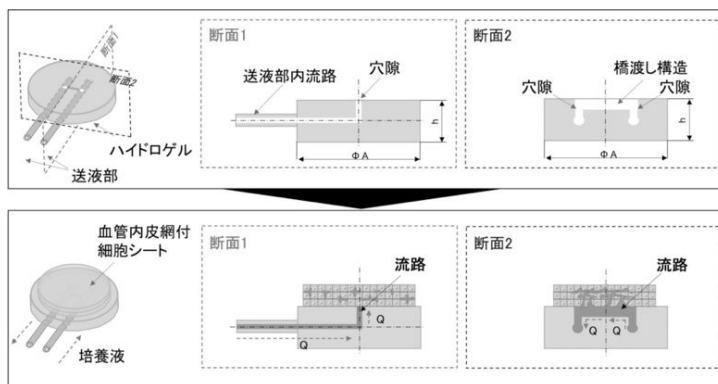


図 1 新規血管床の構造

ことで、細胞シート自体を閉鎖流路の上面とすることが可能となる。つまり、従来の血管床では困難であった血管床の流路と細胞シートを密接させることが可能である。更に、本血管床の流路は細胞を含まないハイドロゲルで構成されているため生体組織などの血管を流路とする従来の血管床に比べ、血管床自体の検体差が遥かに少なく、安定的な灌流培養を実現する特徴を有する。

(2)新規血管床の作製に適正なハイドロゲルの選択
 本研究で考案した血管床は、血管導入を目的とする細胞シートと血管床流路を密接させることが可能である一方、ハイドロゲルが細胞によって収縮・分解されると流路構造が破綻し、灌流培養が困難となる。そこで、優れた生体適合性や細胞接着性を有する足場材料であるコラーゲンゲル、およびフィブリンゲルを候補とし、流路構造を維持可能なハイドロゲルの組成を検討した。その結果、コラーゲンゲル、および低濃度のフィブリノーゲンで作製したフィブリンゲル血管床は流路構造が大きく破綻するのに対し、高濃度のフィブリノーゲンと第 XIII 因子を含むフィブリンゲル血管床は流路構造が 5 日間の培養期間でほとんど変化されないことを明らかにした(図 2)。以上の結果より、ハイドロゲル表面に設けた凹みと細胞シートで構成される閉鎖空間を流路として安定的に利用し、細胞シート直下への培養液灌流を実現する血管床作製手法を確立できた。

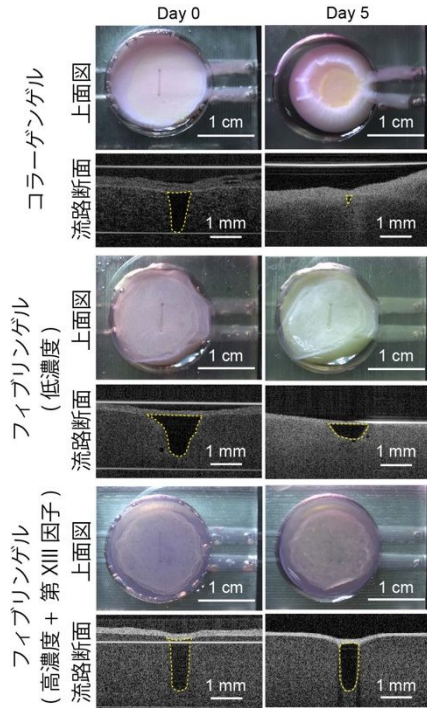


図 2 ハイドロゲルの選定

(3)新規血管床の高細胞密度組織への血管付与効果
 3 層の血管内皮網付き細胞シートを血管床上で 5 日間灌流培養することで、立体組織直下への灌流培養が高細胞密度の立体組織への血管付与効率に与える影響を検証した。培養後の血管床流路から墨汁を灌流した結果、墨汁の灌流が認められる機能的な血管網が血管床の流路を基点として細胞シート内に大量に導入されていることを明らかにした。更に、組織学的評価の結果より、立体組織内に血管内皮細胞で構成された管腔構造が均一、かつ密に存在することを認めた(図 3)。これは、立体組織直下に培養液を灌流したことにより、培養液の灌流に伴う機械刺激が立体組織内において血管新生を誘導したことによる影響であると考えられる。以上の結果

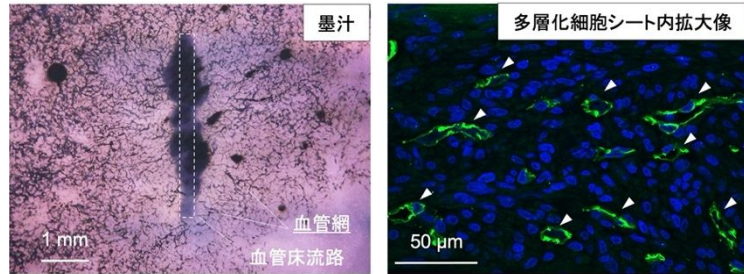


図 3 新規血管床上で灌流培養した立体組織内血管網 (右図 緑色：血管内皮細胞、青色：核、白矢印：血管)

より、開発した新規血管床を用いた灌流培養技術は、血管導入効率を大幅に改善し、従来よりも短期間で、高密度、かつ広範囲に血管網を再現性高く導入可能であることを示した。

(4)より厚みのある立体組織構築手法としての有用性

本血管床を用いた灌流培養技術がミリメートルオーダーの厚みを有する立体組織構築手法として有用であることを示すため、細胞シートの段階的積層法を検討した。段階的積層とは、血管内皮網付き細胞シート 3 層を段階的に血管床に移植、灌流培養することによって血管網を段階的に付与しながら立体組織を構築する手法である。開発した血管床を用いた 6 層の細胞シートの段階的積層法を検討した結果、灌流培養条件を適切に設定することによって短期間で追加 3 層の細胞シートまで血管付与が可能である傾向を見出した(図 4)。つまり、本血管床は生体外における立体組織手法として有用である可能性が示された。今後、灌流培養条件をより詳細に検討し、段階的積層法を最適化することにより、ミリメートルオーダーの厚みを有する機能的な血管網付き立体組織の作製が可能になると考えられる。

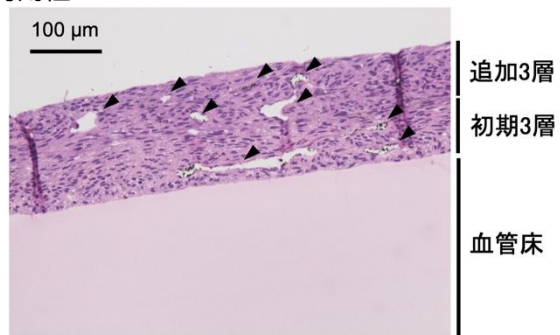


図 4 段階的積層による立体組織構築 (黒矢印：血管)

以上の成果より、本研究では生体外において高細胞密度の立体組織に短期間で、大量の血管網導入を実現する灌流培養技術を開発した。血管床上に積層する細胞種を変更することが可能であるため、多様な立体組織を構築するための灌流モデルとして利用可能であると考えられる。また本技術を用いることで、栄養供給と老廃物除去を担う灌流可能な血管網を備えた厚みのある機能的な立体組織の構築が可能になることが期待され、新たな再生医療技術や創薬試験モデルの開発に貢献する技術であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusuke Tobe, Jun Homma, Katsuhisa Sakaguchi, Hidekazu Sekine, Kiyotaka Iwasaki, Tatsuya Shimizu	4. 巻 141
2. 論文標題 Perfusable vascular tree like construction in 3D cell-dense tissues using artificial vascular bed.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microvascular Research.	6. 最初と最後の頁 104321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mvr.2022.104321	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Tobe, Jun Homma, Hidekazu Sekine, Katsuhisa Sakaguchi, Kiyotaka Iwasaki, Tatsuya Shimizu
2. 発表標題 Development of an artificial vascular bed using hydrogel to insert perfusable vascular networks into 3D tissues
3. 学会等名 NIMS Award symposium（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸部友輔、本間順、関根秀一、坂口勝久、岩崎清隆、清水達也
2. 発表標題 高細胞密度の立体組織への灌流可能な栄養血管網導入を実現する生体外灌流培養技術の開発
3. 学会等名 日本再生医療学会 第2回秋季科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸部友輔、本間順、関根秀一、坂口勝久、岩崎清隆、清水達也
2. 発表標題 高細胞密度の立体組織への灌流可能な栄養血管網導入を実現する灌流培養技術の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戸部友輔, 本間順, 坂口勝久, 関根秀一, 岩崎清隆, 清水達也
2. 発表標題 生体外における灌流可能な血管網の高細胞密度の立体組織への付与技術の開発
3. 学会等名 第21回再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工血管床、人工三次元生体組織及び血管網を備えた人工三次元生体組織の作製方法	発明者 戸部友輔, 本間順, 関根秀一, 坂口勝 久, 清水達也	権利者 早稲田大学・東 京女子医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-182725	出願年 2021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

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