

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22246101

研究課題名(和文)埋込み型膵島・肝組織の設計・生体外構築育成のための方法論の確立と実証

研究課題名(英文) Establishment of the methodology for design and growth of implantable pancreatic beta cell or liver cell tissues in vitro

研究代表者

酒井 康行 (Sakai, Yasuyuki)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：00235128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：移植用の膵島や肝組織の人工的構築の方法論確立を目標として、細胞の三次元化とマルチスケール物質交換性の確保の視点から、細胞組織体を高密度にランダム充填する小チャンバーと、それらに培養液・血液を均一に分配するマクロ流路構造を持つ担体構造を提案、レーザー焼結積層造形法によって担体を作成した。細胞組織体として肝細胞凝集体を固定化した灌流培養では、長期に安定した高機能を得た。さらに組織構築用に細胞への毒性が少ないヘモグロビンを利用する人工赤血球の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Toward engineering implantable pancreatic beta cell or liver cell tissues, an integrative methodologies that fully utilizes the advantages of both tissue element assembly in a micro-scale and large 3D scaffold having a flow channel network in a macro-scale. Model scaffolds was fabricated by the 3D selective laser sintering (SLS) process. Good results of the perfusion culture of liver cell aggregates proved the high feasibility of the methodology. In addition, we succeeded in the preparation of hemoglobin-based artificial oxygen carrier showing lower cytotoxicity.

研究分野：臓器・生体システム工学

キーワード：医用化学工学 マルチスケール血管網配備 膵島 肝 三次元造形 人工赤血球

### 1. 研究開始当初の背景

肝・膵島といった代謝型臓器・組織の再構築については、現状の組織工学の技術では、生体様の血管系の配備が極めて困難であることから、臨床からは程遠い状況にあるといわざるを得ない。この実現のためには、少なくとも何らかの血管様構造の配備は避けられない課題であるが、現在まで提案されている手法は、いずれも対象とするスケール範囲が狭く、ひとつのアプローチでマルチスケールの物質交換性の確保は難しい。したがって、異なる手法をスケールに合わせて融合利用することが望ましい。

また、マルチスケールでの酸素要求性の充足は極めて大きな問題であるが、組織工学・再生医療の分野では今までほとんど配慮されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、マルチスケールで物質交換性が十分に確保され、スケールアップをしても単位体積あたりの機能の低下を招かないような高代謝・大型臓器の設計・構築・育成の方法論の確立を最終目標とする。具体的には、マルチスケールの融合的な設計方法に基づき、マクロスケールの血管系とその末端に小チャンパーを持つ三次元担体を作成、小チャンパーには別途作成した微小组織ユニットをランダムに充填、その間隙をミクロスケールの血管網として使用するという戦略である。

一方、特に血管長さ方向の酸素濃度の維持を目的として、培養液中の酸素溶解度の大幅な向上を目指し、細胞毒性の低いヘモグロビンベースの人工赤血球の開発も目指した。

### 3. 研究の方法

(1)マルチスケール担体の設計・製作・評価：ミクロスケールにおいては、造形精度が無関係となる”Modular Assembly”と呼ばれる手法を活用し[1]、一方でマクロスケールにおいては、分岐合流ネットワークを製作することとした(図1)。

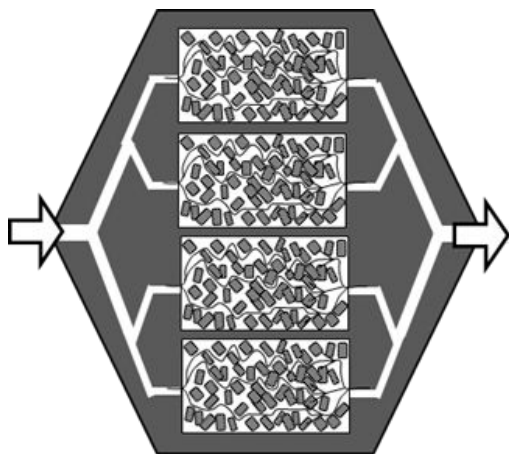
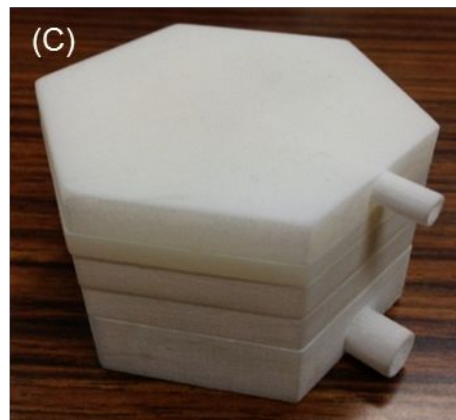
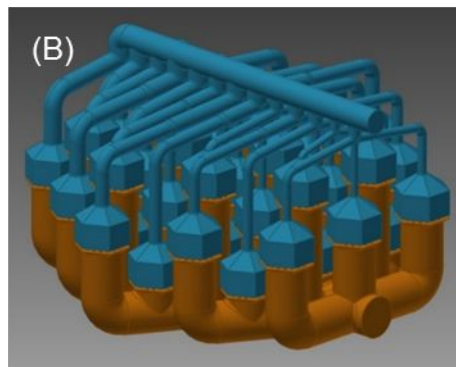
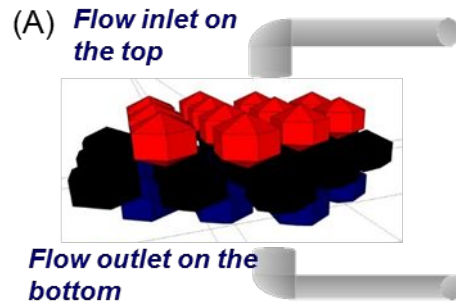


図1. マクロ流路と小チャンパーからなる融



合的担体設計。

図2. 作成したモデル担体(11.6 cm<sup>3</sup>)。 (A), 43個の小チャンパー(0.27 cm<sup>3</sup>)の配置; (B), 全体の外形; (C), 実造形担体の外観。

この融合的コンセプトに基づき、基本構造をデザインした(図2)。まず、実際の肝組織に習って担体の流路入口と出口とを同一方向に配置した。これは将来、肝臓の一部の臓器葉をそのままの位置で置換する移植手術を想定した場合には、必須の条件となる。マクロナ酸素供給があまり問題とならない11.6 cm<sup>3</sup>の担体をまずは構築することとし、微小组織体を充填することになる断面が六角形の小チャンパーの体積を0.27 cm<sup>3</sup>として、それを12個・19個・12個、合計43個、互いに入れ違いながら三層に重ね、それぞれに直接流路が到達するようにした。この設計に基づき、まずはモデル担体として、造形精度が高く取れるナイロン粒子を材料として使用するレーザー焼結積層造形法にて、担体を作成した。組織エレメントとしては、ヒト肝がん細胞株 Hep G2 とヒト肝類洞内皮細胞株 TMNK-1 からなる共培養球状凝集体を、酸素

透過マイクロウェル法にて効率作成，各小チャンパーに懸濁液で導入固定化した。グルコース消費・アルブミン分泌を 10 日間の灌流培養で計測すると共に，最終日の細胞数計測と組織学的観察を行った。

(2)新たなマイクロ組織ユニットの設計・製作・評価：小チャンパーをランダム充填する微小組織には様々なバリエーションが考えられる。オリジナルの“Modular assembly”コンセプトでは，細胞包埋コラーゲンゲルロッドであるが，物理的には極めて脆弱であり，培養に伴い体積で約 1/10 に縮むという欠点もある[1]。そこで，同じくレーザー焼結積層造形法を用いて，図 3 に示すような中空状の微小三次元担体を作成した。また側面にも穴を開けた。これは，小チャンパー内にランダムに充填された場合でも，担体の方向にかかわらず流路の確保がなされるとの考えである。コントロールとして，中央の穴も側面の穴もないロッド状の担体を作成して，性能比較を行った。

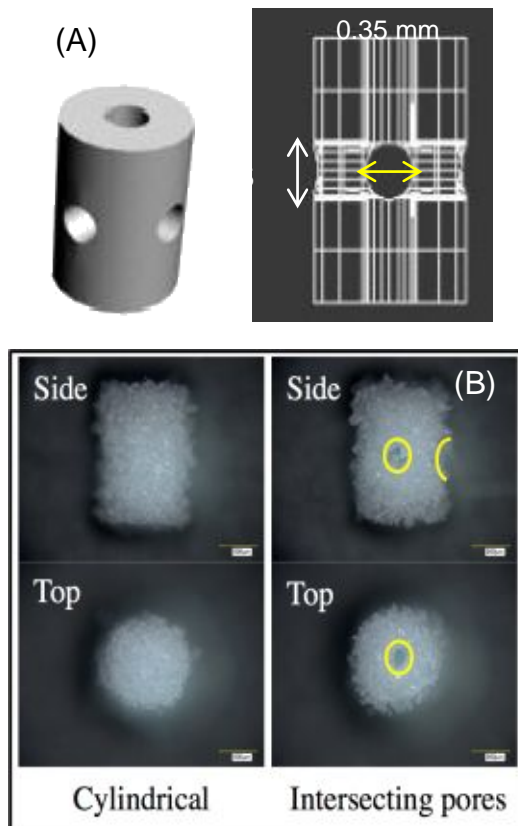
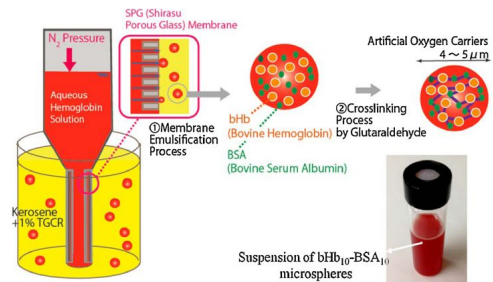


図 3 . 新たな微小組織担体の設計と製作

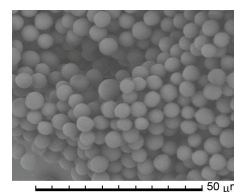
(3)人工赤血球の作成と評価：ウシ血液から抽出した新鮮 Hb、BSA と界面活性剤 TGCR (テトラグリセリン縮合リシノレート) 混合した溶液を、連続相をケロシンとして SPG 膜乳化キット (SPG テクノ) により乳化した。膜乳化後、グルタルアルデド水溶液を添加架橋し、洗浄・凍結乾燥を行った (図 1 A)。得られた新規酸素運搬体の SEM 観察、メトヘモグロビン化率、酸素解離曲線の測定をヘモックアナライザーで行った。さらに生体適

合性を、各種細胞を用いる MTT assay 等で評価した。また，肝細胞株については，アルブミン分泌能も評価した。一方で，完全人工物から成る酸素運搬体として，シリコンメタクレート (TRIS) を SPG 膜乳化し、光架橋し、さらにリン脂質ポリマー (MPC) を表面にグラフト重合することによって、メト化によって失活することのない人工酸素運搬体の開発も行った。

(A)



(B)



(C)

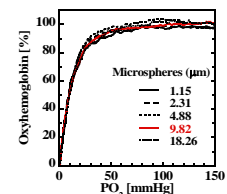


図 4 SPG 膜乳化法による新規人工酸素運搬体(A)作製プロセス (B)SEM 写真 (C) 粒子径が異なる酸素運搬体の酸素解離曲線

#### 4. 研究成果

##### (1) マルチスケール担体の設計・製作・評価

Hep G2 と TMNK-1 とからなる共細胞凝集体を，酸素透過材料からなるマイクロウェル・静置培養にて高密度迅速形成させた。k の手法では，通常の酸素非透過材料上と比較して，4 - 8 倍の播種密度での形成が可能であったことから，凝集体大量形成によっては，極めて有効な手法であるといえる。その凝集体を，生分解性樹脂ファイバー片と共に，各チャンパーの 7-12% の体積が凝集体で充填されるように，担体に入口から充填・固定化，10 日間の灌流培養を 3 回行った。その結果，細胞生存率とアルブミン機能が安定的に維持されることを確かめた。特にコントロール群一形成した凝集体をそのまま浮遊培養するものに比較してはるかに高いアルブミン合成能が得られたことは特記に値する (図 5)。今後，同様な手法で小チャンパー内の空間の充填率を 100% に高めた際についても同様の灌流培養実験を行い，基本コンセプトの検証を進めたいと考えている。

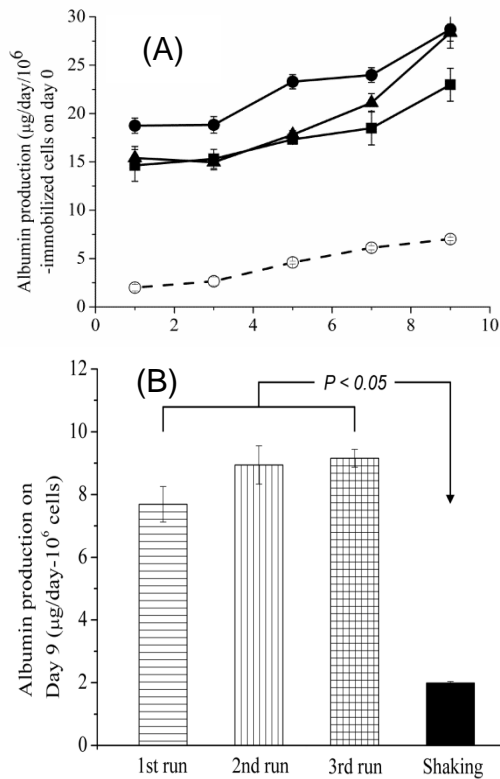


図5 . 11.6 cm<sup>3</sup> スケール担体に 7-12%体積の凝集体を播種・灌流培養した際の、播種細胞あたりのアルブミン分泌能の変化(A)および培養終了時の細胞あたりのアルブミン分泌能(B) .

(2) 新たなマイクロ組織ユニットの設計・製作・評価： 中央および側面に穴を開けた微小担体と穴なしの同外形のものを作成したところ、その空隙率は 60%であった . Hep G2 細胞を巡回浮遊培養で播種、付着させ、そのまま巡回浮遊培養する群、200 個を数 mL のカラムにつめて灌流培養をおこなった群、で増殖や機能を比較した . 巡回浮遊培養は灌流培養と比較して細胞増殖は非常に良かったが、組織学的解析より、主に外部で細胞が多層を形成しているためであることが明らかとなった . 一方、穴空き担体では中央および側面の穴内部に沿って細胞の増殖が見られたが、しばしば穴自体が増殖した細胞によって埋められてしまっていた . これに対して灌流培養群では、まず外側の多層状の細胞増殖は、培養液灌流によるせん断応力のため、顕著には見られなかった . また穴あきの担体では良好な細胞増殖が見られたが、穴なしの担体では増殖は極めて低いレベルにとどまった . 最終日の細胞あたりのアルブミン分泌能では、穴空き担体のものが一番高値を示したことから、本設計の微小担体は、期待通り、小チャンパーにランダム充填されたときに、流路確保を通じて細胞の増殖と機能発現に大きく寄与することが確かめられた .

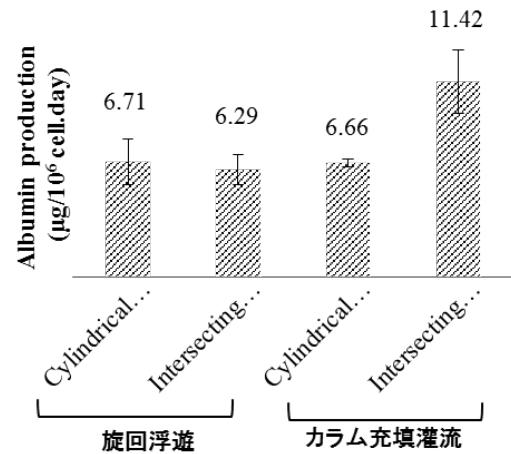


図6 . 灌流培養最終日(10 日目)の細胞あたりのアルブミン分泌能 . Cylindrical, 穴なし ; Intersecting, 中央および側面穴あり .

(3) 人工赤血球の作成と評価： BSA を添加することによって、ファウリング抑制とエマルションの安定性が著しく向上することを見出し、均一な微粒子を得ることに成功した (図 4 B) . 得られた人工酸素運搬体は、直径が 1 ~ 20 µm の間で、1 µm のオーダーで自由自在に粒子径を制御する技術の確立に成功した . さらにメト Hb 生成率は 10%以下であり、作製プロセスによる Hb の酸化失活を防止することに成功した . 得られた酸素運搬体は、-80 °C で凍結保存・再使用可能であり、非常に実用性が高い酸素運搬体である . さらに酸素解離曲線を測定し、Hill プロットに fitting して決定した . Hill 係数  $n$  は 1.2 ~ 1.4 で、 $P_{50}$  値は 8 ~ 12 であり、 $P_{50}$  値と  $n$  は、粒子径には依存しないが、HA/BSA の混合比率によってわずかに変化した (図 4 C) . 生体適合性は、粒子径に依存し、粒子径が 10 µm 以上の運搬体は、HepG2、RWA246.7、HUVEC において、コントロールに対して 100%前後の高い細胞生存率を示した . シリコン酸素運搬体の開発にも成功し、Hb 型と同様に、直径が 1 ~ 20 µm の間で、1 µm のオーダーで自由自在に粒子径を制御し、MPC 処理により分散性が向上するとともに、酸素溶解度が向上することを確認した . 以上の作製に成功した Hb 型とシリコン型の両酸素運搬体を、酸素分圧 1% の低酸素下、3-プロモピルビン酸 (3-BP) によって解糖系を強制的に障害した HepG2 に添加して、培養を 2 週間行った . 運搬体なしでは細胞がほぼ死滅するのに対して、本酸素運搬体存在下では、好氣的呼吸が可能になり、細胞生存率が向上することが示唆された .

#### <引用文献>

McGuigan A. P. and Sefton M.Y., Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion, Proc. Nat. Acad. Sci., 103 (2006) 11461-11466.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

Y. Pang, S. Sutoko, H. Yohei, M. Anzai, T. Niino, Y. Sakai, An insight into in vitro construction of implantable liver: from “bottom up” integrated with “top down” aspects, 生産研究, 査読無, 6715-20 (2015).

Y-T. Lai, M. Sato, S. Ohta, K. Akamatsu, S. Nakao, Y. Sakai, T. Ito “Preparation of uniform-sized hemoglobin-albumin microspheres as oxygen carriers by Shirasu porous glass membrane emulsification technique” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有 2015(127) 1-7 DOI:10.1016/j.colsurfb.2015.01.018

酒井康行、鷹媛、堀本洋平、安斎正博、新野俊樹、マクロ三次元流路ネットワークと小チャンパーからなる組織再構築用担体、バイオインダストリー, 査読無, 31(1), 45-50, (2014).

酒井康行、鷹媛、堀本洋平、安斎正博、新野俊樹、酸素供給に基づいた肝組織の設計と構築、伝熱学会誌, 査読無, 53, 10-15 (2014).

Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y., Transplant. Proc., Engineering of pseudoislets: Effect on insulin secretion activity by cell number, cell population, and microchannel networks, 査読有, 46(4), 1161-1165 (2014).

M. Shinohara, H. Kimura, K. Montagne, K. Komori, T. Fujii, Y. Sakai, Combination of microwell structures and direct oxygenation enables efficient and size-regulated aggregate formation of an insulin-secreting pancreatic  $\beta$ -cell line Biotechnol. Prog., 査読有, 30(1):178-187 (2014).

K. Komori, M. Udagawa, M. Shinohara, K. Montagne, T. Tsuru and Y. Sakai, Formation and harvesting of thick pancreatic  $\beta$ -cell sheets on a highly O<sub>2</sub>-permeable plate modified with poly(N-isopropylacrylamide), Biomat. Sci., 査読有, 1, 510-518 (2013).

Y-T. Lai, S. Ohta, K. Akamatsu, S. Nakao, Y. Sakai, T. Ito “Preparation of uniform-sized poly[methacryloxypropyl tris(trimethylsiloxy)silane] microspheres via Shirasu porous glass membrane emulsification technique”, Journal of Chemical Engineering of Japan, 査読有 2013(46) 777-784 DOI:10.1252/jcej.13we100

Y. Pang, K. Montagne, M. Shinohara, K. Komori and Y. Sakai, Liver tissue engineering based on aggregate assembly: efficient formation of endothelialized rat hepatocyte aggregates and their

immobilization with biodegradable fibers, Biofabrication, 査読有, 4 (2012) 045004.

T. Niino, D. Hamajima, K. Montagne, S. Oizumi, H. Naruke, H. Huang and Y. Sakai, Laser sintering fabrication of three-dimensional tissue engineering scaffolds with a flow channel network Biofabrication, 査読有, 3 (2011) 034104.

K. Montagne, H. Huang, K. Ohara, K. Matsumoto, A. Mizuno, K. Ohta, Y. Sakai, Use of liposome encapsulated hemoglobin as an oxygen carrier for fetal and adult rat liver cell culture, J. Biosci. Bioeng., 査読有, 112(5), 485-490 (2011).

[学会発表](計18件)

Towards an implantable liver construction: from “bottom up” integrated with “top down” technologies, Y. Pang, S. L. U. Stukoko, Y. Horimoto, K. Komori, M. Aazai, T. Niino, Y. Sakai, Biomaterial International 2015, June 1-3, Kengting, Taiwan.

SPG 膜乳化型酸素運搬体による肝細胞への酸素供給の検討 Yao-Tong Lai・太田誠一・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 第14回 日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 神奈川 2015年3月19-21日 O-05-2

ボトムアップとトップダウンを融合する大型組織構築の方法論 肝のような大型・高密度臓器を例に, 酒井康行, 鷹媛, Stephanie L. U. SUTOKO, 堀本洋平, 安斎正博, 新野俊樹, 第13回日本再生医療学会総会, 2014.3.4-6, 京都

Engineering of implantable liver tissue equivalent based on three-dimensional scaffold fabrication and cellular aggregate assembly, Y. Pang, Y. H. T. Niino, Y. Sakai, The 4th International Conference on Additive Manufacturing and Bio-Manufacturing, Oral, Beijing, China, 2014.11.12-14.

Design and fabrication of scalable three dimensional scaffold for in vitro liver tissue engineering, Y. Pang Y. Horimoto, S. Sutoko, T. Niino, Y. Sakai, International Conference on Biofabrication 2014, Oral, Pohang, Korea, 2014.9.28-10.1.

ヘモグロビン/アルブミンマイクロスフィア型人工酸素運搬体の細胞取り込みと生体適合性に与えるサイズの影響 Yao-Tong Lai・太田誠一・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 第21回血液代替物学会 中央大学 後楽園キャンパス 東京 2014年12月8-9日

Design, fabrication and performance evaluation in packed-bed perfusion culture of liver cells, S. Sutoko, Y. Pang, Y. Horimoto, M. Anzai, T. Niino, Y. Sakai, International Conference on Biofabrication

2014, Oral, Pohang, Korea, 2014.9.28-10.1.  
PG 膜乳化法を用いたヘモグロビン/アルブミン架橋型人工酸素運搬体の開発 Yao-Tong Lai・太田誠一・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 日本膜学会 第36 年会 早稲田大学 西早稲田キャンパス 東京 2014 年 5 月 12-13 日 2C-1  
Microfabrication of novel modular design having hollow structures as building units and their feasibility in liver tissue engineering, S. Sutoko, Y. Pang, Y. Horimoto, T. Niino, Y. Sakai, Biofabrication 2013, Oral, El Paso, USA, 2013.11.3-6.

Liver tissue engineering based on the integration of cellular aggregate assembly and three-dimensional scaffold fabrication, Y. Pang, Y. Horimoto, T. Niino, Y. Sakai, JSAO/IFAO Joint International Congress 2013, Oral, Yokohama, Japan, 2013.9.27-29.  
72) Microfabrication of new tissue building units having hollow structures and their feasibility in liver tissue engineering, S. Sutoko, Y. Pang, Y. Horimoto, T. Niino, Y. Sakai, JSAO/IFAO Joint International Congress 2013, Oral, Yokohama, Japan, 2013.9.27-29.

細胞の三次元高密度化と酸素供給の確保, 酒井康行, シンポジウム「再生組織・臓器モデルの三次元構築・培養を如何に達成するか? 工学的アプローチと発生工学的知見の融合を目指して」, 第 12 回日本再生医療学会総会, 2013.3.22-23, 横浜.  
New 3D scaffold consisting of assembled subunits as culture chambers and an interconnected flow-channel network for liver tissue engineering, Y. Pang, Y. Horimoto, K. HARA, Y. Itagaki, T. Niino, Y. Sakai, International Conference on Biofabrication 2012, Oral, Manchester, UK, 2012.10.29-31.

Liver tissue engineering based on perfusion culture of endothelialized rat hepatocyte aggregates loosely-packed with biodegradable fibers, Y. Pang, K. Montagne, M. Shinohara, K. Komori, Y. Sakai, 9th World Biomaterial Congress, Oral, Chandu, China, 2012.6.1-5.

SPG 膜乳化法を用いたヘモグロビン/アルブミン架橋型人工酸素運搬体の開発 Yao-Tong Lai・太田誠一・佐藤真優・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 第 20 回血液代替物学会 奈良県新公会堂 奈良 2013 年 12 月 6-7 日

Preparation of uniformly-sized microspheres of hemoglobin and albumin as oxygen carriers by the Shirasu porous glass membrane emulsification technique, Y-T. Lai, M. Sato, Y. Suzuki, K. Akamatsu, S. Nakao, Sakai Y., T. Ito, Symposium on New

Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012 年 12 月 10 日 36  
ヘモグロビンを用いた SPG 膜乳化法による新規人工酸素運搬体の開発 Yao-Tong Lai・佐藤真優・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター 宮城 2012 年 11 月 26-27 日 PY31  
Development of hemoglobin-based oxygen carriers via SPG membrane emulsification technique Y-T. Lai, M. Sato, K. Akamatsu, S. Nakao, Y. Sakai, T. Ito 日本膜学会第 34 年会 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館 2012 年 5 月 9 日

#### 〔図書〕(計 1 件)

第 18 章, 血流導入型体内埋め込み組織の構築 (分担執筆および監修), 酒井康行, 新野俊樹, 「細胞治療・再生医療のための培養システム」, 紀ノ岡正博, 酒井康行監修, シーエムシー出版, 大阪, pp.159-166 (2010).

#### 〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

#### 〔その他〕

ホームページ等

<http://envchem.iis.u-tokyo.ac.jp/sakai/index.php?lang=ja&page=research&category=2>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 康行 (SAKAI, Yasuyuki)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号: 00235128

##### (2) 研究分担者

白樫 了 (SHIRAKASHI, Ryo)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号: 80292754  
伊藤 大知 (ITO, Taichi)  
東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 50447421

##### (3) 連携研究者

新野 俊樹 (NIINO, Toshiki)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号: 70291929

##### (4) 研究協力者

Yuan Pang  
Yao-Tong Lai  
Stephanie Liana Utami Sutoko