

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750171

研究課題名(和文)複合的細胞集塊および微細加工ハイドロゲル構造を利用する高密度生体組織の再構成

研究課題名(英文)Reconstruction of high-density tissues utilizing complex cellular aggregates and microfabricated hydrogels

研究代表者

山田 真澄 (Yamada, Masumi)

千葉大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30546784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が規則的かつ高密度に配置された3次元組織を生体外において作製するための基盤技術として、複数種の細胞が正確に配置された非球形の微小細胞集塊を作製し、それらを更に組織化するプロセスの開発を行った。まず、異方的ハイドロゲルファイバーや非接着性微小ウェルを用い、部分的に血管内皮細胞によって構成された、直線状オルガノイドや内外異方的トロイダル細胞集塊などの単位集塊を作製した。さらに、それらの単位構造を組織化することによって、血管網を内包する高密度組織や肉厚な血管組織の構築を行い、特に肝臓組織と血管組織については、灌流培養の条件がそれらの機能発現に与える評価を評価した。

研究成果の概要(英文)：We have developed new strategies for reconstructing three-dimensional tissues in vitro, which are composed of densely packed cells with precise alignments. In order to achieve this, we proposed a process to pile up non-spherical unit cellular aggregates composed of multiple types of cells. First, anisotropic hydrogel microfibers or non-cell-adhesive microchambers were used to prepare linear organoids and anisotropic toroidal aggregates. Then, by organizing these unit structures within perfusion chambers or channels, we prepared high-density cellular tissues incorporating vascular networks and thick blood vessel models. In addition, we evaluated the effects of perfusion culture conditions on the functions of liver and blood tissues.

研究分野：生物化学工学

キーワード：ハイドロゲル 生体組織工学 血管 肝臓 マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

たとえば iPS 細胞に代表される幹細胞工学の発展とともに、3 次元的環境において細胞を培養するための手法が注目を集めている。これまでに、細胞のスフェロイド形成、脱細胞化臓器への細胞導入、ハイドロゲル材料への細胞の包埋など、ユニークな手法が多数報告されてきた。このような 3 次元細胞組織では、平面的な培養環境と比較して生体をより高度に模倣することが可能であるため、細胞の機能や生存率の維持が可能となると期待されている。そして、これらの技術を用いて作製された 3 次元組織は、再生医療を目指した移植用の組織・臓器の形成だけでなく、細胞を用いた創薬アッセイ系や、立体的な細胞の相互作用を実現する疾病モデルの作製などへ応用可能であると期待されている。

そして特に近年、大きさが数ミリメートル程度以上であり、かつ細胞が高密度にパッキングされた生体組織を構築する手法も開発されつつある。個別の細胞からミリメートルスケールの組織をワンステップで作製することは通常困難であるため、まず単位組織として高密度な微小細胞集塊を作製し、それらを集積化する手法が有効であると考えられている。近年の研究例として、細胞非接着性表面を用いて作製された球形細胞集塊(スフェロイド)を 3 次元的に配置する手法などが報告されている。しかし、球形の細胞集塊は、より大きな高密度組織を構築するための単位構造としては必ずしも最適であるとは限らず、また、その内部の細胞組成や配置を正確に制御することは困難であった。特に、多種類の細胞が高密度でパターン化された機能的な組織を作製するためには、複数種の細胞を立体的に配置し、さらに細胞を取り囲む 3 次元的な微細環境の物理・化学的性質をマイクロメートルスケールで制御する必要がある。そしてまた、3 次元的な組織の内部に酸素や栄養分を供給するための血管網を形成する必要がある。このように、サイズが大きく複雑な 3 次元生体組織を *in vitro* において形成するための手法の開発は、世界的に見てもその初期段階にあると言えるが、その開発は非常に近年激しい競争下にあり、また目覚ましい発展を遂げつつある。

2. 研究の目的

そのような背景の下、本研究では、肝小葉構造や血管組織、あるいは心筋組織のような細胞が規則的かつ高密度に配置された 3 次元組織を生体外において作製するための技術として、マイクロメートルスケールの正確さで配置された複数種の細胞からなる、非球形の微小細胞集塊を作製し、それらを更に組織化するプロセスの開発を行うことを目的とした。特に、組織体における細胞の機能を長期にわたって維持するためには、組織体内部の細胞に効率的に酸素や栄養分を供給するための血管網を内包する必要がある、そのた

めにも、血管内皮細胞層を部分的に有する非球形の単位組織の利用が不可欠であると考えられる。そこで本研究では、微小な複合型の 3 次元組織を灌流培養条件下において複合化し、血管内皮細胞の有する自発的な管腔構造形成能力を利用することによって、「生体外における高密度 3 次元組織体の構築」に向けた一つの戦略を確立し得るのではないかと考えた。

そして本研究では、具体的には以下の内容を検討することとした。(1) 単位組織として、部分的に血管内皮細胞によって形成された非球形な微小組織体(線形・トロイド(ドーナツ状)・管腔構造を包埋するスフェロイド・格子状集塊など)を作製し、また、(2) 化学的に分解可能なハイドロゲル材料に微細加工を施すことによって、チャンパー構造や灌流培養用流路構造を作製する新規プロセスを開発する。さらに、(3) 微細加工ハイドロゲル基材や流路構造に単位組織体を導入・配置して細胞を 3 次元的に培養し、内皮細胞の自発的な管腔形成能力を利用することで、機能的な生体組織の再構成を試みるほか、複雑な構造を有する血管組織モデルを作製するための技術開発を行う。さらに(4) 形成した組織体の機能評価を行うとともに、生体モデルとしての応用として細胞挙動の観察や細胞機能の評価を行う。これらの検討を行うことによって、単位細胞集塊の複合化プロセスを用いて作製した機能性組織体の利用という、組織工学における新しい道筋の一つとしてのボトムアッププロセスの有効性を実証することを目指した。

3. 研究の方法

本研究の実施内容は、前述のように、(1) 複合的な微小組織体を作製する手法の確立、(2) ハイドロゲルによって形成された微細加工基材・流路を簡便かつ効率的に形成するプロセスの開発、(3) 形成したハイドロゲル基材を用いた個別組織の複合化および血管組織モデルの作製、(4) 作製した組織体の機能評価および応用、に大別される。まず、(1) 複合的な微小組織体の作製については、当研究者らがこれまでに開発を行った、異方的ハイドロゲルマイクロファイバーに対し異種細胞を高密度に包埋する手法を応用し、特に肝細胞組織をターゲットとした組織構築を行った。また、細胞非接着性のウェルあるいはチャンパー構造を用いて、トロイド状、非球形状の単位細胞集塊の形成を行った。さらにまた、非平衡状態の水性 2 相系が平衡状態に移行する過程を利用することで、非球形の細胞包埋ハイドロゲル構造を作製する手法の開発を行った。次の(2) ハイドロゲルによって形成された微細加工基板・流路構造の作製については、細胞非接着性のゲルとしてアルギン酸およびアガロース、細胞接着性のゲルとして酵素架橋ゼラチンを用い、それらによって形成された微細加工基材をモール

ディングおよびボンディングによって形成する手法の開発を行った。さらに、(3) 形成した個別組織の複合化および灌流培養・血管組織の導入については、肝細胞を包埋したファイバーの表面に血管内皮細胞を接着させ、そのファイバーを束の状態に流路にパッキングし、灌流培養を行うことによって、ファイバーの束が一体化したミリメートルスケールの組織体の形成を行った。また、ハイドロゲル流路構造を用いて多層の血管組織モデルを作製する手法、トロイド状の組織を配列することで管腔状組織を形成する手法、ハイドロゲル流路の内壁に血管内皮細胞を播種することで3次元的な血管ネットワークを作製する手法、を提案した。最後に(4) 個別組織の機能評価および応用については、特に肝細胞の場合には、定量的 PCR 法や免疫染色、あるいは ELISA 法などを用い、灌流培養条件(流速等)が細胞の生存率や機能発現に与える影響を評価したほか、薬物代謝酵素の遺伝子発現を解析することで、細胞をベースとする薬剤アッセイ系への適用可能性を評価した。さらにまた、血管組織の場合には、灌流培養時の圧力・流速が、血管内皮細胞の配向や血管平滑筋細胞の機能発現に与える影響を評価したほか、アルギン酸などの余分なマトリックスを除去した際の形状の維持について評価を行った。

4. 研究成果

まず(1)に関しては、細胞集塊の形成のために、ゲルファイバー内に細胞(肝細胞)を高密度で包埋し複合型組織体を形成する手法、非平衡状態にある水性2相水溶液系を利用したゲル内部への包埋手法、犠牲層を用いることで管腔構造を有するスフェロイドを形成する手法、細胞非接着性のチャンバーに対する2段階の細胞導入、などの新規手法を確立することができた。また、非平衡状態の水性2相系が平衡状態へと移行する現象を利用した細胞濃縮手法について、ウェルの材質の濡れ性の違いによる最終形態の変化の違いを観察し、様々な形状を有する単位組織作製の可能性を示すことができた。さらに、ハイドロゲルとして細胞接着性ペプチドを複合化したアルギン酸を用いることで、ハイドロゲル構造の表面に血管内皮細胞を導入することができ、複数種の細胞からなる単位組織の形成が可能であることが確認された。

次に(2)としては、ハイドロゲルを形成するポリマーとしてアルギン酸、ゼラチン、アガロース等の天然素材を主として用い、微細加工によって得られた鋳型を利用したモールドイング手法によって、微細構造(流路・チャンバー)を有するゲル基板を作製した。特筆すべき点として、ゲル基板同士を化学的あるいは静電的に結合する新規手法の開発を行い、ポリリジンを用いた静電的接着手法(アルギン酸ゲル)や、酵素架橋を利用する化学的接着手法(ゼラチンゲル)を実

証することができ、ハイドロゲルによって形成された多層のマイクロ流路構造を簡便かつ正確に作製することが可能であった。

そして(3)および(4)については、まず細胞が高密度にパッキングされた、多様な形状の3次元組織体を作製するための手法の開発を行った。特に、肝組織や血管組織モデルをターゲットとして、線形の複合的組織を形成したハイドロゲルファイバーを束にし、ミリメートルスケールの灌流培養用チャンバーにパッキングし培養を行う手法を開発した。ポンプを用いて数日間の灌流培養を行ったところ、ファイバー表面に接着させた血管内皮細胞の作用によって、ファイバー同士が複合化しつつ、同時にファイバー間に微小な血管様構造が形成される様子が観察され、ボトムアップ手法による灌流培養の有用性を実証することができた。また灌流培養の条件が細胞の機能や生存率に与える影響を評価したところ、流速を変化させることによってアルブミン等の発現量に差が生じること、チャンバーの上流部と下流部においては機能発現量や生存率に違いが出ること、また生体の酸素消費をある程度再現できること、などが確認された。

また、アルギン酸あるいはゼラチンによって形成された流路構造を用いた血管組織構築に関する実験系においては、灌流培養の速度が表面に接着させた血管内皮細胞の配向に与える影響を評価し、3次元構造における血管ネットワーク形成の可能性を実証することができた。さらに、アガロースゲル製の流路構造の内面に細胞を包埋したアルギン酸ゲルを堆積させ、さらにその内側に血管内皮細胞を接着させることで、肉厚な多層の血管組織を作製した。灌流培養を行ったところ、培養時の酸素分圧が細胞の生存率に大きな影響を与えることを見出したほか、灌流の有無によって血管平滑筋細胞の産生するエラスチンの発現に顕著な差が生じることを示した。さらに、細胞の初期濃度を高めることによって、最終的にアルギン酸を除去した後にも組織体の形状が維持されることも確認された。なお、ハイドロゲル製の流路構造以外にも、無機塩を包埋したシリコン製の流路構造を用いた血管様組織の構築や、積層化ゲルのパターン化による肝細胞共培養系の開発を行った。これらの手法は、高密度な生体組織を再現するアプローチとして有用であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) “Facile Fabrication Processes for Hydrogel-based Microfluidic Devices Made of Natural Biopolymers”, Yuya Yajima, Masumi Yamada*, Emi Yamada, Masaki Iwase, and Minoru Seki, *Biomicrofluidics*, 8 (2), 024115 (2014). 査読有

DOI: 10.1063/1.4871936

- (2) “Patterned Hydrogel Microfibers Prepared by Using Multilayered Microfluidic Devices for Guiding Network Formation of Neural Cells”, Yoichi Kitagawa, Yoji Naganuma, Yuya Yajima, Masumi Yamada*, and Minoru Seki, *Biofabrication*, 6 (3), 035011 (2014). 査読有 DOI: 10.1088/1758-5082/6/3/035011
- (3) “Formation of Non-spherical Hydrogel Microstructures Using Non-equilibrium Aqueous Two-phase Systems”, Natsuki Nakajima, Kenta Yamakoshi, Yuya Yajima, Masumi Yamada*, and Minoru Seki, *Proceedings of the 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014)*, 1125-1127 (2014). 査読有
- (4) “Formation of Cell Aggregates Using Microfabricated Hydrogel Chambers for Assembly into Large Tissues”, Masaki Iwase, Masumi Yamada*, Emi Yamada, and Minoru Seki, *Journal of Robotics and Mechatronics*, 25 (4), 682-689 (2013). 査読有
Link:
<https://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mode=present&inputfile=ROBOT002500040014.xml>

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) “肝細胞包埋マイクロファイバーの集積化による灌流可能な肝臓組織モデルの作製”, 矢嶋祐也, 山田真澄, 関 実, 化学工学会 第 80 年会 芝浦工業大学 豊洲キャンパス 東京都江東区 2015 年 3 月 19 ~ 21 日
- (2) ハイドロゲル流路を用いた血管組織作製における培養条件の検討, 木下敬太, 岩瀬優輝, 矢嶋祐也, 山田真澄, 関 実, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来 東京大学生産技術研究所 東京都目黒区 2015 年 1 月 13 日
- (3) “Shape Control of Cell-embedding Hydrogel Microstructures Utilizing Non-equilibrium Aqueous Two-phase Systems”, Natsuki Nakajima, Kenta Yamakoshi, Yuya Yajima, Masumi Yamada, and Minoru Seki, 2014 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS 2014), Nagoya University, Nagoya, Japan, Nov. 10-12, 2014.
- (4) “Construction of Hepatic Lobule-like 3D Tissues Utilizing Cell-Embedding Hydrogel Microfibers”, Yuya Yajima, Masumi Yamada, and Minoru Seki, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), San Antonio, Texas, USA, Oct. 26-30, 2014.
- (5) “ゼラチンを素材とするマイクロ流体デバイスの作製法の開発”, 矢嶋祐也, 山田真澄, 山田絵海, 岩瀬優輝, 雪田千恵子, 関 実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 30 回研究会 北海道大学フロンティア応用科

学研究棟 北海道札幌市 2014 年 10 月 2 ~ 3 日

- (6) “非平衡水性二相系を利用した細胞包埋ハイドロゲル構造体の作製”, 中嶋菜月, 山腰健太, 矢嶋祐也, 山田真澄, 関 実, 化学工学会第 46 回秋季大会 九州大学伊都キャンパス 福岡県福岡市 2014 年 9 月 17 ~ 19 日
- (7) “Rapid Formation of Vascular Tissue Models within Hydrogel Microchannels and Their Characterization”, Keita Kinoshita, Masaki Iwase, Yuya Yajima, Masumi Yamada, and Minoru Seki, RSC Tokyo International Conference 2014 - Analytical Technology Towards Future Society - (JASIS 2014), Makuhari Messe, Chiba, Japan, Sep. 4-5, 2014.
- (8) “ハイドロゲル製マイクロ流体デバイス作製のための微細加工プロセスの開発”, 矢嶋祐也, 山田真澄, 山田絵海, 岩瀬優輝, 雪田千恵子, 関 実, 電気学会 センサ・マイクロマシン部門 総合研究会 東京大学生産技術研究所 東京都目黒区 2014 年 5 月 27 ~ 28 日
- (9) “Microfluidics-based Preparation of Anisotropic Hydrogels for Cell Cultivation and Analysis”, Masumi Yamada, JST ERATO International Symposium on 3D Tissue Fabrication, University of Tokyo, Tokyo, Japan, May 20-21, 2014. (招待講演)
- (10) “ハイドロゲル流路構造を利用した多層血管組織モデルの作製”, 山田真澄, 岩瀬優輝, 関 実, 化学工学会 第 79 年会 岐阜大学柳戸キャンパス 岐阜県岐阜市 2014 年 3 月 18 ~ 20 日
- (11) “Construction of Blood Vessel-like Tissues by Multilayer Cell Assembly inside Hydrogel Microchannels (Best Poster Award, 2nd Prize)”, Masaki Iwase, Masumi Yamada, and Minoru Seki, Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), New Delhi, India, Dec. 15-19, 2013.
- (12) “細胞内包ハイドロゲルファイバーを用いた肝小葉様組織の構築 (優秀ポスター賞)”, 矢嶋祐也, 山田真澄, 関 実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 28 回研究会 イーグレ姫路 あいめっせホール 兵庫県姫路市 2013 年 12 月 5 ~ 6 日
- (13) “Enzymatic Reaction-based Fabrication Processes of Multilayer Microfluidic Devices Made of Gelatin Hydrogel”, Yuya Yajima, Emi Yamada, Chieko Yukita, Masaki Iwase, Masumi Yamada, and Minoru Seki, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 管腔構造を有するスフェロイド・非球形細胞集塊の作製, 山田真澄, 関 実, 3 次

元ティッシュエンジニアリング 第 2 章
第 3 節 pp. 205-212 (全 346 ページ) エ
ヌ・ティー・エス出版 2015 年 3 月

〔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://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山田 真澄 (YAMADA MASUMI)

千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30546784