

研 究 報 告 書

「ボトムアップ組織形成術による生体組織モデルの構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研 究 者: 松永 行子

1. 研究のねらい

組織工学において、従来のトップダウン方式により比較的薄い組織や血管網を必要としない軟骨組織等の構築が実現されているが、ミリメートル厚の組織や、腎臓・肝臓・心臓などの機能性組織の構築は実現されていない。これらの組織の実現には、(i) 高い細胞密度、(ii) マイクロスケールの高次な階層構造、(iii) 組織中への酸素・栄養分の供給を担う 50～200 μm の毛細血管網の構築が重要である。

一方で、マイクロサイズの組織ブロックから生体組織構造を精密に再現するボトムアップ手法が着目されており、これまでのところ、ブロックを積み上げる単純な繰り返し配列制御を可能とする程度にとどまっている。構造だけでなく、機能を持たせた組織の構築には、細胞周辺環境(化学環境、物理環境)の再構築により、三次元組織空間における細胞の極性配置が最重要課題であると考えられる。そこで、本研究課題では、高次な組織構造の構築と細胞周辺環境を制御した三次元組織構築法を確立する。具体的には、マイクロ加工技術により、均一に制御されたマイクロゲルを利用した細胞マイクロユニットを構成要素として、積み木細工様式で大きなマクロサイズの三次元組織を再構成する。そして、三次元組織中に物質を供給しうる微小血管付生体組織システムの構築を達成する。

本研究では、マイクロ加工技術を用いて均一に制御されたマイクロゲルと細胞を構成要素としたマイクロ組織ユニットを作製し、高次構造を有する三次元組織の構築を目指す。さらに、三次元組織中に物質を能動的に供給しうる生体組織システムを構築し、細胞のリモデリングを促し再構成組織の機能創発を目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究期間において、マイクロ流体システムを用いることで、血管様の中空構造や、生体の束状構造のマイクロ組織ユニットの形成を試みた。さらに、灌流、モニタリングが可能な三次元微小血管デバイスを作製し、微小血管を中心とした *in vitro* 生体組織システムを確立した。

具体的には、下記の3項目に関して研究を展開した。

A: マイクロ流体デバイスによる血管様中空構造ユニットの作製

B: 三次元微小血管システムの構築

C: 筋肉様束状構造ゲルの作製

(2) 詳細

研究テーマ A「マイクロ流体デバイスによる血管様中空構造ユニットの作製」

二重管で構成される同軸フロー型マイクロ流路デバイスを用いてマイクロゲルファイバーを作製し、ゲルファイバー上に細胞を接着させる。細胞がゲル表面を覆うまで増殖後、内部のゲルを解離し除去することで、中空状のマイクロ組織ユニットを得る。ここで用いるアルギン酸ナトリウム水溶液は、カルシウムなどの二価のイオンと瞬時に反応してイオン架橋によりアルギン酸カルシウムゲルを形成することから、流れ場でのゲル形成に適している。しかし、アルギン酸カルシウムゲルは操作性、生体適合性に優れているものの、細胞接着性を有しておらず、細胞接着能を獲得するためには、コラーゲンとの複合化や、アルギン酸分子に細胞接着活性を有する RGD ペプチド等をあらかじめ修飾する必要がある。アルギン酸を鉄(III)イオンで架橋することで、アルギン酸ゲルに高い細胞接着・増殖性付与できることが示されており、本研究では鉄アルギン酸ゲルファイバーの形成を着想した。

市販のガラス管を用いて同軸フロー型マイクロ流路デバイス(内管:内径 200 μm 、外管:内径 1000 μm)を作製した。内管にアルギン酸ナトリウム水溶液、外管に FeCl_3 水溶液をそれぞれ送液することで、均一直径のマイクロゲルファイバーを作製した。作製したマイクロゲルファイバーにヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVECs)を播種したところ、鉄アルギン酸ゲル表面へは市販のポリスチレン培養皿と同等の良好な接着・増殖性を示した。なお、鉄アルギン酸ゲル内部への細胞の侵入は観察されず、鉄イオンのキレート剤として知られるデフェロキサミン(DFO)を添加すると、鉄アルギン酸ゲルが解離し、細胞成分のみで構成される中空構造を有するマイクロ組織ユニットを得ることに成功した(図 1D)。また、これらのユニットをゲルの解離前にコラーゲンゲルなどに埋め込み、その後、ゲルを解離することで、三次元組織構造体内に中空の血管様構造が得られることも示している。

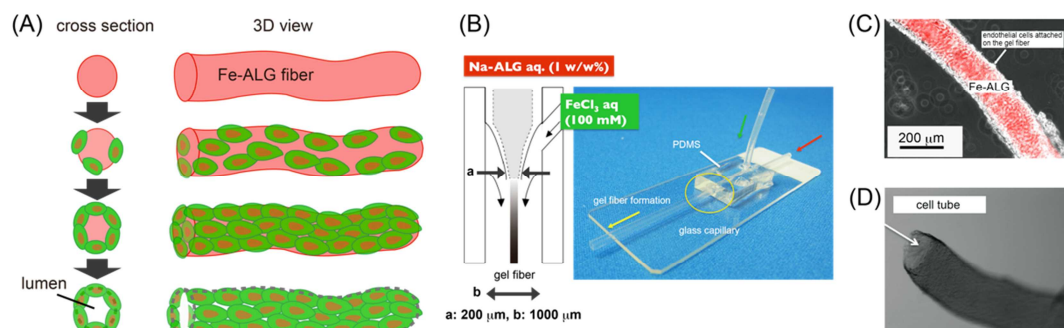


図 1. マイクロ流体システムを用いた細胞チューブの作製

(A) 細胞チューブ作製のコンセプト。細胞接着性の鉄架橋アルギン酸ゲルファイバー(Fe-ALG)上に血管内皮細胞を培養・増殖させる。細胞がゲル表面を被覆し細胞間結合形成後ゲルを解離し除去する。(B) マイクロゲルファイバー作製のための同軸フロー型マイクロ流路デバイス。(C) 細胞が接着した Fe-ALG ゲルファイバー(赤色)の顕微鏡明視野像。(D) キレート剤でゲルを解離後の細胞チューブの顕微鏡明視野像。

研究テーマ B「三次元微小血管システムの構築」

組織工学的に構築した微小血管は、再生医療のための移植片作製だけでなく、発生、薬物動態試験あるいは疾患解明などの生命科学研究への利用が期待されている。物質を能動的に供給し、かつ挙動をモニタリングできる微小血管付生体組織システムの構築について検討した。

マイクロ加工技術を利用してコラーゲンゲル内に非貫通型流路を有するマイクロ組織ユニットとデバイスが一体化したものを作製した。本デバイスでは、マイクロピペットの簡易な操作のみで細胞を高密度にゲル流路内へ集積化することができ、集積化した細胞は培養6時間後には細胞同士が細胞間-細胞間相互作用により接着し、24 時間後には管腔形成および周囲のコラーゲンゲル内へのスプラウティング(血管新生)を確認した。また、管腔形成した細胞は細胞間で VE-カドヘリンを発現しており、さらにコラーゲン TypeIV を分泌し本来の微小血管に近い性質を持ち合わせていることを確認した。本デバイスは溶滴の灌流が可能であるため、成長因子や薬剤の灌流、血管内部のせん断応力(メカニカルストレス)が再現でき、より生体に近い環境を模倣することができる。さらに本デバイスで作製した微小血管組織は、コラーゲンゲル内、あるいは上面に他の細胞を配置することが可能なため、特定の臓器における微小血管環境を再構築できる。また、再生医療のための血管付きマイクロ組織ユニットとしてだけでなく、血管新生研究への応用が期待できる。(論文 1, 特許出願 1)

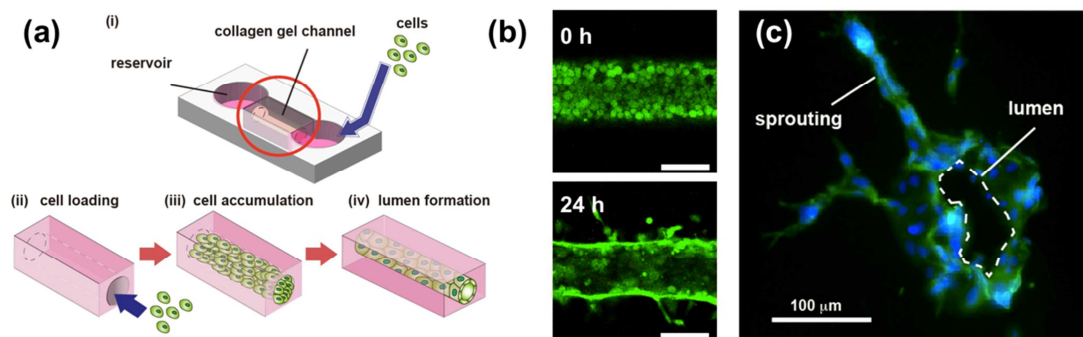


図 2. 細胞集積化コラーゲンゲル流路デバイスによる微小血管組織構築
(a) PDMS 製細胞集積化デバイス. (b) 集積化した細胞の経時変化. Scale bars: 100 μm ,
(c) 培養 24 時間後の組織切片像.

研究テーマ C「筋肉様束状構造ゲルの作製」

ゲルの形状を用途に応じて自在に加工する技術は重要であり、構造制御し階層構造を有するゲルの合成手法の確立が望まれている。たとえば、人工筋肉などのように機械的強度に優れた三次元構造物をハイドロゲルのみで構築する新規手法の開発を目指し、本研究では複数のゲル繊維が集合した束状ゲルの合成法を着想した。束状構造を人為的に作製するには一本一本の繊維を複数本撚り合わせる手法が一般的である。しかし、その構成単位となる一本のゲルファイバーの強度は十分ではなく、空気中における乾燥も速いため個々のゲル繊維からの束化は困難な場合も多い。本研究では作製したゲルファイバーを後加工なしに束を得る新たな手法として、流れ場で高分子凝集体を配向させ、配向状態のままゲルを形成し繊維束を得る新規なゲル形成法について検討した。

プレゲル溶液にセルロースエーテル(CE)とアルギン酸ナトリウム (Na-Alg)の混合水溶液を用いた。CE は下限臨界溶液温度 (LCST)を約 42°C に有する生体適合性高分子である。動的な反応場としてマイクロ流路デバイスを使用した。このデバイスでは、プレゲル溶液とゲル化剤を組み合わせ、瞬時にゲルを形成することで連続したゲルファイバーを得ることが可能である。本研究では、デバイス内の流れによるシアストレスにより、CE 凝集体を直線状に複数本配向させ、Alg をゲル化することで CE 凝集体が整列した束構造を保持した。

CE と Na-Alg からなる相分離状態の高分子ブレンド水溶液をデバイスに送液し、Alg を塩化カルシウム水溶液と接触させることでゲル化した。Ca-Alg ゲル内部に保持された HPC 凝集体は

ジビニルスルホン(DVS)水溶液に浸漬することで架橋した。その後、クエン酸ナトリウム水溶液に浸漬し外殻の Ca-Alg ゲル領域を除去した(図 3)。HPC と Na-Alg の混合比率を調整し、直径約 2 μm の繊維が積層した束状ゲルファイバー(直径約 300 μm)の調製に成功した。得られた束状ゲルは、高強度で、かつ、しなやかに伸長可能で、動物細胞の接着性を有することも明らかとなっており、束構造の形成条件の試験結果から、プレゲル溶液の静置状態における高分子凝集体の存在が重要である。マイクロ流路デバイスの流れ場が、束を構成する個々のファイバーの形成に有効に寄与している。本法は条件設定によりハイドロゲルの三次元微細構造をより精密に制御可能な手法として期待されるだけでなく、生体内の束状構造の構築のメカニズムを探る新しい知見として期待される。(特許出願 2)

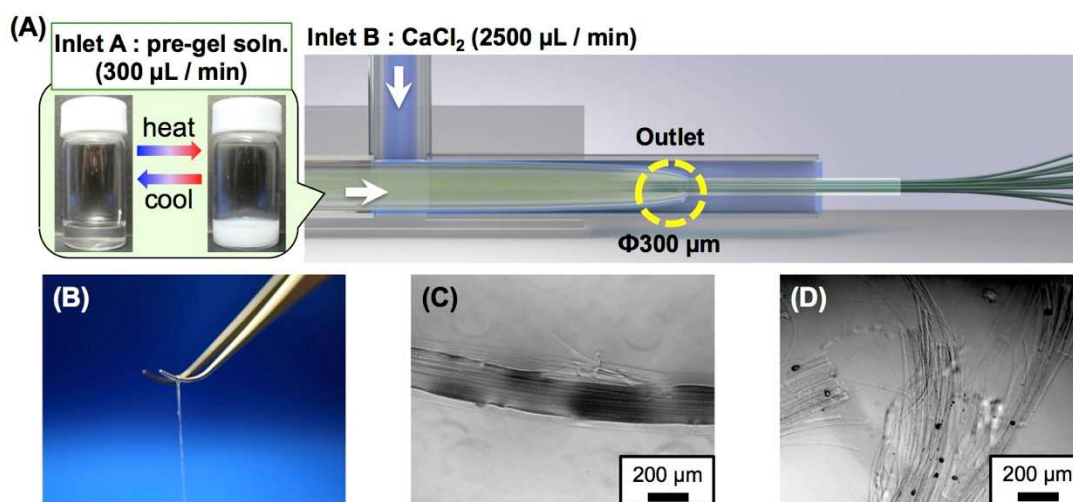


図 3. 相分離現象を利用した筋肉構造を模倣した束状ゲルファイバーの作製
(A) ポリマーの相転移挙動. (B) 作製したゲルファイバー. (C) アルギン酸ゲル除去前のファイバーの顕微鏡像. (D) アルギン酸除去後に得られた束状構造ゲル.

3. 今後の展開

マイクロ流路デバイスを用いた細胞ビーズ、細胞チューブの作製手法と微小血管デバイスの研究成果を説明した。近年では Organ on a chip や Tissue on a chip とよばれるデバイス上に、生体外の組織および臓器の一部の機能を再現し集積する研究が注目を集めており、本研究成果で確立された技術により、移植医療だけでなく、創薬研究における薬物動態試験、生命科学研究への応用を目指したい。

4. 自己評価

(1) 自己評価

「ボトムアップ組織構築」と題し、マイクロ流体技術を用いたマイクロ組織ユニット、高分子の配列制御による階層構造構築について、バイオマテリアルの組み立てによる組織構造構築に関する研究を展開した。さらに、ボトムアップ組織構築により創出可能な精密組織設計を利用し、微小血管を伴う「疾患」に着目し、生体の微小血管構造を模擬したモデル構築に関する研究を展開した。ボトムアップ組織構築法のこれらの成果から当初の目的を達成するだけでなく、さらに今後

につながる発展させた新しい研究を展開できたと評価した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

均一に構造制御されたマイクロゲルと細胞を構成要素とする三次元マイクロ組織ユニットを作製し、それに生命活動維持にひつような物質を能動的に供給しうる生体組織システムの構築を目標とする。具体的には、A: 同軸フロー型マイクロ流路デバイスを用いた血管様中空構造ユニットの作製 B: 三次元微小血管システムの構築 C: 束状構造ゲルの作製という3課題で研究を推進した。Aではマイクロゲルファイバーを微細加工技術により作製し、細胞がゲル表面を覆うまで増殖できることを示し、中空状の細胞被覆マイクロ組織ユニットを得た。Bで高密度にゲル流路内に細胞集積化し、培養6時間後には細胞同士が接着、24時間後には管腔形成および周囲のコラーゲンゲル内へのスプラウティング(血管新生)を確認することができた。また、管腔形成した細胞は細胞間でVE-カドヘリンを発現すること、コラーゲンTypeIVを分泌することを確認し、本来の微小血管に近い性質を持ち合わせていることを見出した。Cで配向状態のままゲルを形成し繊維束を得る新規なゲル形成法についても検討した。

本デバイスは溶滴灌流が可能であるため、成長因子や薬剤の灌流、血管内部のせん断応力(メカニカルストレス)が再現できるという特徴をもっている。さらに本デバイスで作製した微小血管様組織は、コラーゲンゲル内、あるいは上面に他の細胞を配置することが可能なため、特定の臓器における微小血管環境を再構築できる可能性がある。このデバイスが実際に血管モデルとして、どのような性能を発揮するのか、また、生体と比較してどのような問題点があるのかといった生物物理や血液流体・運動学的視点での解析データを得るところまでは達していないが、それは今後に期待したい。こういった分野で評価できる成果が得られれば、今後再生医療のための血管付きマイクロ組織ユニットとしてだけでなく、血管新生研究への応用も期待できる重要な研究となろう。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yukiko T. Matsunaga et al., "Engineering stable micro-capillary structures by controlled 3D-collagen microchannels", Proc. of MicroTAS 2012., 1648-1650.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件

1.

出願番号: 2013-261089 出願日: 2012/12/18

発明者: 松永 行子

出願人: 東京大学

発明の名称: 血管-組織間相互作用観察のための三次元ゲルチップ

2.

出願番号: 2013-038720 出願日: 2013/2/28

発明者: 松永行子、高橋悠太、加藤紀弘

出 願 人：東京大学、宇都宮大学
発明の名称：束状構造を有するゲルファイバー集合体の製造方法

3.
出 願 番 号：2010-273705 出 願 日：2010/12/08
発 明 者：松永行子、尾上弘晃、竹内昌治)
出 願 人：東京大学
発明の名称：血管様構造物を含む三次元細胞培養物

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表】

1. Yukiko T. Matsunaga, “Vascularized Tissue Formation Using Microfluidic System”, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (Osaka) 2013.7.5. (招待講演)
2. Yukiko T. Matsunaga, Nathalie Brandenburg, Isamu Matsuda, Mitsuo Umezu, Yuuki Okubo, “Rapid Formation of Engineered Microvasculatures Using Microfluidic Techniques”, Society for Biomaterials Annual Meeting, 2013.
3. Yuta Takahashi, Norihiro Kato, Yukiko T. Matsunaga, “Formation of Bundle-like Structured Gels Using the Co-flow Microfluidic Device” Society for Biomaterials Annual Meeting, 2013.
4. Yukiko T. Matsunaga, Nathalie Brandenburg, Yuuki Okubo, “Engineering stable micro-capillary structures by controlled 3D-collagen microchannels”, MicroTAS 2012.

【受賞】

1. Best poster presentation award, 米国バイオマテリアル学会, ボストン, マサチューセッツ, 米国, 2013.

【著作物】

1. 松永行子, “ボトムアップ形成術による高次元組織構築の作製”, 日本機械学会誌, 2014 年, Vol.117, No.1142, page 37-40.
2. 松永行子, “マイクロ細胞ビーズによる三次元階層組織の高速形成”, バイオマテリアル-生体材料 -, (2012), Vol. 30, No.3.