

ボトムアップ組織工学

尾上 弘晃¹・竹内 昌治²

細胞を立体的に培養し機能的な3次元組織を人工的に構築する試みが、組織工学および再生医療の分野を中心に近年盛んに研究されている。生体組織の機能を擬した人工の3次元組織が生体外で構築できれば、患者自身の再生細胞による人工臓器の再構築や、動物実験に替わる新薬開発のための試験用の組織など、多くの分野での利用が期待でき、技術の成熟が待ち望まれている。

3次元組織構築の技術的な手法は、主にトップダウン方式とボトムアップ方式の2種類に大別される¹⁾。トップダウン方式とは、生分解性のハイドロゲルやポリマーなどで作られた比較的大きい(ミリメートルスケール以上)立体的な足場に細胞を撒いて3次元組織を構築するものである²⁾。それに対しボトムアップ方式とは、およそ100マイクロメートル程度の微小な組織を大量に用意し、これらをビルディングブロックとして3次元組織を組み立てるというものである³⁾。このボトムアップ方式の組織構築の特徴としては、複数種類の細胞種を空間的に配置することが可能であることである。そのため、内部に複雑な階層構造を持つ臓器(肝臓や脾臓など)を模した組織が、将来的に構築できると期待されている。また大きなサイズ(ミリメートルスケール以上)の組織に栄養分と老廃物を循環させる血管組織網を作り込むためにも、ボトムアップ方式の組織構築は有効なアプローチであるとされ、さまざまな材料と手法を駆使して国内外で研究開発が行われている。

本稿では、ボトムアップ方式の組織構築法について最新の研究を紹介する。ボトムアップ組織工学で主に用いられるビルディングブロックを形状で分類すると、主に面形状(細胞シートなど)、点形状(スフェロイド、培養ハイドロゲルブロックなど)、線形状(細胞培養ハイドロゲルファイバなど)の3種類に分類できる。本稿ではそれぞれのビルディングブロックに関して、その主な製作法とそれを用いた構築された3次元組織について述べる。

面形状のビルディングブロック

面形状の人工組織として代表的なのは、細胞シート(cell sheet)と呼ばれる単一細胞層からなるシート状の組織である^{4,5)}。細胞シートは、培養ディッシュ

表面に固定された温度応答性高分子であるpoly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm)上に細胞を培養することで形成する。この高分子は一般的な細胞培養条件である37°Cにおいては疎水性を示し、培養液中の細胞接着に関与する細胞外基質(Extracellular matrix: ECM)を吸着するため、付着細胞がPIPAAm表面上で培養可能である。シート状の単一細胞層を形成後に温度を20°Cまで下げると、PIPAAmの構造変化により表面が親水性へと変化し、ECMがPIPAAm表面から遊離することで、細胞シートが得られる(図1A-C)。この細胞シートの特徴として、ECMが細胞シート表面に残っているため、細胞シート同士や生体への接着が迅速に行うことができ、高い再現性をもって3次元の積層(図1D-F)や移植を行うことができる。

この細胞シートをビルディングブロックとして利用し、何層にも積層することで立体的な厚みのある3次元組織が造られている。関根らは、心筋細胞と血管内皮細胞を共培養した細胞シートを積層することで、外部組織

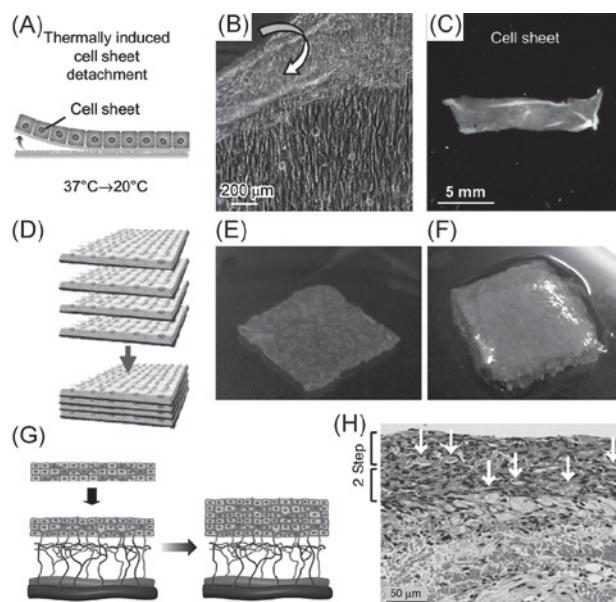


図1. 面形状のビルディングブロックの例。(A) 温度を変化させることによる細胞シートのPIPAAm表面からの剥離⁸⁾。(B, C) 剥離した細胞シートの写真⁸⁾。(D) 積層による3次元組織構築⁴⁾。(E, F) 細胞シートの積層過程⁴⁾。(G) 血管網を持つ積層細胞シートと血管組織の吻合⁶⁾。(H) 移植後の血管網付き積層細胞シート⁶⁾。

著者紹介 ¹東京大学生産技術研究所(助教) E-mail: onoe@iis.u-tokyo.ac.jp

²東京大学生産技術研究所(准教授) E-mail: takeuchi@iis.u-tokyo.ac.jp

と吻合可能な血管ネットワークを持つ3次元組織の構築に成功した(図1G, H)⁶⁾。この構築した組織を移植する際、ホストの血管と吻合することにより、生存率が向上することを示した。また、間葉系幹細胞や筋肉細胞を用いて2次元的に細胞が配向した細胞シートを用意し、それらを積層することで3次元組織内の細胞の方向を揃える試みも報告されている^{7,8)}。細胞シートは、単一細胞層の組織ではすでに臨床⁹⁾や産業¹⁰⁾を見据えた応用研究が始まっており、積層化された3次元組織についても同様の技術開発に期待が集っている。

点形状のビルディングブロック：スフェロイド

点形状のビルディングブロックとして、細胞が集積した直径数十～数百ミクロン程度の凝集塊であるスフェロイド¹¹⁾と、このスフェロイドを用いた3次元組織構築について述べる。細胞はスフェロイドを形成することで、生体環境と類似の3次元環境に特有な細胞機能の発現が見られることが知られている^{12,13)}。スフェロイドの形成方法としては、細胞が接着できない表面を持つマイクロウェルアレイでの培養や、細胞懸濁液の液滴を天井培養するハンギングドロップ法などが一般的である。さらに、ビルディングブロックとして利用しやすくするために、マイクロ加工技術(Micro Electro Mechanical Systems: MEMS)により作製されたpoly-(dimethylsiloxane) (PDMS)のマイクロチャンバアレイ内でスフェロイドを形成することで、直径が制御された均一径のスフェロイドを大量に生産することが可能である(図2A-B)¹⁴⁻¹⁶⁾。同様にしてハンギングドロップ法においても、細胞の分散液の液量をプレートに微細加工を施し制御することで、均一径で直径を制御可能なスフェロイドの作製方法が報告されている¹⁷⁾。また、マイクロ流路を利用することで、均一径かつ複数種類の細胞を共培養したスフェロイドを迅速に形成する方法も提案されている(図2C)^{18,19)}。

スフェロイドを用いて3次元組織を構築する代表的なアプローチの一つはモールドイング法である。細胞非接着性表面を持つ鋳型に多量のスフェロイドを流し込んで培養することで、スフェロイド同士を結合させて3次元組織を形成させる。これにより比較的大きな組織(ミリメートルからセンチメートル)が迅速に形成可能である。Kelmらは、筋芽細胞や軟骨細胞、初代筋繊維芽細胞、初代血管内皮細胞などでそれぞれスフェロイドを形成し、それらをテフロン製のモールドに入れて培養することで、ミリメートルスケールの球体やリング形状のマクロな組織を構築した²⁰⁾。また根岸らは、ラットの大脳新皮

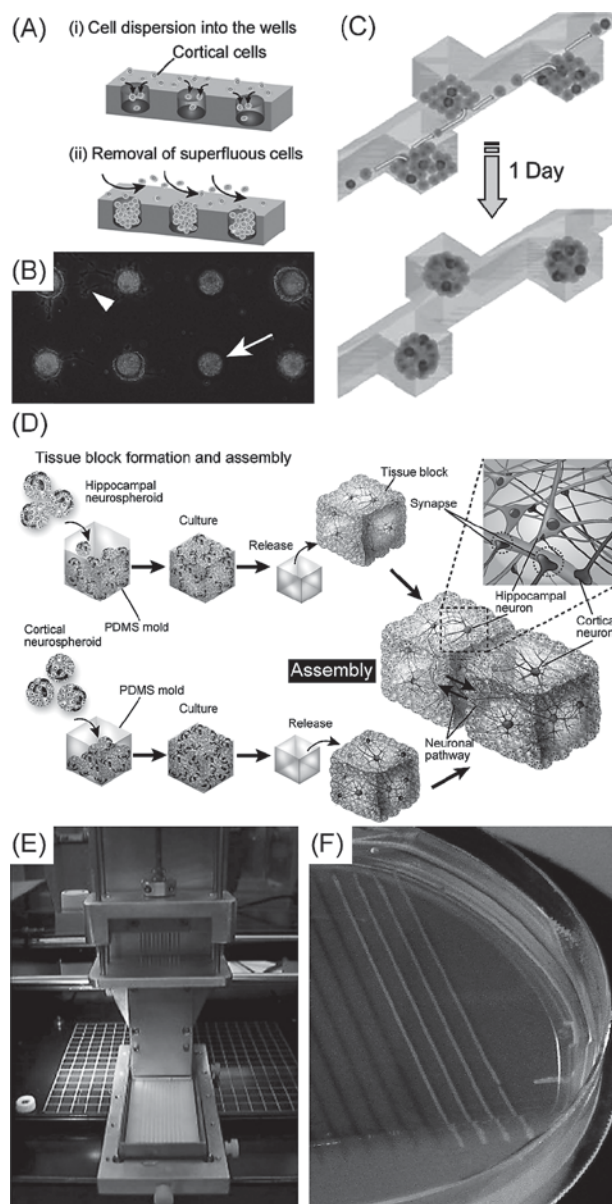


図2. 点形状のビルディングブロックとしてのスフェロイドとそれを用いた3次元組織構築例。(A, B) マイクロモールドイングによるスフェロイド形成¹⁴⁾。(C) マイクロ流路によるスフェロイド形成¹⁸⁾。(D) モールドイングによる3次元組織構築¹⁶⁾。(E, F) プリンティングによる3次元組織構築²⁴⁾。

質と海馬より分離した神経細胞からスフェロイドを形成し、PDMSのモールドに入れて培養することで3次元の神経回路ネットワークを人工的に構築することに成功した(図2D)^{14,16)}。

スフェロイドを用いた3次元組織構築のもう一つのアプローチとして、バイオプリンティング法がある²¹⁻²³⁾。これはインクジェットプリンタや3Dプリンタの機構と同様に、コンピュータ制御で位置が制御された微細なノズルからスフェロイドを溶液の中に射出し、3次元空間

に高速に配置する技術である。射出する溶液にゲル化可能な高分子溶液を用いることで、配置されたスフェロイドの位置を固定し、その後培養する。これによりスフェロイドが互いに結合し、マクロな3次元組織が形成される。この方法は、Computer Aided Design (CAD) で作られた設計図の通りに細胞を配置できること、カラー印刷と同様に複数種類のスフェロイドを利用することでヘテロな3次元組織を構築できることなどが優れた利点である。Norotteらはバイオプリンタを用いて、血管内皮細胞のスフェロイドを多層プリンティングすることで、外径0.9~2.5ミリメートルの血管様のチューブ形状の組織を構築した(図2E-F)²⁴⁾。構築した組織はデザインによって分岐点を作製することが可能であり、3次元的な血管網様の組織がこのアプローチにより構築可能であることを示唆した。

点形状のビルディングブロック： ハイドロゲルビーズ・ブロック

スフェロイドとは異なるタイプの点形状のビルディングブロックとして、ハイドロゲルをビーズ形状やブロック形状にマイクロ加工し、その表面もしくは内部に細胞を播種してビルディングブロックとするアプローチも有望である¹⁾。このアプローチの利点は、細胞の足場となるハイドロゲルをマイクロ加工技術で作製するため、多様な形状が作製できることである。また、通常はスフェロイドを形成しにくい細胞種であっても、ハイドロゲルの材料を適切に選択することで、ビルディングブロックとして扱いやすくなるという利点がある。ハイドロゲルブロックの加工には、マイクロモルディング(図3A-B)^{25,26)}やフローリソグラフィ^{27,28)}、水層と油層を利用した液滴生成流体デバイス(図3C-E)²⁹⁻³¹⁾などが利用される。

このようにして形成されたハイドロゲルのビルディングブロックは、モールドやマイクロ流路を利用して培養することでマクロな3次元組織を形成することが可能である。McGuiganとBruzewiczらはコラーゲンやマトリゲルTMと細胞を混合したハイドロゲルマイクロブロックを作製し、マイクロ流路内に並べることで複数種類の細胞が配置されたマクロな組織を構築した^{32,33)}。松永と森本らは、細胞を表面に培養したコラーゲンハイドロゲルビーズ(細胞ビーズ)を、マイクロ流体デバイスを利用して作製する技術を開発した(図3F, G)³⁴⁾。この細胞ビーズを数万個単位でPDMSの鋳型に入れて培養することで、鋳型どおりにマクロな3次元組織を数時間で形成でき、約24時間が経過しても深部は壊死しないこと

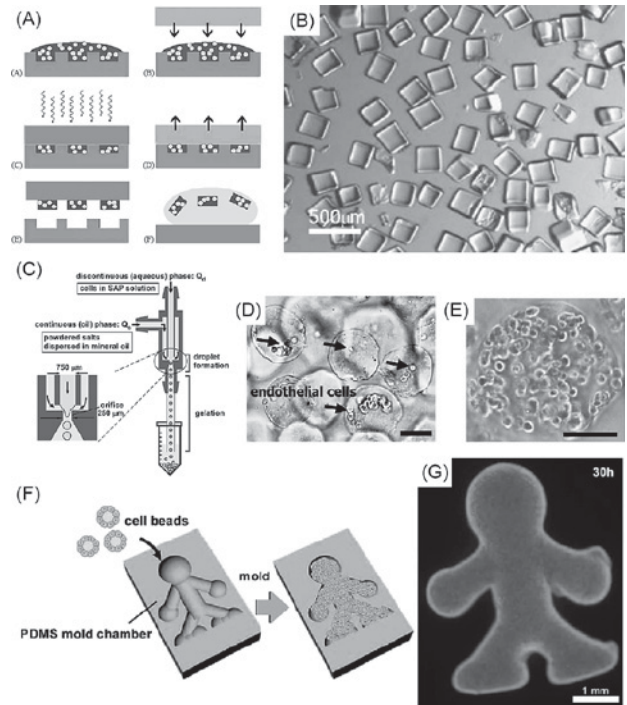


図3. 点形状のビルディングブロックとしてのハイドロゲルビーズ・ブロックとそれを用いた3次元組織構築例。(A, B) マイクロモルディングによるハイドロゲルブロック形成²⁵⁾。(C-E) マイクロ流路によるハイドロゲルビーズ形成³⁰⁾。(F, G) 細胞ビーズのモルディングによる3次元組織構築³⁴⁾。

が示された。

また、ハイドロゲルブロックの特徴である多様な形状に加工できる性質を活かし、鍵と鍵穴の関係にある形状のブロックを作製して、ブロック同士の空間的な位置を精密に決めることも試みられている。Duらはフォトリソグラフィで作製した鍵と鍵穴の形状を持つ2種類の細胞封入ゲルブロックをミネラルオイル中で攪拌することで、自己組織化によりハイドロゲルブロックの組立てが可能であることを示した³⁵⁾。一方で自己組織化を用いず、マイクロ流体デバイス内で鍵と鍵穴を利用したゲルブロックの組立ても報告されている²⁸⁾。これらのアプローチは、より高速に複数種類の細胞を空間的に配置した3次元組織を構築できる可能性があり、今後の技術の成熟が期待できる。

線形状のビルディングブロック

線形状を集積した構造や、線形状を張り巡らせたネットワーク構造は、筋繊維束や神経束、神経ネットワーク、血管網など生体内の重要な組織として数多く存在する。それらの組織を人工的に再構築するために、線形状のビルディングブロックは基本かつ有効な形状であると考え

られる。さらには、巻く、織る、束ねる、繋ぐといった線形状（ファイバ形状）ならではの組立て方法によって、多様なマクロ3次元組織の構築が可能となる。

線形状のビルディングブロックを作るコア技術となっているのは、マイクロ流体デバイスによって連続的に作製されるハイドロゲルのマイクロファイバである³⁶⁾。液体状態のゲル材料をマイクロ流体デバイスに流して層流を形成し、層流状態のまま瞬時にゲル化させることで、ハイドロゲルのマイクロファイバを生成する。また、MEMS技術によりマイクロ流路のデザインを複雑化すれば、3次的に様々なバリエーションを持った層流を自在に作り出すことが可能であり、目的に応じた形状のファイバを構築することができる。なお、層流を利用して形成されたハイドロゲルのファイバ内では、ゲルを構成する高分子のネットワークが流速に応じてファイバの軸方向に配向するため^{37,38)}、細胞をファイバの表面に播種もしくはファイバに内包した際に細胞の増殖や成長などの方向制御が可能であると期待できる。

細胞をハイドロゲルファイバとともに培養する際、ファイバを形成した後に細胞を播種するタイプと、ファイバの作製時に細胞を内包するタイプがある。前者の場合、細胞が付着可能なハイドロゲル材料をファイバ化し、表面に細胞を播種することで線形状のビルディングユニットとする。Kangらは、マイクロ流体デバイスの上面と底面に溝を形成することで、表面に溝を有するリボン状のアルギン酸カルシウムのマイクロファイバを形成し、神経細胞の軸索の進展方向を制御できることを実証した。(図4A-B)³⁹⁾。また境らは、血管内皮細胞を内包したアルギン酸カルシウムとゼラチンによるマイクロファイバを作製し、その表面に平滑筋細胞を播種することで、血管様の層構造を持つ共培養マイクロファイバを形成した(図4C-D)⁴⁰⁾。

一方、後者のタイプとしては、アルギン酸カルシウムゲルに細胞を内包したマイクロファイバが数多く報告されている。Leeらはチューブ状のアルギン酸マイクロファイバを形成し、血管様に細胞が配置された構造を作製した⁴¹⁾。山田らは肝細胞と繊維芽細胞を共培養したアルギン酸マイクロファイバを形成することで、培養が難しいとされる肝細胞の長期培養に成功した(図4E)⁴²⁾。また杉浦らは、HEK細胞を内包したアルギン酸カルシウムゲルのファイバをポリリジンで被覆し、その後カルシウムイオンをキレートすることでHEK細胞が増殖することを確認している⁴³⁾。アルギン酸カルシウムゲルを利用したさまざまなファイバが報告されているが、アルギン酸カルシウムゲルの特徴として細胞が接着できないこと

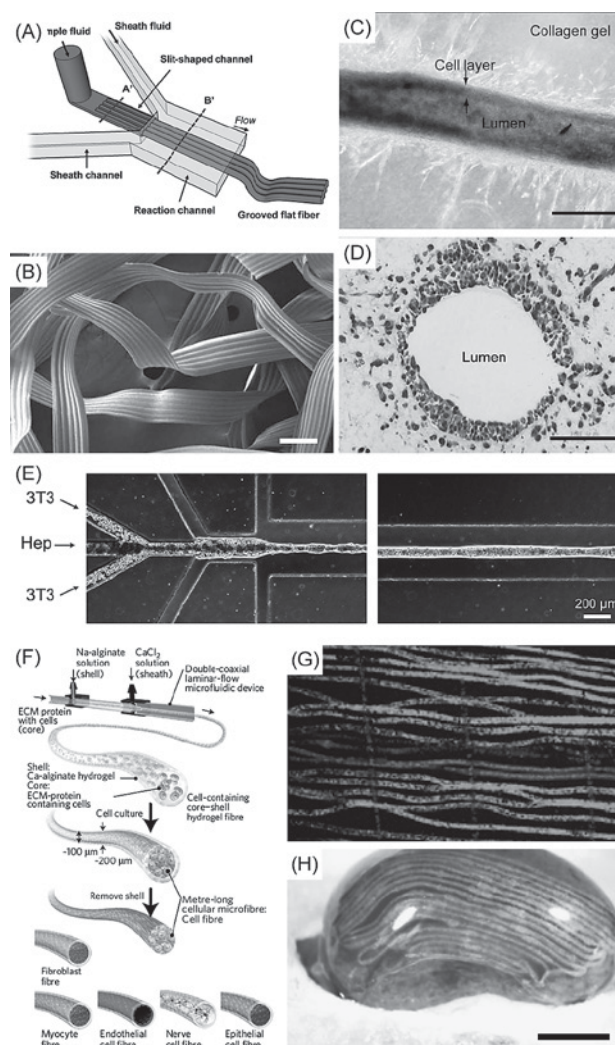


図4. 線形状のビルディングブロックとそれを用いた3次元組織構築例。(A, B) 表面に溝構造を持つハイドロゲルファイバ³⁹⁾。(C, D) ハイドロゲルファイバを利用した血管内皮細胞による管腔構造の形成⁴⁰⁾。(E) 肝細胞と繊維芽細胞の共培養マイクロファイバ⁴²⁾。(F-H) コアシェル型マイクロファイバによる3次元組織構築と腎皮膜下への移植⁴⁶⁾。

があり、そのためゲルに内包された細胞の増殖や組織化が阻害されやすい。この欠点を補うものとして、ゼラチンの誘導体⁴⁴⁾やペプチド超分子ゲル⁴⁵⁾など、細胞接着性がありかつ機械強度の高い材料を合成し、それを用いてマイクロファイバを作製する研究も盛んである。

ハイドロゲルファイバに内包された細胞同士が結合し、組織を形成するための材料として、特にECMの成分は有望である。コラーゲンやフィブリンに代表されるECMハイドロゲルは、細胞が自ら分泌する酵素などにより分解可能であるため、細胞同士の組織化が促進されやすい。このECMゲルの環境をマイクロファイバ内に作製するために、マイクロファイバをコアシェル型にす

ることで、組織化された細胞を内包するマイクロファイバが構成できる(図4F)⁴⁶⁾。この構造はファイバ形状の組織をゲルが包んでいるため、容易にヒモのように扱うことが可能であり、組織を織るようにしてシート状のマクロな3次元構造を構築することができる(図4G)。また、カテーテルなどの細い管を利用して、生体へ移植が可能であることも報告されている(図4H)。

以上の様に、線形状のビルディングブロックにはさまざまな用途が考えられるが、特に血管構造の構築に有望であると期待されている。マクロな3次元組織を人工的に構築する上で、栄養分の供給と老廃物の破棄は組織の維持に必須であり、それを実現することが組織工学の重要な課題の一つとなっている。線形状のビルディングブロックとして血管様の機能を持つ管状の組織を形成し、3次元組織の内部に密に配置することで、栄養分の供給と老廃物の破棄が可能な3次元組織の構築が可能になると考えられ、組織工学・再生医療が抱える問題の突破口になると期待できる。

おわりに

ボトムアップ組織工学として利用される面形状、点形状、線形状のビルディングブロックの作製方法と、それらを用いた3次元組織構築についての現状を紹介した。これらのビルディングブロックのそれぞれの形状に適した組立て手法の成熟が、今後のボトムアップ組織工学の重要な鍵となってくるだろう。また、これらのビルディングブロックは、トップダウン法を含む他の組織構築のアプローチと併用することにより、立体的で複雑な組織を人工的に構築する基盤技術の一つになるものとして、今後の発展に大いに期待したい。

文 献

- 1) Khademhosseini, A. and Langer, R.: *Biomaterials*, **28**, 5087 (2007).
- 2) Langer R. and Vacanti, J. P.: *Science*, **260**, 920 (1993).
- 3) Elbert, D. L.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 674 (2011).
- 4) Yang, J. et al.: *Biomaterials*, **26**, 6415 (2005).
- 5) Matsuda, N. et al.: *Adv. Mater.*, **19**, 3089 (2007).
- 6) Sekine, H. et al.: *Nat. Commun.*, **4**, 1399 (2013).

- 7) Williams, C. et al.: *Biomaterials*, **32**, 5625 (2011).
- 8) Takahashi, H. et al.: *Biomaterials*, **34**, 7372 (2013).
- 9) Nishida, K. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1187 (2004).
- 10) Kobayashi, T. et al.: *Biomaterials*, **34**, 9010 (2013).
- 11) Fennema, E. et al.: *Trends Biotechnol.*, **31**, 108 (2013).
- 12) Pickl, M. and Ries, C. H.: *Oncogene*, **28**, 461 (2009).
- 13) Tung, Y. C. et al.: *Analyst*, **136**, 473 (2011).
- 14) Kato-Negishi, M. et al.: *Biomaterials*, **31**, 8939 (2010).
- 15) Wong, S. F. et al.: *Biomaterials*, **32**, 8087 (2011).
- 16) Kato-Negishi, M. et al.: *Adv. Healthcare Mater.*, **2**, 1564 (2013).
- 17) Hsiao, A. Y. et al.: *Biomed. Microdevices*, **14**, 313 (2012).
- 18) Hsiao, A. Y. et al.: *Biomaterials*, **30**, 3020 (2009).
- 19) Ota, H. and Miki, N.: *Sens. Actuators A Phys.*, **169**, 266 (2011).
- 20) Kelm, J. M. et al.: *Tissue Eng.*, **12**, 2151 (2006).
- 21) Mironov, V. et al.: *Biomaterials*, **30**, 2164 (2009).
- 22) Jakab, K. et al.: *Biofabrication*, **2**, 022001 (2010).
- 23) Nakamura, M. et al.: *Biofabrication*, **2**, 014110 (2010).
- 24) Norotte, C. et al.: *Biomaterials*, **30**, 5910 (2009).
- 25) Yeh, J. et al.: *Biomaterials*, **27**, 5391 (2006).
- 26) Tekin, H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12944 (2011).
- 27) Panda, P. et al.: *Lab Chip*, **8**, 1056 (2008).
- 28) Chung, S. E. et al.: *Nat. Mater.*, **7**, 581 (2008).
- 29) Tan, W. H. and Takeuchi, S.: *Adv. Mater.*, **19**, 2696 (2007).
- 30) Tsuda, Y. et al.: *Langmuir*, **26**, 2645 (2010).
- 31) Kumachev, A. et al.: *Biomaterials*, **32**, 1477 (2011).
- 32) McGuigan, A. P. and Sefton, M. V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11461 (2006).
- 33) Bruzewicz, D. A. et al.: *Lab Chip*, **8**, 663 (2008).
- 34) Matsunaga, Y. T. et al.: *Adv. Mater.*, **23**, H90 (2011).
- 35) Du, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9522 (2008).
- 36) Tamayol, A. et al.: *Biotechnol. Adv.*, **31**, 669 (2013).
- 37) Kiriya, D. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 1553 (2012).
- 38) Kiriya, D. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 7942 (2012).
- 39) Kang, E. et al.: *Adv. Mater.*, **24**, 4271 (2012).
- 40) Sakai, S. et al.: *Biomacromolecules*, **9**, 2036 (2008).
- 41) Lee, K. H. et al.: *Small*, **5**, 1264 (2009).
- 42) Yamada, M. et al.: *Biomaterials*, **33**, 8304 (2012).
- 43) Sugiura, S. et al.: *Lab Chip*, **8**, 1255 (2008).
- 44) Hu, M. et al.: *Biomaterials*, **31**, 863 (2010).
- 45) Zhang, S. et al.: *Nat. Mater.*, **9**, 594 (2010).
- 46) Onoe, H. et al.: *Nat. Mater.*, **12**, 584 (2013).