

成形加工プロセスを模した立体組織作製

景山 達斗^{1,2}・掛川 貴弘¹・福田 淳二^{2*}

再生医療は、移植医療に代わる近未来の新しい治療法として大きな期待を集めている。現在、iPS細胞などの幹細胞から臓器細胞を高効率に分化誘導する技術の確立が精力的に進められており、すでにいくつかの臓器・組織についてその手法が確立されつつある。しかし今後、種々の臓器・組織の再生医療を実現するためには、このような分化誘導技術に加え、生体外で立体的な臓器・組織を構築する技術が必要である。

生体外で立体的な臓器・組織を作り出す方法のひとつは、比較的小さな細胞凝集体や細胞包埋ゲルを作製し、これらを積み木のパーツとして組み上げるボトムアップ型のアプローチである¹⁾。積み木のパーツとして、細胞シートを積み重ねる手法²⁾や、スフェロイドを積み重ねる手法³⁾、さまざまな形状のゲルに細胞を担持して組み上げる手法^{4,5)}などが提案されている。これらのパーツを作製するプロセスには、フォトリソグラフィなどの半導体微細加工技術が用いられており、BioMEMSまたはLab on a chipの1領域を形成している。

一方、Tissue Engineeringの概念が提案された当初のアプローチ、すなわちpolymer scaffoldに細胞を播種するトップダウン型アプローチ⁶⁾では、軟骨⁷⁾や膀胱⁸⁾などの再生医療がすでに臨床応用されつつある。ただし、このようなトップダウン型アプローチでは、細胞密度の高い肝臓や脾臓のような臓器・組織を構築することは困難と考えられている。なぜなら、これらの臓器は緻密な血管構造により酸素、栄養素が常に供給されているが、このような血管構造をpolymer scaffold内に素早く構築することが難しいためである。

トップダウンであろうとボトムアップであろうと、細胞密度の高い厚みのある臓器・組織を作製するには、いかに素早く血管構造をその内部に作製し培養液の送液を開始できるのが重要である。つまり、血管構造の作製プロセスそのものに要する時間が重要なのであり、これに長い時間を要すると培養開始時点ですでに細胞に深刻なダメージを与えることになる。このことは、酸素の供給と消費の収支を考えれば明白である。たとえば、生体組織の100分の1程度の細胞密度であったとしても、細胞の酸素消費速度をもとに計算すると、培養液中の溶存酸素は数十分から遅くとも1時間程度で完全に枯渇し、

細胞は低酸素による重大な障害を受けることとなる。したがって、トップダウン型アプローチの場合は、たとえばscaffold内に極端に低い細胞密度で細胞を播種してすぐに生体内へ移植し、その後の生体内における血管構造の誘引と自発的な組織形成に委ねるほかない。また、ボトムアップ型アプローチでは、短時間で組織を組み上げるか、細胞が酸素を消費しないような低温のプロセスを用いる必要があると考えられる。

筆者らは、このような観点から短時間で血管構造を作製する技術の開発に取り組んでいる。この方法は、どちらかといえばトップダウン型アプローチである。我々の方法を端的に表すと、成形加工プロセスに類似したものといえる(図1)。一般の成形加工では、たとえばプラスチックの原料を金型に流し込んで素早く成形し、ペットボトルなどを作製している。このプロセスを模倣して、臓器・組織を構成する細胞と細胞外マトリックス(ハイドロゲル)を原料とし、剣山のような金型を用いて成形することで、血管構造を素早く作製するというものである。この作製プロセスを、酸素枯渇の生じない素早いプロセスとするため、我々は、①*in situ* 架橋ハイドロゲルと②電気化学的な細胞脱離という2つの独自技術をこれまでに開発した。本稿ではこれらの技術の概略と、これらを用いた素早い血管構造の作製技術について紹介する。

in situ 架橋ハイドロゲル

ハイドロゲルの創製 コラーゲンやマトリゲルなどの生体由来ハイドロゲルは、Tissue Engineeringの足場材料として広く用いられてきた。しかし、これらの材料は培養ディッシュ上に数mmの厚みで薄く塗布した場合でも、ゲル化までに30分程度の時間を要する。これはゲル溶液の温度が上昇し、コラーゲン分子同士に疎水結合が生じるのに時間を要するためである。我々は、コラーゲンの熱変性体であるゼラチンと、多糖であるヒアルロン酸(HA)またはカルボキシメチルセルロース(CMC)を用い、ヒドラジド基(ADH)とアルデヒド基(CHO)をそれぞれ付与したものを作製した(図2)。これらの溶液を混合すると、ADHとCHOの自発的な架橋反応によって、数分以内にゲル化した。しかも、この反応は副生成物として水しか生じないため、細胞の存在下でも細

* 著者紹介 ¹筑波大学大学院数理物質科学研究科 物性・分子工学専攻

²横浜国立大学大学院工学研究院 機能の創生部門(准教授) E-mail: fukuda@ynu.ac.jp

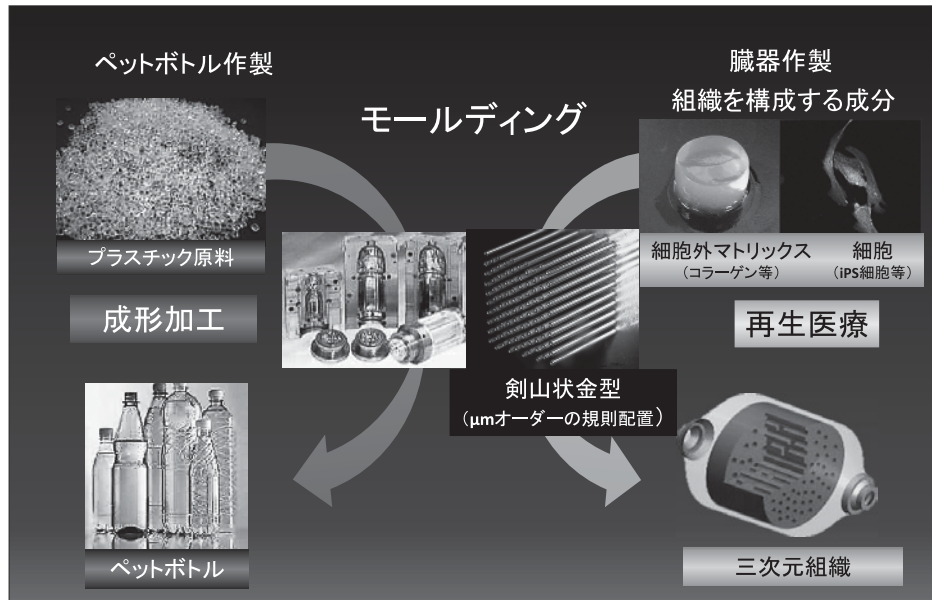
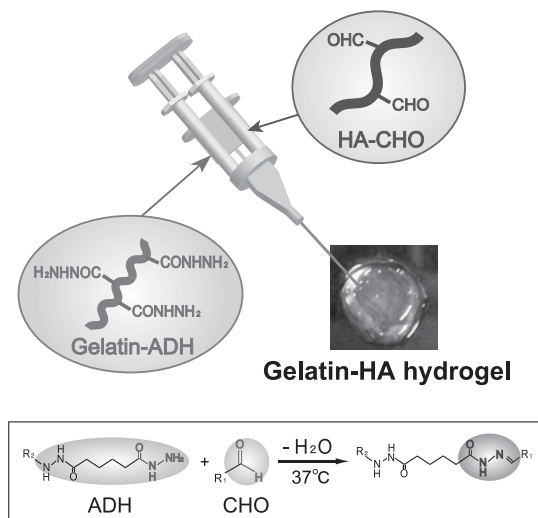


図1. 加工プロセスを模した立体組織の作製法


 図2. *In situ* 架橋ハイドロゲル

胞にほとんど悪影響を及ぼさない。

***In situ* 架橋ハイドロゲルの力学的特性** 立体的な臓器・組織を作製するためのハイドロゲルには、素早いゲル化に加え、全体の構造を維持できる適度な機械的な硬さ、それからゲル内で血管内皮細胞が血管新生できる適度な架橋密度という要件を満たす必要がある。特に、後述するように、緻密な血管ネットワーク構造の形成を誘導するには、血管内皮細胞による血管新生が必要である。機械的強度はヤング率を用いて、架橋密度は凍結乾燥時のマクロな孔の直径により評価した⁹⁾。ゲルの機械的な特性は、官能基の修飾量や2成分の混合比、濃度などに

 表1. *In situ* 架橋ハイドロゲルの力学的特性

ゲル組成 (wt%)	ゲル化時間 (s)	ヤング率 (Pa)	孔径 (μm)
G2.5 C2.0	166 $\pm$ 6	86 $\pm$ 16	288 $\pm$ 15
G5.0 C4.0	28 $\pm$ 3	240 $\pm$ 47	180 $\pm$ 8
G7.5 C6.0	13 $\pm$ 1	426 $\pm$ 19	95 $\pm$ 5

G: Gelatin-ADH, C: CMC-CHO

より調節可能である。表1は、修飾量と混合比を一定とし、濃度のみを変化させた時のゲルの特性を示す。Gはゼラチンの濃度、CはCMCの濃度を示す。いずれの条件でも、ゲル化時間は3分以内であり、組織作製のためのゲルとして適していた。一方、ヤング率は、今回試験した3種類のうち、低濃度 (G2.5 C2.0) の場合では、強度が不十分であり培養中に構造が崩壊した。また、孔径については、高濃度 (G7.5 C6.0) の場合に、管腔形成を阻害する範囲 ($\sim 100 \mu\text{m}$ 以下) となった。実際に、血管内皮細胞をこのゲル内に包埋し評価した結果でも、管腔構造の形成は見られなかった。一方、中間の濃度 (G5.0 C4.0) の場合には、血管内皮細胞をゲルの上面に播種した場合およびゲル内部に包埋した場合のいずれにおいても管腔構造を形成する様子が観察された (図3)。これら結果から、中間濃度 (G5.0 C4.0) のゲルが臓器・組織形成用のハイドロゲルとして適切であると判断した。

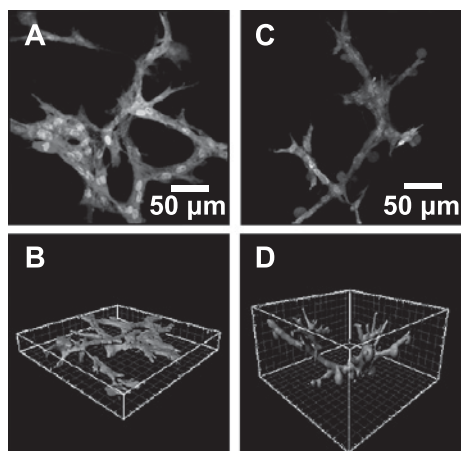


図3. 血管内皮細胞による管腔構造形成 (A, B) ゲル上で3日間培養後 (C, D) ゲル内で5日間培養後

電気化学的な細胞脱離

電気化学を用いた細胞脱離 血管構造の作製には、素早くゲル化するハイドロゲルに加え、後述するように、素早い細胞脱離技術が必要である。細胞を培養表面から脱離させる手法には、これまでにトリプシンのような酵素を用いる方法、温度¹⁰⁾や光¹¹⁾に応答するポリマーを用いる方法などが報告されている。特に温度応答性ポリマー修飾表面は細胞シートの脱離および積層化に有用であり、細胞シートを用いたボトムアップ型アプローチの代表例である²⁾。しかしながら、温度や光を利用する方法は、脱離に時間を要すること、厚みが厚くなるほど温度変化や光照射が難しくなることなど、我々の提案する血管構造の作製プロセスには不向きであった。そこで我々は、電気化学的な反応を用いた細胞脱離技術を考案した(図4)。この細胞脱離には、独自に設計したオリゴペプチドCGGGKEKEKEKGRGDSPを用いる¹²⁾。

このオリゴペプチドは、図4に示すように4つの機能配列から構成されている。末端のC(システイン)はチオール基を持つため、金電極表面に触れると自発的に金-チオール結合を形成する。GGGの配列は、金表面からの影響を低減するためのスペーサー配列である。そして、これに続くKEKEKEKの配列は、正の電荷を持つK(リシン)と負の電荷を持つE(グルタミン酸)の繰り返し配列であり、いわゆる両性イオン配列と呼ばれるものである。このような配列を持つペプチドは、隣り合うペプチド間で静電的な相互作用が生じ、金表面上で自己組織化して密な分子層を形成する。Cの逆末端には、細胞接着配列であるGRGDSPを配置しており、細胞はインテグリンを介してこのペプチドで修飾した表面に接着す

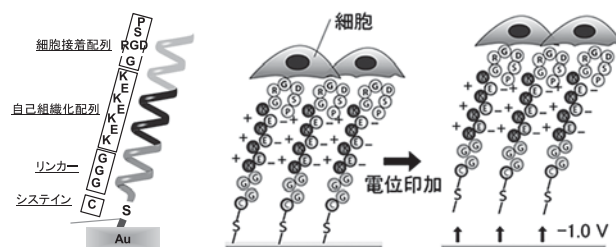


図4. 電気化学的な細胞脱離の原理

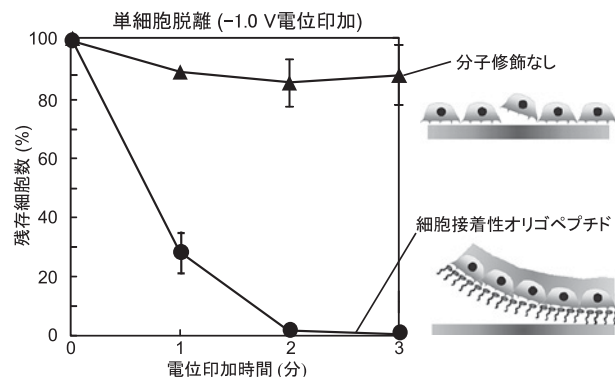


図5. 細胞脱離に要する時間 (▲: ペプチド修飾なし, ●: ペプチド修飾あり)

る。このようにして金電極表面に細胞を接着させた後、金電極表面に一定以上の負電位を印加すると、金-チオール結合が切断され、オリゴペプチド層が表面から脱離する。この脱離に伴って細胞も脱離させるものである。

細胞脱離に要する時間 オリゴペプチドが還元脱離する電位をサイクリックボルタンメトリーにより測定すると、 -0.85 V (vs. Ag/AgCl) 付近に明確なピークが観察された。また、このオリゴペプチドを介して細胞を接着させ、この脱離電位よりも大きな -1.0 V (vs. Ag/AgCl)の電位を印加したところ、2-3分程でほぼすべての細胞を脱離させることに成功している^{12,13)}(図5)。また、ハイドロゲルで細胞を覆い同様に電位を印加してハイドロゲルを剥がすと、細胞をハイドロゲル側に転写することが可能であった。この時、ゲル側に転写された細胞の生存状態は良好であり、細胞間のギャップ結合が維持されたまま転写されていること、細胞極性が逆転するものの12時間の培養中に本来の方向へ再構成されることなどを確認している。

血管構造の素早い作製

血管様構造の作製 我々の提案する血管構造の作製プロセスでは、ハイドロゲル内に単に流路構造を作製す

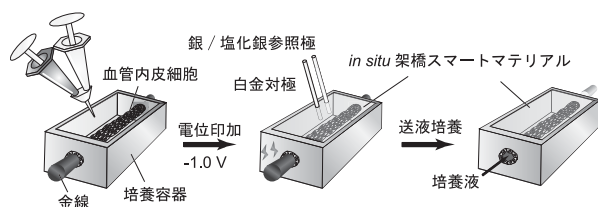
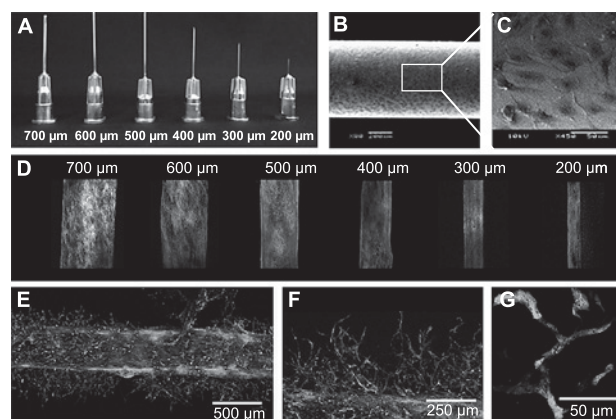
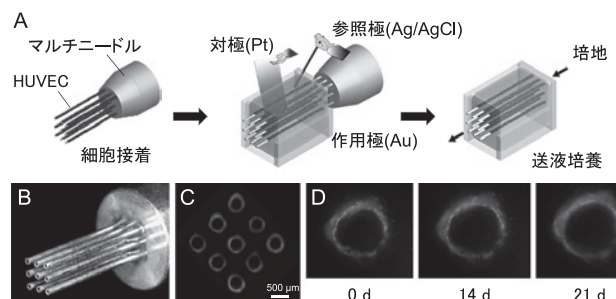


図6. 電気化学細胞脱離を用いた血管様構造構築法

るのではなく、内表面が血管内皮細胞に覆われたよりバイオミメティックな構造を作製する。血管内皮細胞は、血管の最表面を構成する細胞であり、血液凝固や血液成分の組織側との輸送を制御している。したがって、内表面が血管内皮細胞に覆われていることは非常に重要であり、後述するように、これら血管内皮細胞は微小な管腔ネットワーク構造の形成にも寄与する。従来のアプローチでは、ハイドロゲル内に流路構造を作製した後、血管内皮細胞の懸濁液を播種する方法が用いられてきた¹⁴⁾。しかし、この方法では血管内皮細胞を流路表面に接着させるために、一定時間培養液の送液を止める必要があり、酸素の供給も同時にストップしてしまう。したがって、ハイドロゲル内に高密度に細胞を包埋する必要がある臓器・組織の作製プロセスにおいては致命的であった。そこで我々は、剣山様の金型表面に血管内皮細胞を接着させておき、その周囲でハイドロゲルをゲル化させた後、素早く細胞をハイドロゲルへと転写する方法を考案した^{15,16)} (図6)。このようにすることで、流路構造の作製とその内皮化を同時に行うものである。

上述したように、このプロセス全体を15分程度の短時間で終了させ、素早く培養液の送液を開始する必要がある。このような理由から、上述したハイドロゲルと電気化学細胞脱離の2つの技術を融合した。すなわち、金をコートした針に(図7A)、オリゴペプチドを修飾して血管内皮細胞(HUVEC)を接着させ、表面を覆うまで培養した(図7B, C)。この金ニードルを培養チャンバに固定し、*in situ* 架橋ハイドロゲルをその周囲でゲル化させた(約30秒)。そして、金ニードルへ -1.0 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加(5分)してHUVECをゲル側に転写し、金ニードルを引き抜いた。これにより、内表面が血管内皮細胞で覆われた血管様構造を作製した。このプロセスに要した時間は、ゲル化および電位印加時間を含めて10分程度であった。血管様構造の直径は、針の直径によって容易に変えることができ、これまで直径 $200\sim 700\text{ }\mu\text{m}$ のものを作製している(図7D)。また、金ニードルの表面に血管内皮細胞とともに線維芽細胞を共培養すると、その後の送液培養において血管内皮細胞の


 図7. 血管様構造の作製。(A) 直径 $200\sim 700\text{ }\mu\text{m}$ の金ニードル、(B, C) 金ニードルを覆ったHUVECの電子顕微鏡写真 (Day 3)、(D) ハイドロゲルに転写されたHUVECの共焦点レーザー顕微鏡写真、(E-G) 線維芽細胞と共培養した血管様構造から伸長したHUVECの管腔構造 (Day 7)

 図8. (A) マルチニードルを用いた 3×3 の血管様構造の作製手順と(B) マルチニードルの写真、(C) ゲル中での血管様構造の断面写真、(D) 送液培養における血管様構造の変化

管腔ネットワーク形成が顕著に誘導されることが示された(図7E-G)。これは線維芽細胞の産生する成長因子などの作用によるものと考えられる。

血管様構造の三次元配置 内表面が血管内皮細胞で覆われた送液可能な血管様構造を10分程度の短時間で作成可能であることを示した。1本の針を用いた結果であったが、まったく同じプロセスを、針を三次元的に規則配置した剣山様の金型へとスケールアップ可能である。実際に、直径 $500\text{ }\mu\text{m}$ の金ニードル9本を、 3×3 、 $500\text{ }\mu\text{m}$ で等間隔配置した金型を作製した(図8)。我々はこれをマルチニードルと呼んでいる。マルチニードルに金メッキを施し、同様の手順で血管様構造を構築した(図8A)。この血管様構造も送液培養において少なくとも3週間程度構造を維持したまま培養可能であった(図8D)。これまでに、さらに 10×10 のマルチニードルを用い、 1 cm 角のハイドロゲルに血管様構造を導入可能であることを確認している。

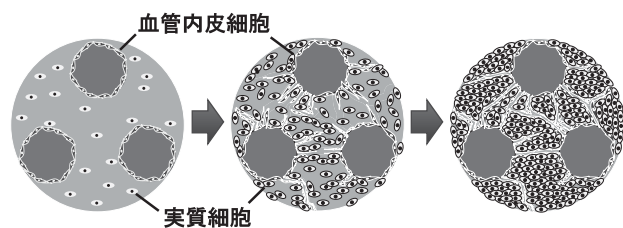


図9. 三次元組織モールドニング

おわりに

本稿では、*in situ* 架橋ハイドロゲルと電気化学的な細胞脱離技術を用いた血管様構造の作製プロセスを紹介した。今後、ハイドロゲル内にiPS細胞などから誘導した増殖性の肝前駆細胞などを包埋し、*in vitro*の送液培養において、血管網を有するcmオーダーの肝組織を誘導したいと考えている(図9)。もちろん、より生体に近い血管構造の作製や、自発的に伸長する管腔構造をいかに制御し血管ネットワークを発達させるのか、肝細胞への分化誘導と如何にリンクさせるかなど、解決しなければならない課題は山積みしている。これらの課題に一つずつ取り組み、生体外で立体的な臓器・組織を作製する技術確立したい。今後、再生医療が本格的に稼働し、従来の移植医療に代わるものとなれば、臓器・組織を工業

的に生産する臓器ファクトリーが現実のものとなるであろう。そこでは、現在のペットボトル生産のように、ロボットなどによって自動化された精密な生産プロセスが必要であり、再生医療のコスト削減にも直接結びつく。本技術をこのような生産プロセスの観点からも発展させていきたい。

文 献

- 1) Khademhosseini, A. *et al.*: *Biomaterials*, **28**, 5087 (2007).
- 2) Sekine, H. *et al.*: *Nat. Commun.*, **4**, 1399 (2013).
- 3) Mironov, V. *et al.*: *Biomaterials*, **30**, 2164 (2009).
- 4) Nichol, J. W. *et al.*: *Biomaterials*, **31**, 5536 (2010).
- 5) Onoe, H. *et al.*: *Nat. Mater.*, **12**, 584 (2013).
- 6) Langer, R. *et al.*: *Science*, **260**, 920 (1993).
- 7) Kisiday, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9996 (2002).
- 8) Raya-Rivera, A. *et al.*: *Lancet*, **377**, 7479 (2011).
- 9) Nichol, J. W. *et al.*: *Biomaterials*, **31**, 5536 (2010).
- 10) Matsuda, N. *et al.*: *Adv. Mater.*, **19**, 3089 (2007).
- 11) Ichimura, K. *et al.*: *Science*, **288**, 1624 (2000).
- 12) Kakegawa, T. *et al.*: *Tissue Eng.*, **19**, 290 (2013).
- 13) Mochizuki, N. *et al.*: *J. Tissue Eng. Regen. M.*, **7**, 236 (2012).
- 14) Zheng, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9342 (2012).
- 15) Seto, Y. *et al.*: *Biomaterials*, **31**, 2209 (2010).
- 16) Sadr, N. *et al.*: *Biomaterials*, **32**, 7479 (2011).