



Title	4. テーラーメイド型3次元細胞複合組織
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50603
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

2節 細胞系バイオマテリアル

4 テーラーメイド型3次元細胞複合組織

1 はじめに

生体組織は、コラーゲン・プロテオグリカンなどのタンパク質・糖タンパク質で構成される細胞外マトリックス(ECM)と細胞により、複雑かつ高度に組織化された構造を有し、機能を発現している。例えば、血管壁は、血管内皮細胞で構成される内膜、平滑筋細胞とコラーゲン・エラスチンで構成される中膜、線維芽細胞による外膜の3層で構成され、中膜のエラスチンが血管壁に弾性を与え、内膜の血管内皮細胞が抗血栓性に重要な役割を担っている。このような細胞とECMで構成される積層化組織を生体外で構築できれば、再生医療における移植用組織や創薬分野におけるヒト生体組織モデルとして有用である。通常の細胞培養法では、自発的な3次元構造形成を誘起するほどのECM成分は産生されず、さらに細胞の接触阻害機能もあるため、単層構造しか得ることができない。これまで、ゲル内に細胞を3次元配置する手法や¹⁾細胞シートを重ねる手法²⁾などによる細胞の3次元化・重層化が報告されてきた。これらの手法は大変有力な手法であるが、特殊な装置が必要、操作が煩雑、ECM成分の形成と制

御が困難、などの課題があった。

著者らは、単層の細胞表面へECM成分のナノ薄膜を形成し、次層の細胞の接着足場を提供することで、細胞の3次元構造体を形成できるのではないかと考えた。つまり、細胞の表面にECMの“ナノレベルののりづけ”をつくることで細胞を1層ずつ積み上げる手法である(細胞積層法、図1)³⁾。本手法は、ECMの成分や膜厚を制御しながら細胞を1層ずつ積層できるため、望みの細胞とECM成分を望みの場所に配置した3次元構造を容易に作製できる、新しい細胞の3次元操作法として期待される。

2 細胞積層法

細胞表面へECM薄膜を形成する手法として、著者らは、ナノメートルオーダーで高分子薄膜を調製できる交互積層法(LbL法)を用いた⁴⁾。交互積層法は、相互作用を有する2種類の溶液に基板を交互に浸漬するだけで薄膜を調製できる手法であり、簡便かつナノレベルでの膜厚制御に適している。接着タンパク質として知られるフィブロネクチン(FN)とコラーゲンの変性体であるゼラチン(G)の交互積層薄

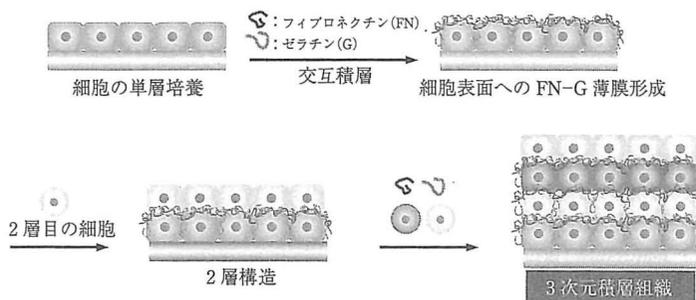


図1 細胞積層法のイメージ(口絵⑩参照)

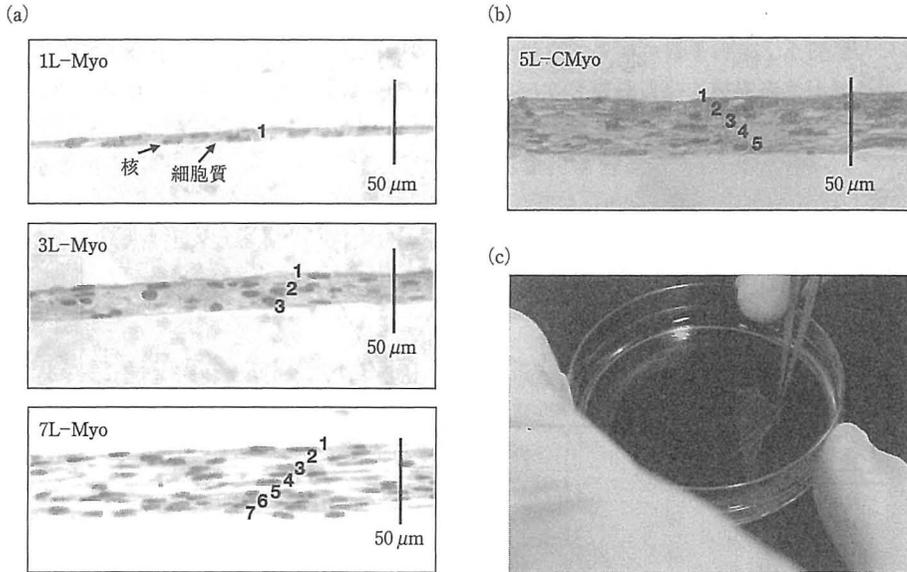


図2 (a) マウス C2C12 筋芽細胞の 1, 3, 7 層構造のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色組織切片写真
 (b) ラット初代心筋細胞の 5 層構造の HE 染色写真
 (c) 4 層のマウス L929 線維芽細胞組織をピンセットを用いて基板から剥離している様子
 (口絵⑩参照)

膜 (FN-G 薄膜) をおよそ 6 nm の膜厚で細胞表面に形成すると、2 層目の細胞が接着した。FN は細胞表面の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンやコラーゲン、ゼラチンとの相互作用ドメインを有しているため、わずか 6 nm という膜厚でも細胞接着足場として機能したと考えられる。一方、薄膜を形成しない場合や、FN 溶液に一度だけ浸漬して FN のみを吸着させた場合、2 層構造は確認されなかった。本手法を用いて、線維芽細胞や筋芽細胞、平滑筋細胞、心筋細胞など、種々の細胞をその層数を制御して積層できることが確認された (図 2)。得られた積層組織は、ピンセットを用いて容易に基板から剥離回収することができる。また、積層化することで単層と比較して細胞がプラスチック培養皿から受けていた炎症が軽減されることや、生体内と同様の高い機能が得られることも見いだされた^{5)~7)}。これらの機能発現は積層数に依存する傾向であり、ECM 成分である FN-G 薄膜と細胞のみで構成される微小環境が生体を模倣した環境を細胞に提示するため、細胞にとって居心地の良い 3 次元環境であると考えている。

3 血管モデル組織の構築と薬剤応答評価

血管モデル組織内に拡散した NO 分子の濃度を定量的に評価する目的で、NO 分子に反応して蛍光を発するマイクロセンサ粒子を作製した⁸⁾。NO 分子は血管内皮細胞から分泌され、NO 分子を受け取った周囲の平滑筋細胞が弛緩することにより血管が拡張し、血圧が降下する。したがって、血管内における内皮細胞から平滑筋細胞への NO 分子の拡散を血管モデル組織により生体外で定量的かつ空間的に評価することができれば、高血圧や糖尿病などの創薬研究において大変重要な知見となる。

NO 蛍光プローブである 4,5-ジアミノフルオレセイン (DAF-2) を直径 1.6 μm のメソポーラスシリカ粒子に内包し、生体適合性高分子であるキトサン (CT) とデキストラン硫酸 (DS) の交互積層薄膜で粒子をキャップすることで、5 ~ 500 nM の NO 分子を検出できるセンサ粒子が調製できた。細胞積層法を用いてヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) とヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) を積層する際に、このセンサ粒子を FN-G 薄膜表面へ吸着させること

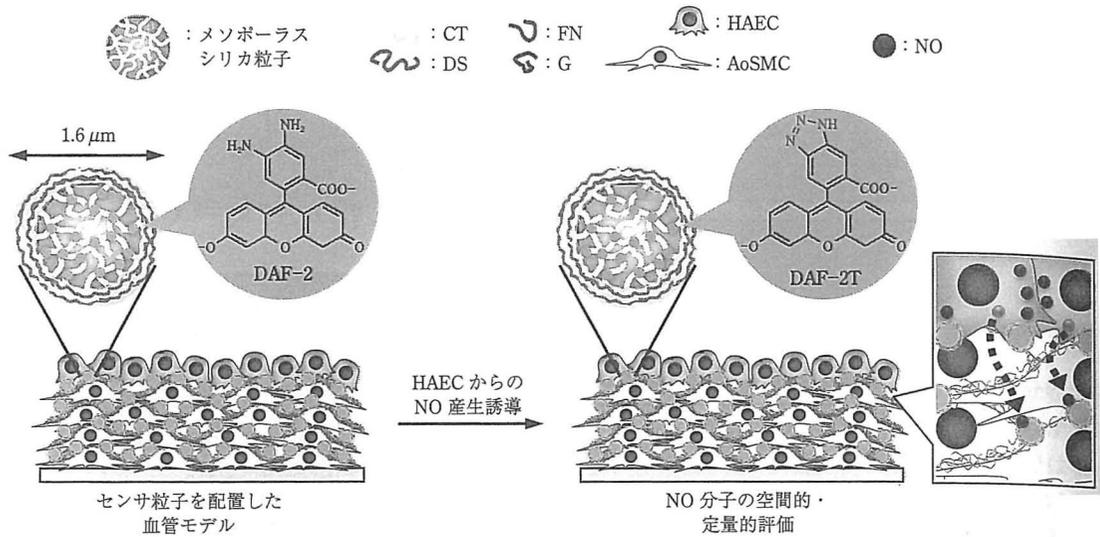


図3 NO センサ粒子を各層に配置した、動脈内皮細胞 (HAEC) と動脈平滑筋細胞 (AoSMC) で構成される血管モデル組織による NO 分子の 3 次元拡散解析のイメージ (口絵⑩参照)

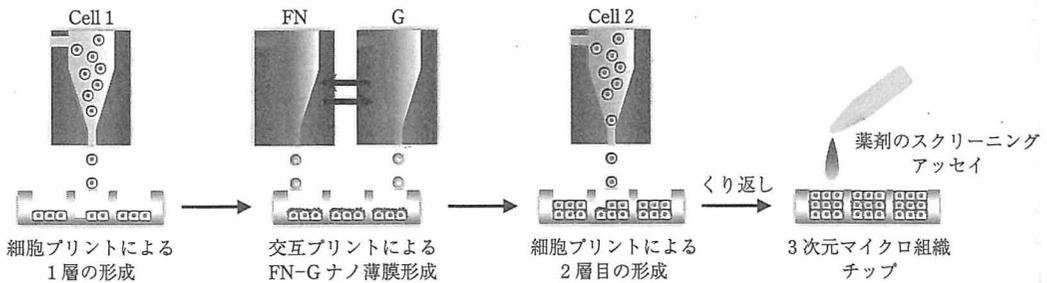


図4 インクジェットプリントによる 3 次元組織チップの構築イメージ (口絵⑩参照)

で、各細胞層間にセンサ粒子を配置した 5 層構造のハイブリッド血管組織を作製した (図 3)。NO 産生薬剤であるブラジキニンを添加した際の内皮細胞から平滑筋細胞層への NO 分子の 3 次元拡散を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により解析した結果、およそ $60 \mu\text{m}$ と見積もられた⁹⁾。これは、*in vivo* および *ex vivo* 動物実験の結果と同程度であり¹⁰⁾、生体外で人工的に構築した血管モデル組織を用いて、NO 分子の拡散を定量的かつ空間的に評価することに初めて成功した。

4 インクジェットプリントを応用した組織チップの構築と薬剤応答評価

細胞積層法で構築した積層構造体を生体組織モデルとして薬剤応答評価に応用するためには、細胞種や層数が異なる組織モデルを大量に作製する必要がある。マイクロメートルサイズのさまざまな組織モデルを集約した「組織チップ」が構築できれば、医薬品評価において大変有効である。著者らは、ピコリットル (pL) オーダで定量・定点配置が可能なインクジェットプリントに細胞積層法を応用して組織チップの作製に取り組んだ (図 4)。薬剤の毒性評価への

応用を目的として、ヒト肝がん細胞(HepG2)とヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)のヘテロ積層組織チップを構築した。肝組織は肝細胞が血管に挟まれた3次元構造であるため、HepG2をHUVECで挟んだ積層構造を構築することでHepG2の代謝活性の向上が期待される。そこで、HepG2とHUVECの1~3層構造を1枚のチップの中に作製して種々

の活性を評価した(図5)。肝細胞機能の指標となるアルブミン産生量を評価した結果、7日間培養後において3層構造が1層構造と比較して4倍以上のアルブミンを産生することが明らかとなった。また、薬物代謝酵素の一種であるシトクロムP450 3A4(CYP3A4)の産生量と活性を評価した結果、やはり3層構造が最も高い産生量と代謝活性を有している

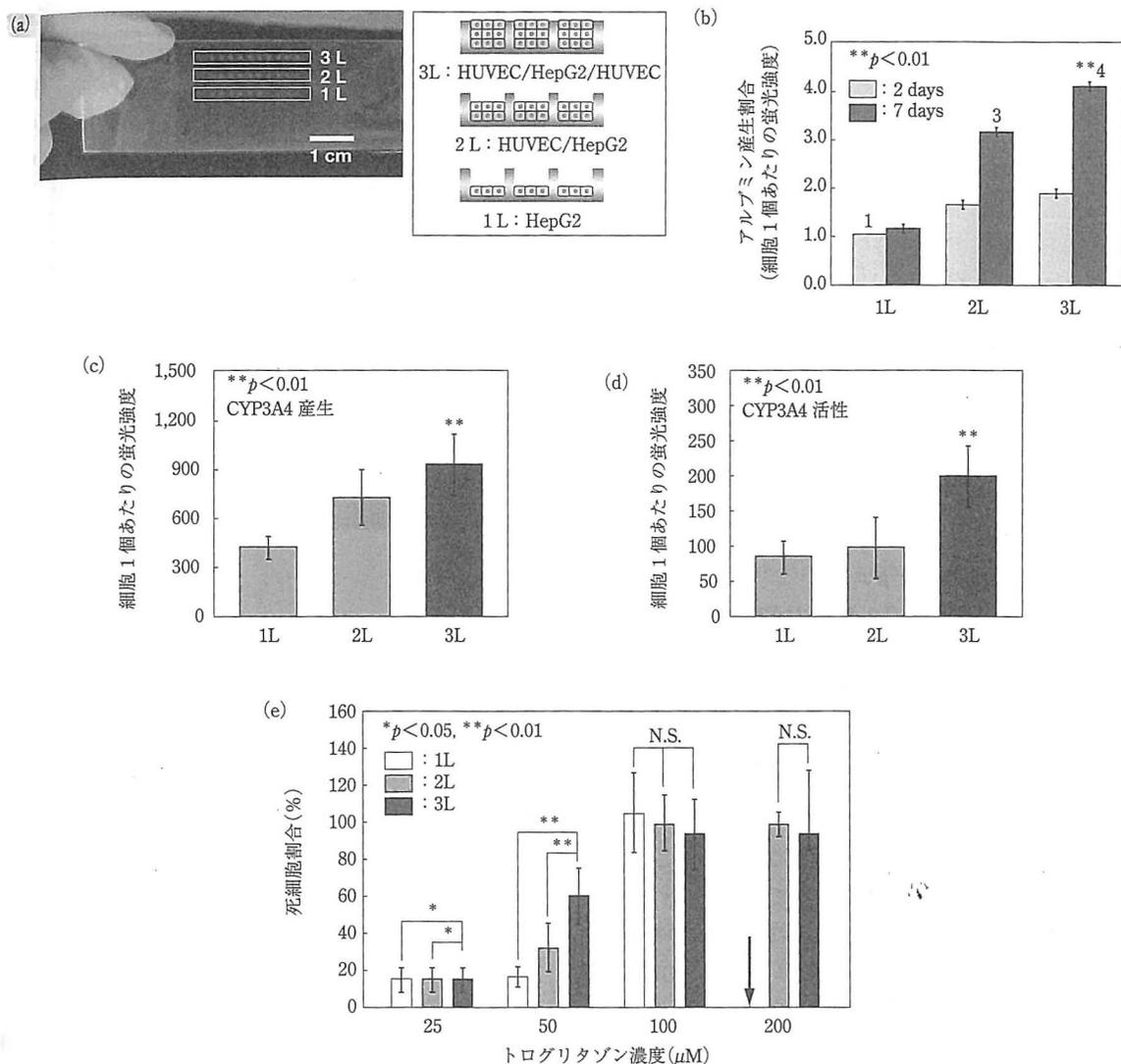


図5 (a)ヒト肝がん細胞(HepG2)とヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)で作製した1~3層構造の肝組織チップの写真 (b)アルブミン発現量と層構造の関係。抗アルブミン抗体で蛍光染色した各ウェルの蛍光強度で比較した。(c)CYP3A4発現量および(d)活性と層構造の関係。抗CYP3A4抗体での蛍光染色で発現量を評価し、vivid redを用いて活性を評価した。(e)トログリタゾン濃度に依存した死細胞の割合と層構造の関係。LIVE/DEADアッセイにより死細胞を蛍光強度で評価した。矢印は死細胞が剥離して定量できなかったことを示す。(口絵17参照)

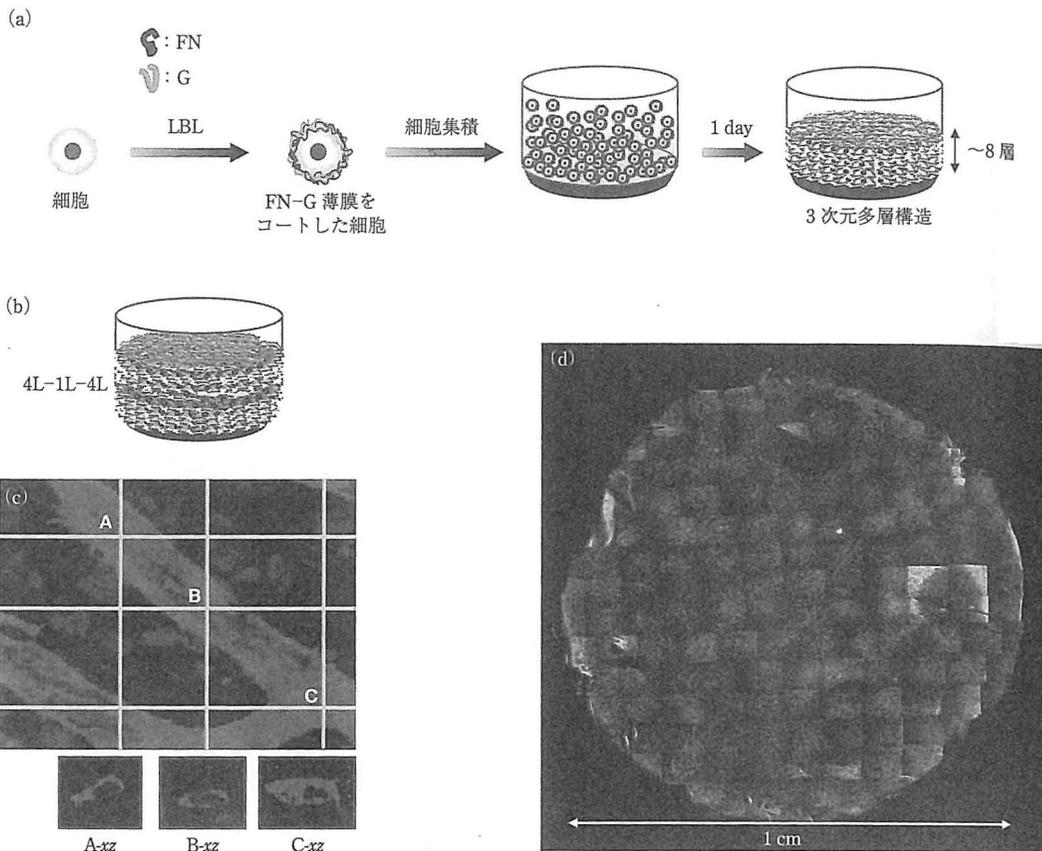


図6 (a)細胞集積法のイメージ
 (b)4層のNHDFで1層のHUVECをサンドイッチ培養したイメージ
 (c)1週間培養後のCLSMによる3次元観察写真。HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色し、核を青に染色した。
 A～Cの箇所のx-z平面観察写真。
 (d)サンドイッチ培養にて1週間培養後のセルカルチャーインサート全体の蛍光観察写真。NHDFはセルトラッカー
 グリーンにて緑に染色し、HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色した。
 (口絵⑬参照)

ことが確認された。そこで、実際に毒性がある薬物、トログリタゾン(TGZ)を用いて評価を行った。CYP3A4で代謝されたTGZ代謝物が細胞毒性を示すため¹¹⁾、CYP3A4代謝活性が高いほど低濃度のTGZで毒性が発現して死細胞数が増加すると期待される。3層構造においてより低濃度でも死細胞が顕著に観察され、とくにTGZが50 μ Mの場合、1層構造では16%の死細胞割合であったのに対して3層構造では60%(約4倍)まで増加し、ヒト初代肝細胞の死細胞割合とほぼ同程度であった。以上より、肝組織のハイスループットな薬剤評価を可能とする革新的な肝組織チップとして応用が期待される。

5 細胞集積法による血管網を有する積層組織の短期構築

以上のように、細胞積層法は望みの細胞種を望みの場所に1層ずつ積層することができる簡便かつ画期的手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで待つ必要があり、1日2層の作製が限度であった。そこで、単一細胞表面にFN-Gナノ薄膜を形成することで、短期間で積層構造が構築できる細胞集積法を考案した(図6)。各細胞がFN-G薄膜を介して3次的に相互作用することで、一度に多層構造が構築できると期待される。FN-G薄膜を形成し

た細胞をセルカルチャーインサートに播種し、24時間培養後に組織切片を観察すると、およそ8層の積層構造が確認された。一方、薄膜を形成しない場合は空隙や凝集が観察され、均一な構造は得られなかった。インサートへの播種細胞数を変化させることで1層から8層まで層数を制御可能であり、また、繰り返して積層することでヘテロな積層構造を容易に構築できた。さらに、4層のヒト皮膚由来線維芽細胞(NHDF)層を形成後、最上層に1層のHUVEC層を形成し、その上に4層のNHDF層を形成してHUVECをサンドイッチ培養することで、毛細血管網のようなHUVECのチューブネットワークが全体かつ均一に形成することを見いだした¹²⁾。最近、細胞シート法においてHUVECをサンドイッチ培養することでチューブ形成が起こることが報告されており¹³⁾、本研究においても同様の現象が見いだされたと考えられる。ネットワークが占める面積はおよそ63%であり、チューブ間距離は50～150 μmであった。以上のように、細胞積層法の改良により短期構築および血管網の導入が可能であり、さまざまな生体組織モデルの構築が期待される。

6 まとめ

ECMのナノ薄膜を細胞表面に形成する細胞積層法を考案し、望みの細胞を望みの場所に1層ずつ積層した組織体が構築できることを見いだした。得られた積層構造体は、生体組織モデルとして薬物評価などに応用できる可能性を有していた。また、本手法をインクジェットプリント技術へ応用することでさまざまな積層構造を1枚のチップに集約した組織チップが作製可能であり、作製した肝組織チップが薬物毒性試験に有用であることを明らかにした。さらに、細胞積層法の課題を改善した細胞集積法により1日で10層近くの積層構造が構築可能であり、

毛細血管網を有した3次元組織モデルが作製できた。これらの手法は、創薬分野・再生医療分野への応用が期待される。

●謝辞

本研究の一部は、NEDO産業技術研究助成事業(06B44017a)ならびにJST-さきがけ事業により実施された。

【引用・参考文献】

- 1) D.R. Albrecht, G.H. Underhill, T.B. Wassermann, R.L. Sah and S.N. Bhatia : *Nat. Methods*, **3**, 369(2006).
- 2) Y. Joseph, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai and T. Okano : *Biomaterials*, **26**, 6415(2005).
- 3) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara and M. Akashi : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689(2007).
- 4) G. Decher : *Science*, **277**, 1232(1997).
- 5) K. Kadowaki, M. Matsusaki and M. Akashi : *Langmuir*, **26**, 5670(2010).
- 6) K. Kadowaki, M. Matsusaki and M. Akashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153(2010).
- 7) M. Matsusaki, K. Kadowaki, E. Adachi, T. Sakura, U. Yokoyama, Y. Ishikawa and M. Akashi : *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* (2011), DOI : 10.1163/092050610X541953.
- 8) S. Amemori, M. Matsusaki and M. Akashi : *Chem. Lett.*, **39**, 42(2010).
- 9) M. Matsusaki, S. Amemori, K. Kadowaki and M. Akashi : *Angew. Chem. Int. Ed.* (2011), DOI : 10.1002/anie.201008204.
- 10) T. Malinsk, Z. Taha and S. Grunfeld : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 1076(1993).
- 11) M. Smith : *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 679(2003).
- 12) A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki and M. Akashi : *Adv. Mater.* (2011), DOI : 10.1002/adma.201101787.
- 13) T. Sasagawa, T. Shimizu, S. Sekiya, Y. Haraguchi, M. Yamato, Y. Sawa and T. Okano : *Biomaterials*, **31**, 1646(2010).

<松崎 典弥/明石 満>