



Title	Layer by Layer 細胞コーティング法 : マテリアル技術からのアプローチ
Author(s)	西口, 昭広; 松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	バイオインダストリー. 2014, 31(1), p. 28-36
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/50609">https://hdl.handle.net/11094/50609</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Layer by Layer 細胞コーティング法

～マテリアル技術からのアプローチ

Layer by Layer Cell Coating ～ Approach from Material Science

西口昭広<sup>\*1</sup> 松崎典弥<sup>\*2</sup> 明石 満<sup>\*3</sup>

本稿では、マテリアル技術からのアプローチとして、細胞積層法および細胞集積法に基づく新しいヒト三次元生体組織モデルの構築および薬剤効果判定・毒性評価への応用について紹介する。人工的に高分子ナノ薄膜を細胞に形成することで組織をビルドアップする本手法は、次世代の組織モデル開発への利用が期待される。

### 1. はじめに

2007年に京都大学の山中教授らによってヒト人工多能性幹細胞 (iPS cell) が樹立されて以来<sup>1)</sup>、創薬開発および再生医療における細胞ソースとして幹細胞研究がより一層注目を集めている。しかしながら、iPS細胞から分化誘導を行って得た各臓器に特異的な細胞を用いるのみでは、三次元的な構造によって機能を発現している生体組織と同等の応答を得ることは難しい。すなわち、幹細胞研究における作製効率ならびに分化誘導技術の発展とは別に、幹細胞をいかにして三次元的に組織化するかが重要となってきた。この三次元組織構築技術は、再生医療における臓器代替のみならず、創薬分野の薬剤の効果・毒性判定、化粧品分野の評価試験においても重要であるため、世界的にも競争は激化している<sup>2)</sup>。そのため、国際競争力に優れた普遍性の高い三次元組織構築技術の

確立と産業化が必要である。

特に、三次元組織構築技術の開発と評価試験法の確立が急務の課題として求められているのは化粧品分野である。EUでは、2003年3月に化粧品指令7次改正が発効され、EU域内での動物実験の禁止と動物実験代替法の開発が求められてきた。延長期間を経て、2013年3月11日より全ての評価試験において動物実験が禁止された。そのため *in vitro* 臓器モデルの開発は急務となっており、例えば皮膚モデルにおいては、2007年にEPISKINなどの培養表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験が欧州代替法評価センター (ECVAM) にて承認されている。しかしながら、適用範囲が極めて限定的であり、強刺激試験での細胞生存率しか評価できないのが現状である。また、このような動物実験代替法の流れは創薬の分野にも波及しており、肝臓や心臓、腎臓、腸粘膜、脳、血管、リンパ管など、臓器・組織の三次元構造や機能を

<sup>\*1</sup>Akihiro Nishiguchi 大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 博士課程学生；日本学術振興会特別研究員 (DC1)

<sup>\*2</sup>Michiya Matsusaki 大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 助教

<sup>\*3</sup>Mitsuru Akashi 大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 教授

反映した生体組織モデルの構築が求められている。

最近、筆者らは、高分子ナノ薄膜を細胞足場として用いることで、三次元的に細胞が積層可能な「細胞積層法」を報告している。本手法では、タンパク質から成るナノ薄膜を細胞表面に直接形成し人工的な足場として用いることで、様々な種類の細胞を積層した三次元積層組織体を構築し、生体組織モデルとして有用であることを報告してきた。また、本手法を改良した「細胞集積法」を開発することで、一日で30層以上(150 $\mu\text{m}$ 以上)の構築を実現し、毛細血管やリンパ管構造の導入を達成した。本技術は脈管形成モデルとして有用

なだけでなく、皮膚モデルへの附属器の導入法としても応用可能である。さらに、インクジェットプリントへの応用による自動化と、マイクロサイズの三次元組織体を数百個集約したチップの作製と毒性評価への応用にも展開している。本手法は、*in vitro*での薬効・毒性評価に有用なヒト三次元生体組織モデルを実現する革新的手法として期待される。

## 2. 細胞積層法による三次元積層組織の構築と組織モデルへの応用

生体組織は、様々な細胞と糖やタンパク質であ

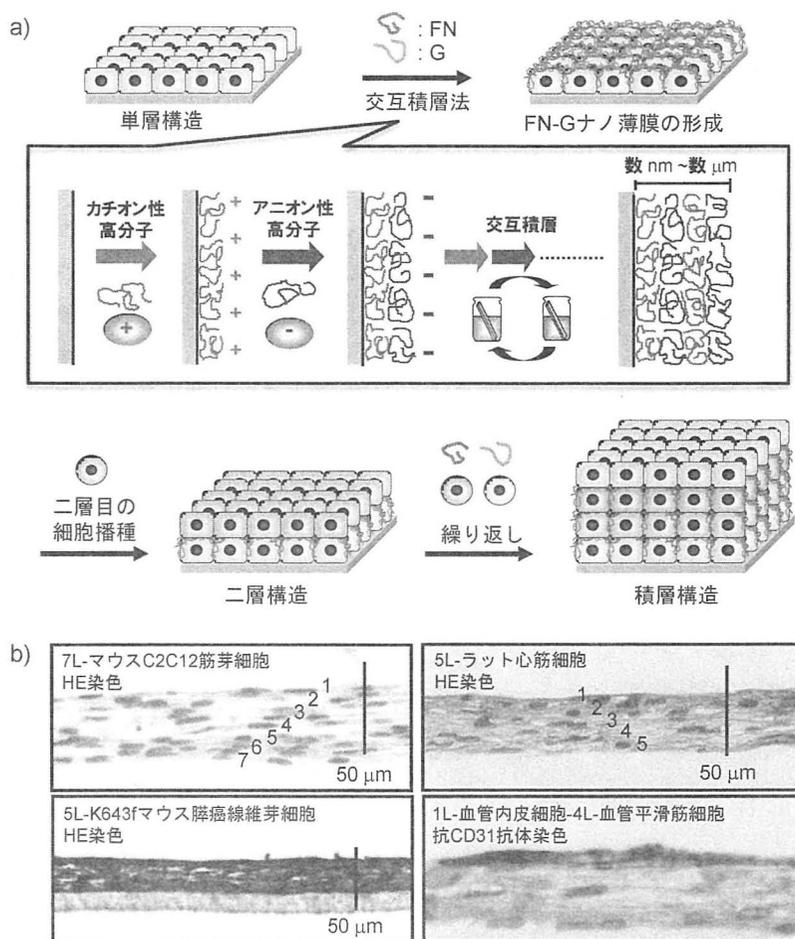


図1 a) LbL法を用いた細胞積層法のイメージ。b) 細胞積層法で構築した様々な積層組織体の組織切片写真。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による組織染色および抗CD31抗体を用いた血管内皮細胞の染色。

る細胞外マトリックス (ECM) から成る複合体であり、その構造は高度に組織化し、階層構造を形成している<sup>3,4)</sup>。しかしながら、生体外で細胞を二次元的に培養するだけでは、自発的に階層構造は形成されない。そのため細胞を立体的にビルドアップするには、細胞の配置を精密に制御する工学的なアプローチ、すなわち組織工学に基づいた手法が求められるが、足場の生体適合性や分解性、接着性、多孔性などに未だ多くの課題を抱えているのが現状である<sup>5)</sup>。

そこで筆者らは、細胞接着のメカニズムに着目し、ECM成分から成る高分子ナノ薄膜を足場として使い、細胞を積層する手法を考案した(細胞積層法、図1)<sup>6,7)</sup>。細胞が接着する時、膜タンパ

ク質を介して基板表面のコラーゲンやフィブロネクチン (FN) などのECMを認識することで細胞接着は可能となる。つまり、このようなECMから成る薄膜が細胞表面に形成できれば、ECMの“ナノレベルののりづけ”によって細胞上に細胞を積層できると仮定した。高分子薄膜を形成する手法として、筆者らは交互積層法 (LbL法) に着目した<sup>8,9)</sup>。本手法は、互いに相互作用する2種の高分子溶液に交互に浸漬するだけで、その基材表面にナノメートルからマイクロメートルオーダーで厚みを制御した高分子薄膜を形成する手法である。接着タンパク質として様々な生理活性を示すことで知られるFN<sup>10)</sup>とコラーゲンの変性体であるゼラチン (G) の交互積層薄膜 (FN-G薄

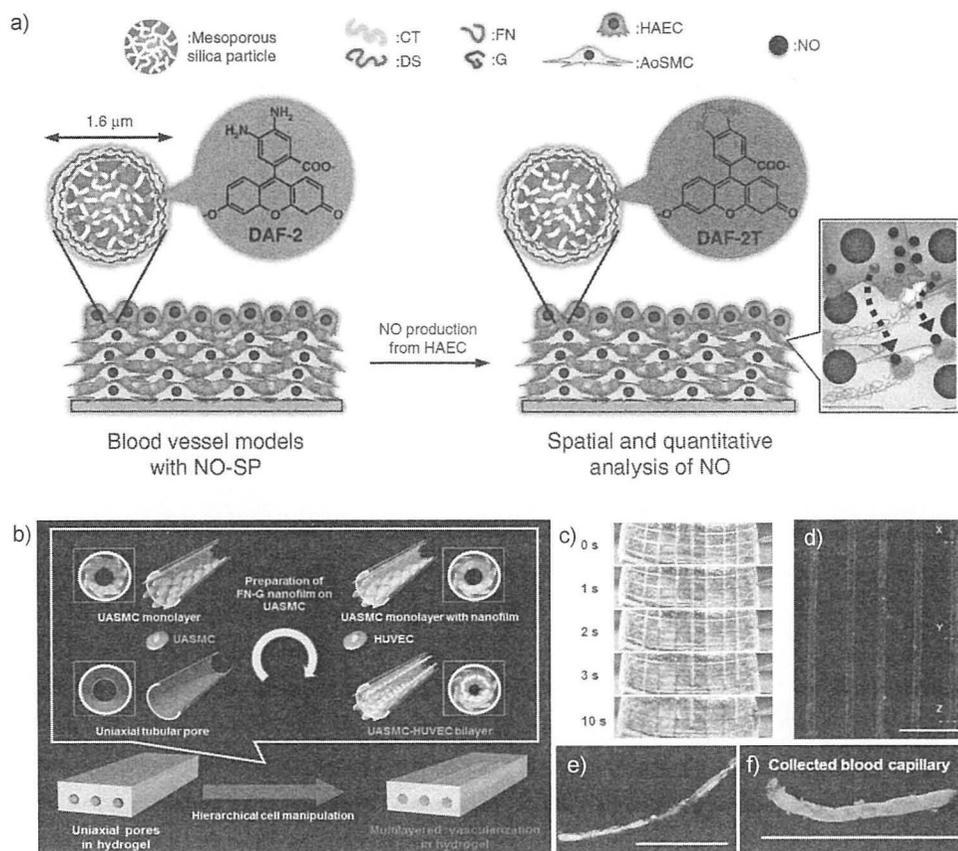


図2 a) 血管壁モデルを用いたNOの三次元拡散解析のイメージ。b) マイクロチャネル型血管モデルの作製イメージ。c) チャネル構造の連結の評価。d, e) マイクロチャネル型血管モデルの蛍光観察画像。f) ゲルを分解させて得られた血管構造体の写真。

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膜厚が薄い場合、均一な2層構造は得られなかった。これらの結果より、少なくとも6 nm以上のFN-G薄膜が次層の細胞接着の足場として重要であることが明らかとなった。この操作を繰り返すことで、望みの細胞および組織厚を有する三次元積層組織が構築可能であった。図1 bのヘマトキシリン-エオジン(HE)染色に示すように、筋芽組織や心筋組織、癌周辺の線維芽組織、血管壁構造体などが構築可能であり、本手法の汎用性の高さが示された。また、積層化することでストレスタンパク質や炎症性サイトカインの発現量が軽減されたため、ECMと細胞に周囲を囲まれた“より生体に近い微小環境”を再現できたと考えられる<sup>11-13)</sup>。

さらに、構築した血管壁モデルを一酸化窒素(NO)の定量解析のためのモデルとして用いると、血管壁組織内での三次元的なNO拡散が生体外で定量可能であることが示された(図2 a)<sup>14)</sup>。さらに本手法は、組織を積層する基材に限定がないため、図2 bに示すようなチャンネル型の多孔質ゲル内にも血管壁モデルが構築可能であった<sup>15)</sup>。チャンネル内に形成された積層組織は均質な構造であり、ゲルを分解することによって血管組織の回収も行った(図2 c-f)。

### 3. 細胞集積法による三次元組織の短期構築と血管網・リンパ管網の導入

以上のように、細胞積層法は細胞の配置を1層ずつ制御して多層構造を構築できる画期的な手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで半日ほど培養する必要がある、1日2層の作製が限度であった。例えば、20層の構造を作製するためには約10日以上もの日数が必要であるため、産業化するにあたって非常に大きな課題であった。

そこで、従来の接着した細胞表面でなく、分散状態の個々の細胞表面にFN-G薄膜を形成し、1段階で積層組織を構築する「細胞集積法」を考案した(図3 a)<sup>16)</sup>。LbL法は薄膜を形成する基材に制限はないため、分散状態、つまり粒子状の細胞表面に対してもFN-G薄膜の形成が可能であり、形成されたFN-G薄膜は細胞間相互作用を誘起可能であると期待した。FN-G薄膜を形成したヒト皮膚由来線維芽細胞(NHDF)を、コンフルエント時の細胞数を1層分とし、望みの層数分の細胞数を一度にカルチャーインサートに播種したところ、わずか1日の培養で、層数を制御した三次元積層組織が構築可能であった。また培地量を増やすことで、細胞の種類に依存せず最大およそ100  $\mu$ m、組織体(NHDF組織およびヒト肝癌HepG2細胞組織)が得られた(図3 b)。

また本細胞集積法を用いることで、血管網およびリンパ管網モデルの構築にも成功している。生体内には、およそ100~200  $\mu$ m毎に毛細血管が存在することで栄養を供給している。そのため、100  $\mu$ m以上の組織体において内部細胞の壊死を防ぐためには、毛細血管網を構築する必要がある。岡野らは、血管内皮細胞を筋芽細胞および線維芽細胞のシートでサンドイッチ培養することで毛細血管様の形態変化が起こり、さらに生体への移植時に血管網構造が有効であることを報告している<sup>17,18)</sup>。本手法においても、層数を制御したNHDF組織によってヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)のサンドイッチ培養を行ったところ、組織内に血管網様のチューブ構造が構築されることを見出した(図3 c)。得られた血管網は非常に高密度(面積で約50%)かつ均一(約100  $\mu$ m毎に形成)であり、拡大して観察したところ生体の血管新生時に起きる形態が観察された。このように血管新生を強く誘導した理由としては、HUVECの三次元培養および周囲のNHDF組織からの血管新生因子の供給が主に考えられる。さらに驚くべきことに、HUVECとヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞(LEC)を同時にサンドイッチ培養したところ、血管とリンパ管が独立し

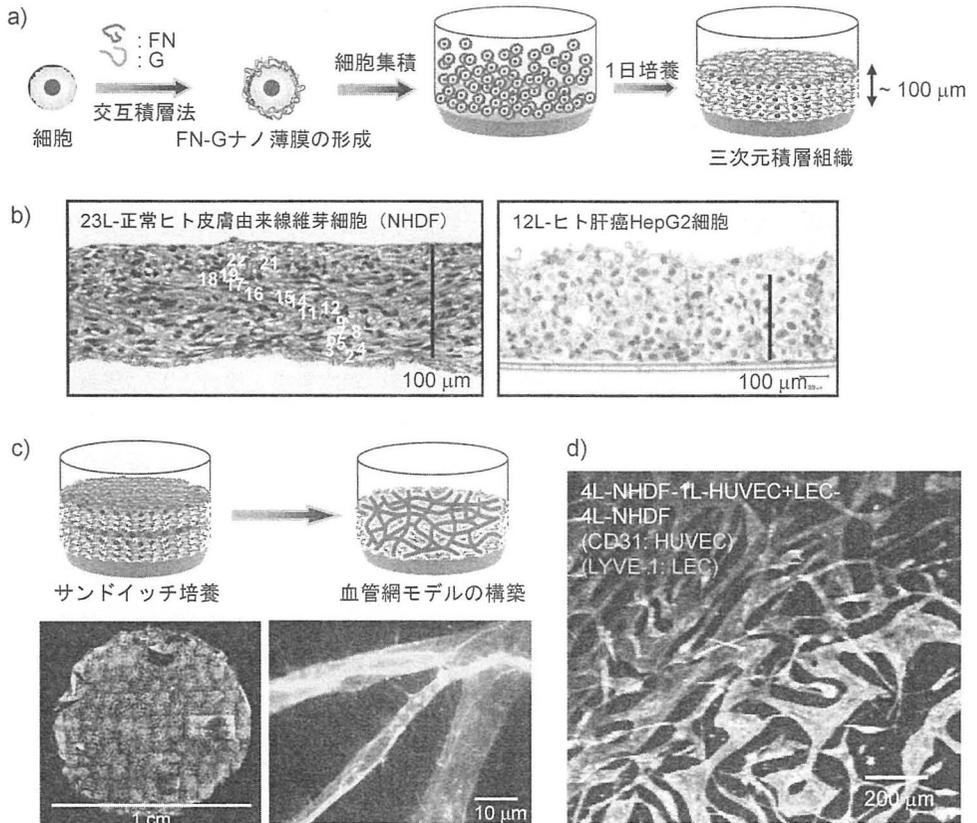


図3 a) 細胞集積法のイメージ。b) 細胞集積法で構築した NHDF 組織および HepG2 組織の HE 染色画像。c) サンドイッチ培養による血管網モデル構築のイメージと蛍光免疫染色による構造観察。d) HUVEC および LEC のサンドイッチ培養組織の蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡イメージ (右)。HUVEC (緑) と LEC (赤) がそれぞれ独立したネットワーク構造を形成。

てチューブ構造を形成し並走した、生体に非常に類似した脈管構造を形成している様子が観察された (図 3 d)。以上より、細胞集積法を用いることで、より厚く、かつ脈管構造を有する三次元組織体の短期構築を実現することができた。

#### 4. 付属器を有するヒト皮膚モデルの構築

現在、市販されている組織モデルとして皮膚モデルが挙げられる。皮膚の構造は表皮層と真皮層に大別され、人工皮膚モデルの研究開発も表皮層のみの「表皮モデル」と表皮層+真皮層の「皮膚モデル」の2種類に分けることができる。皮膚モデルにおいては、EPISKIN などが市販されているものの、承認されている薬剤評価としては強刺

激試験での細胞生存率の評価のみに限定されている。この原因の一つとして、真皮層として線維芽細胞を含む I 型コラーゲンを有するため<sup>19)</sup>、ゲルの収縮により構造が不均一性であり、ケラチノサイト (KC) の接着性や安定性が低い。そのため、抵抗値や水分量、物質透過性などの微小な応答を評価できず、また真皮層に血管、リンパ管、毛髪、色素細胞、免疫細胞などの付属器を含んでいない。そのため、付属器を有する皮膚モデルが構築できれば、アレルギー、発毛、美白試験など、より詳細な評価試験の確立が期待される。

そこで、従来のコラーゲンの代わりに、細胞集積法で構築した線維芽細胞の積層組織を真皮層として使用する手法を考案した。これにより、

約 10~20 層 (40~100  $\mu\text{m}$ ) の均質な構造かつ平滑な表面を有する真皮層を 1 日で作製できるため、ゲルよりも短期間で均一な皮膚モデルの構築が期待される。細胞集積法で構築した 10 層のヒト皮膚由来正常線維芽細胞 (NHDF) と KC を 1 週間分化誘導して作製した皮膚モデルの HE 染色画像より、NHDF の積層組織を真皮層に用いることで、平滑かつ均質な表面および内部構造の皮膚モデルが得られ、分化誘導後においても組織の収縮など従来の問題を解決できたと考えられる。また、表皮層の分化誘導をより詳細に検討するため免疫染色を行った (図 4 b)。サイトケラチン AE1/AE3 染色より、角層の形成が顕著に認められた。また、顆粒層・有棘層に発現されるサイトケラチン 10 (K10) 陽性の細胞層が KC の上部で確認され、基底層で発現される K14 に陽性の細胞層が KC の下部で確認された。増殖期の KC に発現する K16 は本皮膚モデルにおいて顆粒層・有棘層付近で陽性であった。以上の結果より、本皮膚モデルにおいて KC は良好に分化誘導し、角質層・顆粒層・有棘層・基底層の 4 層構造を明確に形成していることが確認された。さらに、これ

まで達成されていない付属器の導入についても検討している。図 4 c は付属器として血管網構造を導入した皮膚モデルの蛍光観察結果であり、真皮層に血管網構造が存在していることが確認された。

## 5. インクジェットプリントによる三次元肝組織チップの創製と薬剤毒性評価

これまで示してきた三次元組織モデルを創薬の前臨床試験へ産業応用するには、組織モデルとしての均質性と大量生産を支える新たな技術開発が必要であると考えられる。その方法の一つとして、ピコリットル (pL) オーダーで定量・定点配置が可能なインクジェットプリント法を応用した細胞操作の自動化が挙げられる。Boland らによってインクジェットによる生細胞の吐出が報告されて以降<sup>20)</sup>、細胞吐出による組織構造体の作製などが報告されており<sup>21)</sup>、近年注目されている技術である。しかしながら、その適用範囲は二次元的な細胞のパターニングやハイドロゲル中への内包に限られているため、インクジェット技術による三次元組織のチップ化は達成されていない。

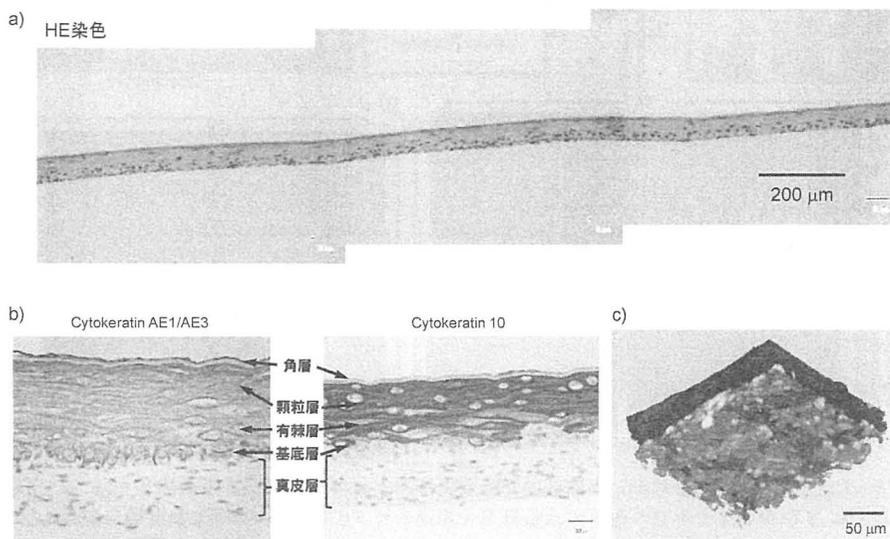


図 4 a) 細胞集積法で作製した皮膚モデルの HE 組織切片写真。b) 皮膚モデルのサイトケラチン AE1/AE3 および 10 抗体を用いた免疫染色写真。c) 付属器として血管網を含む皮膚モデルの蛍光観察画像。

そこで筆者らは、FN-G 薄膜形成を用いた細胞積層技術とインクジェットプリント法を融合させることで、マイクロメートルサイズの様々な組織モデルを集約した「組織チップ」の構築に取り組んだ (図 5 a)<sup>22)</sup>。細胞の吐出に加えて、FN 溶液と G 溶液の吐出による薄膜形成をインクジェットプリントを用いて行うことで、細胞の定点配置と操作の自動化が達成され、創薬評価に応用可能な組織チップが構築できると考えた。発熱の影響の少ないピエゾ式インクジェットを用いて、タンパク質溶液の吐出および細胞の吐出実験を行った。図 5 b) に示すように、蛍光ラベル化した Rh-FN および FITC-G を各層数で交互に吐出したと

ころ、マイクロメートルオーダーで配置が制御された FN-G 薄膜の形成が確認された。また、プリンターヘッドの口径と吐出液滴数を変えることで、細胞の吐出数を 1 個から 10,000 個まで精密に制御可能であった (図 5 c)。また、NHDF、マウス C2C12 筋芽細胞、HUVEC など細胞の種類を変えても生存率は 95% 以上であることが確認された。組織チップの基板として、直径 500  $\mu\text{m}$ 、高さ 200  $\mu\text{m}$  のウェルを 440 個有するウェル基板を用いた (図 5 d-f)。このウェル基板へマウス C2C12 筋芽細胞を吐出して接着させ、FN 溶液と G 溶液を交互に吐出することで細胞表面にナノ薄膜を形成した。その後、再び筋芽細胞を吐出する

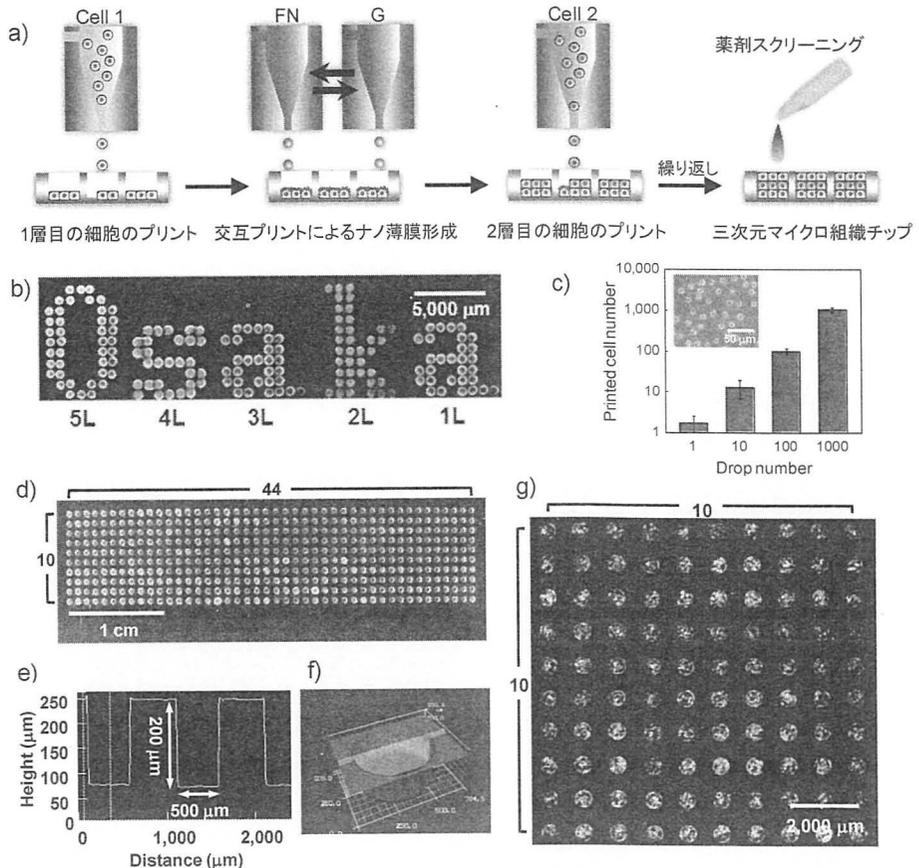


図 5 a) インクジェットプリントによる三次元組織チップの構築イメージ。b) インクジェットプリントによる FN-G 薄膜の形成。Rh-FN および FITC-G を使用し、薄膜の層数と配置を制御。c) 細胞の吐出条件の評価 (濃度:  $1 \times 10^7$  cells/mL)。d) 使用した 440 マイクロウェル基板。e, f) レーザー顕微鏡によるウェルの構造解析。g) C2C12 筋芽細胞の 2 層構造を作製したチップの蛍光顕微鏡写真。細胞はセルトラッカーグリーンで蛍光染色した。

ことで、筋芽細胞の2層構造を作製することができた(図5g)。

組織チップとして薬剤評価へ応用することを目的として、次に肝組織チップの作製を試みた。肝臓は薬物や化合物を分解する重要な臓器であり、薬物毒性の7割は肝臓で発現するため医薬品開発では最も重要な臓器である。本来、この薬物代謝試験を *in vitro* で行う場合には、ヒト初代肝細胞を用いて細胞試験が行われるべきであるが、日本国内では入手困難であり、より機能の低い株化されたヒト肝癌細胞(HepG2)が使用されているのが現状である。そのため、より生体の肝組織に近い機能を持ったHepG2細胞から成る組織モデルが構築できれば、低コストでのハイスループットスクリーニングが達成されると期待される。筆者らは、肝組織の構造に着目し、HepG2をHUVECで挟んだ積層構造を構築することで肝組織としての機能の向上を試みた。まずは、HepG2とHUVECの1-3層構造を一枚のチップの中に作製

して種々の活性を評価した(図6a)。基礎的な細胞機能を評価するために、蛍光免疫染色によって各層数の肝組織におけるアルブミン産生量を定量した。その結果、7日間培養後において、アルブミンを産生する肝細胞の細胞数は一定であるにも関わらず、HUVECでサンドイッチした3層構造が1層構造と比較して4倍以上多く産生していることが明らかとなった(図6b)。また、薬物代謝酵素の一種であるシトクロムP450 3A4(CYP3A4)の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ことが確認された(図6c)。そこで、実際に毒性がある薬物を用いて評価を行った。トログリタゾン(TGZ)は、インスリン抵抗性を軽減する糖尿病治療薬として市販されたが、肝障害が明らかとなり2000年に自主回収された薬剤である。その後の分析で、CYP3A4で代謝された反応性代謝物が毒性を示すことが明らかとなった<sup>23)</sup>。つまり、CYP3A4代謝活性が高いほど低濃度のTGZ

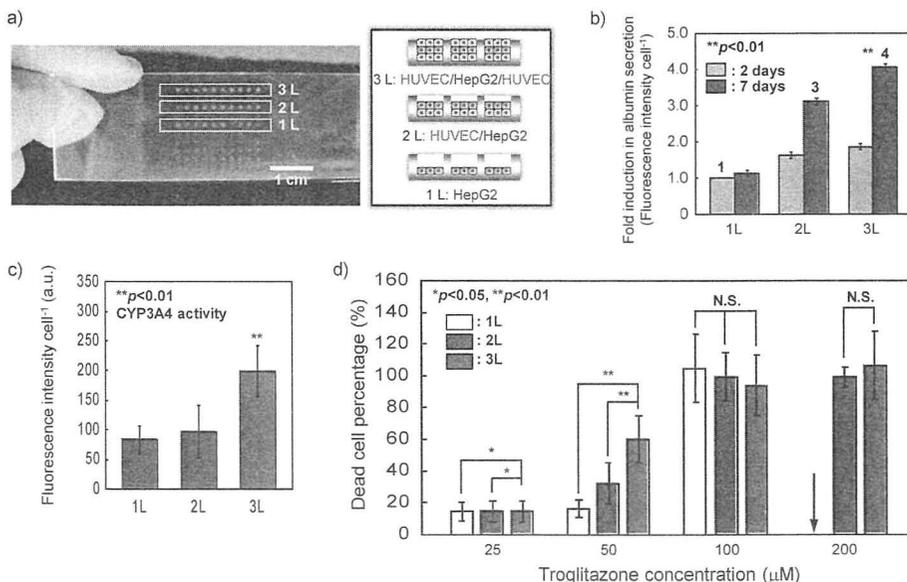


図6 a) ヒト肝癌細胞(HepG2)とヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)で作製した1~3層構造の肝組織チップの写真。b) アルブミン発現量と層構造の関係。抗アルブミン抗体で蛍光染色した各ウェルの蛍光強度で比較した。c) CYP3A4活性と層構造の関係。抗CYP3A4抗体での蛍光染色で発現量を評価し、vivid redを用いて活性を評価した。d) トログリタゾン濃度に依存した死細胞の割合と層構造の関係。LIVE/DEADアッセイにより死細胞を蛍光強度で評価した。矢印は死細胞が剥離して定量できなかったことを示す。

で毒性が発現して死細胞数が増加するため、肝組織モデルとしての機能がTGZで評価可能である。図6eに、TGZ濃度に対する1-3層構造の死細胞数変化のグラフを示した。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、特にTGZが50 $\mu$ 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、HUVECで挟んだ3層構造にすることでHepG2の薬物代謝活性が向上することが明らかとなった。これらの結果より、本インクジェットプリント法によって作製した組織チップにおいて、他細胞と共培養した三次元モデルが従来の単層モデルよりも薬剤評価モデルとして有用であることが示された。

## 6. おわりに

本稿では、細胞積層法および細胞集積法に基づく新しいヒト三次元生体組織モデルの構築と薬剤効果判定・毒性評価への応用について紹介した。本手法によって、皮膚や血管、リンパ管、肝組織、心筋組織など様々な臓器モデル、さらには臓器チップの開発が進められている。化粧品や薬剤の評価だけでなく、あらゆる動物実験を代替する新たな評価法が必要であることは自明であり、ヒトへの応用が目的であれば、ヒト組織・臓器モデルによって評価を行うことが世界的な流れとなっている。

[謝辞] 本研究の一部は、最先端・次世代研究開発支援プログラム(LR026)およびJST先端計測事業、日本学術振興会特別研究員奨励費により実施された。また、共同研究者の方々に心より御礼申し上げます。



- 1) S. Yamanaka *et al.*, *Cell*, **131**, 861 (2007)
- 2) D. E. Ingber *et al.*, *Science*, **328**, 1662 (2010)
- 3) M. P. Lutolf *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 47 (2005)
- 4) B. C. Isenberg *et al.*, *Materials Today*, **9**, 54 (2006)
- 5) K. Y. Lee *et al.*, *Chem. Rev.*, **101**, 1869 (2001)
- 6) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007)
- 7) M. Matsusaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 401 (2012)
- 8) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997)
- 9) M. Matsusaki *et al.*, *Adv. Mater.*, **24**, 454 (2012)
- 10) R. O. Hynes, "Fibronectins", Springer-Verlag Inc., New York (1990)
- 11) K. Kadowaki *et al.*, *Langmuir*, **26**, 5670 (2010)
- 12) K. Kadowaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153 (2010)
- 13) K. Kadowaki *et al.*, *Chem. Lett.*, **41**, 523 (2012)
- 14) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 7557 (2011)
- 15) H. Yoshida *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, **23**, 1736 (2013)
- 16) A. Nishiguchi *et al.*, *Adv. Mater.*, **23**, 3506 (2011)
- 17) T. Sasagawa *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 1646 (2010)
- 18) H. Sekine *et al.*, *Nat. Commun.*, **4**, 1399 (2013)
- 19) L. Yang *et al.*, *Cell Tissue Res.*, **326**, 69 (2006)
- 20) E. A. Roth *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 3707 (2004)
- 21) P. Calvert, *Science*, **318**, 208 (2007)
- 22) M. Matsusaki *et al.*, *Adv. Healthcare Mater.*, **2**, 534 (2013)
- 23) M. Smith, *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 679 (2003)