S021016

3次元組織化された血管様管状組織による循環培養システム

益田 泰輔^{*1}, 山岸 由佳^{*2}, 大脇 浩史^{*3}, 松崎 典弥^{*4}, 明石 満^{*4}, 新井 史人^{*1}

Circular Culture System by Three-Dimensional Multilayer Structured Tubular Tissues

Taisuke MASUDA^{*1}, Yuka YAMAGISHI^{*2}, Hirofumi OWAKI^{*3},
Michiya MATSUSAKI^{*4}, Mitsuru AKASHI^{*4} and Fumihito ARAI^{*1}^{*1, *2}Nagoya Univ. Dept. of Micro-Nano Systems Engineering
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603 Japan^{*3}Sony Corporation, 1-7-1 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-0075, Japan^{*4}Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 562-0871, Japan

A rapid construction process is necessary for building up numerous cell modules into three-dimensional (3D) tissues that retain the tissue geometries and initial conditions of the cells. We proposed a new 3D assembly technique using water transfer printing to fabricate a hollow tubular tissue structure. By utilizing this assembly technique, we discuss the relationship between the 3D transcriptional body of a gel matrix and the developed shape of transferred tissue, and then fabricate a hollow tubular tissue. In this work, we demonstrated that multilayered tissues could rapidly assemble into aligned tubular tissue in the appropriate geometrical conditions using engineering approaches. we succeeded in assembling 3D multilayered neonatal normal human dermal fibroblasts tissue into a tubular construct. This simple method is applicable to many different cell types and can be used to create customized, macro-scale, 3D tissue constructs with micro-scale control of cellular alignment. These results show that this method could be potentially useful for creating in vitro simulators for drug efficiency evaluation and operative training.

Key Words : Three-dimensional Assembly, Tissue Printing, Multilayered Tissue, Tubular Structure, Fibroblast

1. 緒言

心臓, 肺, 食道など生体内の組織には中空構造を持った組織が多くみられる. 中でも生体内の管状中空構造体として代表的な血管は, 酸素や栄養分, 老廃物を全身へ輸送させるための単なる仲介組織 (器官) ではなく, 血行不良や血管病変が循環器系疾患に直結する健康の指標になる組織である. その管壁や管径の大きさは様々であるが, 昨今の BioMEMS やマイクロ流体チップ⁽¹⁾を用いた研究の発展により, 毛細血管レベルのマイクロメートル径の血管新生は生体外環境で実現している⁽²⁾. しかしながら, ミリメートルを超える血管様管状組織を作製する技術は散見されない. ミリメートルを超え, 多層構造を有する血管様管状組織を構築するためには, 従来のようなビルドアップの組織構築法ではなく⁽³⁾, 新規の三次元アセンブリ技術が期待されている.

著者らは, 三次元的に細胞を積層化させる Layer-by-Layer (LBL) 細胞積層法によって作製された積層細胞を用いて, 新たに積層細胞転写法を提案してきた⁽⁴⁾. 本研究では, 積層細胞転写法を用いてミリメートルオーダーの血管様の管状組織を構築し, アセンブリした三次元組織の循環培養ならびに生物学的・力学的評価を行うためのプラットフォームについて検討したので報告する.

^{*1}正員, 名古屋大学大学院 工学研究科 (〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町)

^{*2}学生員, 名古屋大学大学院 工学研究科

^{*3}正員, ソニー株式会社

^{*4}非会員, 大阪大学大学院 工学研究科

E-mail: masuda@mech.nagoya-u.ac.jp

図 1. Design concepts of three-dimensional rapidly constructed tubular tissues on a curved substrate using water transfer printing

2. 材料および実験方法

2・1 血管様管状組織の構築

Layer-by-Layer (LBL) 細胞積層法にて細胞外マトリックスであるフィブロンectin-ゼラチンのナノ薄膜を表面に被覆した細胞は、薄膜を介した細胞間相互作用を顕在化し、多層構造を有する積層細胞を構築することができる⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾。この積層細胞を三次元曲面にアセンブリするために、積層細胞転写法を用いた。積層細胞転写法は、液面に浮かせた積層細胞に対して被転写体を液中から引き上げることによって（図 1）、三次元組織構造体をアセンブリする技術である。本研究で作製する三次元組織構造体はヒト大動脈を想定した管状組織とし、その管内直径は 3 mm とした。そのため展開形状となる積層細胞の短辺長さ L は以下で表せる。

$$L > 9.24 / \alpha \quad (\alpha : \text{shrinkage}) \quad (1)$$

$$\alpha = (1 - \text{Area Change}) \times 100 \quad (2)$$

図 2 に積層手順による積層細胞の収縮率の違いを示す。積層細胞は多孔質膜（セルカルチャーインサート）上で播種され、その後膜から剥離して積層細胞の転写に用いる。収縮率の結果、1 回に全ての細胞を播種し積層させるよりも、2 回に分割して細胞を積層させることで、剥離した積層細胞の収縮率の低下が確認された。これは播種直後における細胞-細胞間の接着性を緩和させたことが考えられる。以上のことを踏まえ、式(1)(2)より $L > 9.24 / 0.64 = 14.4$ 。本研究では 6 well のセルカルチャーインサート（直径 $d = 23.1\text{mm}$ ）を用いて 9 層（ 9.0×10^7 cells）の積層細胞を作成した。

細胞は正常ヒト皮膚線維芽細胞（Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts; NHDF）を用いた。NHDF の通常培養は、D-MEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium: Sigma）に牛胎児血清（FBS: Thermo Scientific 社）10%、ペニシリン・ストレプトマイシン（life technologies 社）1%を加えたものを培地として使用した。LBL 細胞積層法でナノ薄膜を被覆した NHDF は 6 well のインサートで 4 日間プレカルチャーされた後、積層細胞転写に用いられた。

また、積層細胞転写法によって形成した積層細胞を転写させる場合、被転写体には剛性が必要である。そこで、被転写体として、図 3(a)のように二重構造にしたガラス管を用いた。積層細胞転写法によって外側の 2 本のガラス管を連結させるように気液界面より積層細胞を引き上げた後、内側のガラス管を引き抜くことによって、管状組織を構築する。本研究で用いたガラス管の寸法は、内側のガラス管（ナリシゲ）は直径 1.5 mm、外側のガラス管（ナリシゲ）は外径 $d_o = 3\text{ mm}$ 、内径 $d_i = 1.8\text{ mm}$ である。

管状組織へアセンブリし、再び液中へと戻す際、構造が壊れてしまうのを防ぐため、コラーゲンゲル⁽⁸⁾で積層細胞を包埋した。この時、図 3(b)の治具を用いた。コラーゲン・ゲルで管状組織の全体を包埋できるように、固定治具の溝部分にあらかじめコラーゲン・ゲルを塗布してアセンブリした管状組織を置き、上下から同型の治具で挟み包埋した。溝部分は管状組織がずれることなく置けるよう、直径 3 mm の溝になっている。

2・2 循環培養プラットフォーム

人工的に作製された管状組織の機械的特性についての研究は少ない。だがしかし、三次元組織構造体が再生医療において三次元組織モデルとして用いられるためには、作成した管状組織を培養しながら評価することが必要である。前章で述べた水圧転写法を応用した積層細胞転写法を用いて作成した管状組織を、培養チャンバに移動させ、外部からポンプを接続し、循環培養する。ポンプシステムによりさらにせん断応力などの物理的刺激や、 O_2 や NO 、その他成長因子などの化学的刺激を印加しながら培養する。センサによって管状組織の変化を観察する。培養器の上部より構築した組織の蛍光観察が可能であり、循環培養しながらもアセンブリした組織の恒常的な観察及び評価が可能なシステムとなっている。

図 2. Photos of multilayered tissues and graphs of retrieving ratios

図 3. Double glass capillaries and assisting jig

3. 実験結果

3・1 血管様管状組織の構築

作成した $15\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ のサイズの積層細胞を気液界面に移し、自動ステージ (SIGMA 工機, SGSP20-85(Z)) を用いて 25 mm/sec の一定速度で被転写体を液面垂直方向に引き上げる。こうすることで、図 4 に示すように積層細胞を被転写体に転写した。

3・2 血管様管状組織の循環培養

積層細胞を被転写体である二重ガラス管へと転写した後に治具を用いて、コラーゲンゲルで包埋し、被転写体の内側のガラス管を引き抜く。これにより、直径 1.8 mm 、長さ 3 mm の管状組織を構築することができた。作成したサイズよりガラス管にかかっている組織長さは左右 6 mm ずつであった。

図 5(a) に作製した管状組織を共焦点顕微鏡で観察した様子を示す。共焦点顕微鏡観察によって、構築した組織が円環断面を有しており、さらに中空、多層構造であることを確認した。断面図から管状組織の厚みは約 $50\text{ }\mu\text{m}$ であった。また、作製した管状組織構造体内に蛍光粒子を含んだ溶液を循環させた。図 5(b) にその様子を示す。管状組織構造体に繋がるガラス管接続したペリスタポンプ (ISMATEC, IPC4) を用いて $20\text{ }\mu\text{L/min}$ にて送液したところ、管状組織構造体を介して溶液を循環させることができ、共焦点顕微鏡 (池田理化, MVX-CSU) 撮影によって粒子の流れを可視化することで観察できた。

図 4 Transcribed multilayered tissue

図 5(a) Fluorescent images of transcribed tubular tissue, (b) a perfusion experiment of the tubular tissue (blue) with fluorescent beads (green)

4. 考察

血管，なかでも動脈は，その力学的特性が循環系に大きな影響を与えることが知られている．従来，様々な部位や病態における力学的特性が様々な方法で調べられてきた．一方，血管は血流や血圧の変化に応じて能動的に自らの形態や力学特性を変化させる力学的適応現象を示すため，そのメカニズムを解る研究も少なからず行われてきた．そして円周方向応力や壁せん断応力が血管の形態と力学特性の維持に密接に関連していることが明らかとなってきた⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾．そこで，力学的適応メカニズムを詳細に明らかにするために，血管内の細胞レベルにおける力学環境を明らかにすることが重要である．しかしながら，血管の力学特性を評価するにあたり，血管組織の生理的環境を保って評価する計測システムは見当たらない．そこで，本研究ではミリメートルを超え，血管同様の多層構造を有する管状組織を構築した．さらには作成した管状組織を搭載でき，生体内同様の血流循環を再現しうる循環培養プラットフォームを提案した．

プラットフォームのための管状組織は，転写の際，二重構造にしたガラス管を用いることによって，ガラス管の剛性によって安定した積層細胞の転写が行え，さらに組織とポンプシステムとの接続が容易になり，管状組織内での迅速な液流が可能になった．

ポンプシステムにより管状組織内を循環させることによって生体内の流れを再現し，管空構造が図6のような培養チャンバ内において長期維持されることを確認した．

また，積層細胞を作成する際，異種細胞により作成する，あるいは血管内皮細胞を導入し，毛細血管網をも有した多層構造の積層細胞が作成できると考えられる．さらに，細胞播種時，懸濁液中にコラーゲンを投与することにより，厚みのある積層細胞が得られる⁽¹⁰⁾と考える．

今後は，血管様管状組織を構築した後に，長期培養や循環培養による管内へのせん断力などの物理的刺激を加えることによって，積層細胞によって構築された血管様管状組織及びその接合面における細胞挙動の様子の観察を行うことを考えている．また，当該循環培養システムに圧力センサや酸素センサを導入し，三次元アセンブリした組織の力学的・生物学的特性を測定することにより，組織工学や循環器系疾患に関する研究に貢献できると考えている．

図 6 Circulation culture at the culturing chamber

5. 結言

本稿では，ミリスケールの大きさでかつ細胞密度の高い三次元組織を構築する手法として，従来のボトムアップの技術に代わり

①細胞外マトリクス成分のフィブロネクチン-ゼラチンによるナノ薄膜の形成によって三次元的に細胞を積層化させる Layer-by-Layer (LBL) 細胞積層法

②気液界面に浮かべた積層細胞に対して液体中から被転写体を引き上げ，その表面に転写させることによって三次元組織構造体を構築する積層細胞転写法

を組み合わせた方法を新たに提案した．そして，I字型の被転写体へ積層細胞を転写し，高密度の正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (NHDF) から成る血管様管状組織を構築することに成功した．

また，構築した血管様管状組織を循環培養・評価するためのシステムを構築し，外部のポンプによって構築した管状組織の内部を循環培養することができた．

文 献

- (1) Y. Shin, S. Han, J. S. Jeon, K. Yamamoto, I. K. Zervantonakis, R. Sudo, R. D. Kamm, and S. Chung, "Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels," *Nature Protocols*, vol. 7, pp. 1247–1259, 2012.
- (2) M. W. Laschke, Y. Harder, M. Amon, I. Martin, J. Farhadi, A. Ring, N. Torio-Padron, R. Schramm, M. Rücker, D. Junker, J. M. Häufel, C. Carvalho, M. Heberer, G. Germann, B. Vollmar, and M. D. Menger, "Angiogenesis in Tissue Engineering: Breathing Life into Constructed Tissue Substitutes," *Tissue Engineering*, vol. 12, no. 8, pp. 2093-2104, 2006.
- (3) L. G. Griffith, and G. Naughton, "Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities," *Science*, vol. 295, no. 5557, pp. 1009-1014, 2002.
- (4) Y. Yamagishi, T. Masuda, N. Takei, H. Owaki, M. Matsusaki, M. Akashi, and F. Arai, "Three-Dimensional Assembly of Multilayered Tissues", *Procedia CIRP*, vol. 5, pp. 201-204, 2013.
- (5) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, and M. Akashi, "Fabrication of cellular multilayers with nanometer-sized extracellular matrix films," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, pp. 4689-4692, 2007.
- (6) A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki, and M. Akashi, "Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique," *Advanced Materials*, vol. 23, pp. 3506-3510, 2011.
- (7) K. Kadowaki, M. Matsusaki, and M. Akashi, "Three-dimensional constructs induce high cellular activity: structural stability and the specific production of proteins and cytokines," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 402, pp. 153-157, 2010.
- (8) 榎並 淳平, 肥塚 正博, 羽多 正隆, 川村 和男, 橘 陽一, 草間 良恵, 古閑 睦好, "コラーゲン・ゲル培養法(Ⅰ,Ⅱ) 組織培養," vol. 13, no. 1, pp. 26-30, no. 2, pp. 64-68, 1987.
- (9) W. Zheng, B. Jiang, D. Wang, W. Zhang, Z. Wang, X. A. Jiang, "microfluidic flow-stretch chip for investigating blood vessel biomechanics," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 18, pp. 3441-3450, 2012.
- (10) M. S. Sakar, D. Neal, T. Boudou, M. A. Borochin, Y. Li, R. Weiss, R. D. Kamm, C. S. Chen, and H. H. Asada, "Formation and optogenetic control of engineered 3D skeletal muscle bioactuators," *Lab on a Chip*, vol. 23, pp. 4976-4985, 2012.