

ヒト細胞・組織のための微小培養場の開発



技術解説

田谷正仁*, 境慎司**

Development of micro-residences for
culturing human cells and tissuesKey Words : tissue engineering, design of culture space,
human cells

1. はじめに

体内の組織や臓器の機能疾患に対し、薬剤の投与や人工素材の代替による対処療法的な治療に代わり、細胞のもつ増殖能、分化能、組織形成能、生理活性物質の分泌能などを利用し、疾患部位の再生による機能回復を図る再生医療が注目されている。特に、ES細胞やiPS細胞の登場により、再生医療およびその関連分野は、日本の次世代産業の一翼を担うものとして大きな期待が寄せられている。再生医療が従来の医療と最も異なる点は、従来のほとんどの医療が人工材料や生物産生物質に依存しているのに対し、再生医療では、体外で増殖させた細胞を移植する、すなわち、細胞・組織のもつ再生能力や物質分泌能力を利用して生体機能の回復を目指す点にある。再生医療では、我々の生体に本来備わっている組織・臓器の機能回復に基づいた根本治療によって、患者のQOL (quality of life) の向上が期待できる。

再生医療および関連医療分野に適用可能な細胞・組織の生産という観点から、筆者らの研究室では、(1) 細胞と直接接する場である培養面、培養空間の開発、(2) バイオリアクターとその操作法の開発、(3) 細胞機能制御を伴う培養プロセス開発、などに関する課題に取り組んできた。本稿では、細胞・組織の機能発現の場としての培養面、培養空間の開発について、著者らの研究を中心に紹介する。

2. グルコース提示型デンドリマー面の開発

培養面の修飾による細胞機能の発現と制御という視点から、グルコース提示型デンドリマー培養面を開発してきた(図1)¹⁻⁵⁾。培養面上に提示されたグルコースと細胞表層のグルコーストランスポーター(GLUT)との親和性に基づいて、細胞接着、細胞形態さらには細胞の分化/未分化状態の制御も可能である^{6,7)}。

多分化能を有するヒト間葉系幹細胞(hMSC)では、グルコース提示密度を変数とすることで、細胞の足場形成および骨格形成に伴う形態変化が誘引され、これにより、心筋細胞への分化を誘導する可能性があることが示された^{8,9)}。デンドリマー合成においてその世代数を変化させ、その末端にリガンドとしてグルコースを結合させることで、細胞が接触するグルコース密度を変化させることが可能である(図2)。

グルコース提示型デンドリマー面およびデンドリマーを提示しないポリスチレン面(PS面)上で、hMSCの培養を行ったところ、リガンドとしてのグルコース密度が増加するにつれて、ストレスファイバーの形成が阻害され丸い形態の細胞の頻度が増えるとともに、培養が進むにつれて球状の細胞集塊を形成することが分かった。蛍光染色法による分化指標マーカーの解析から、通常のPS面上で培養した

*Masahito TAYA



1953年5月生
名古屋大学大学院農学研究科食品工業化学専攻修了(1981年)
現在、大阪大学 基礎工学研究科 物質創成専攻 化学工学領域 教授 農学博士 生物化学工学
TEL: 06-6850-6251
FAX: 06-6850-6254
E-mail: taya@cheng.es.osaka-u.ac.jp

**Shinji SAKAI



1975年4月生
九州大学工学府物質プロセス専攻修了(2002年)
現在、大阪大学 基礎工学研究科 物質創成専攻 化学工学領域 准教授 博士(工学) 生物化学工学
TEL: 06-6850-6252
FAX: 06-6850-6254
E-mail: sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

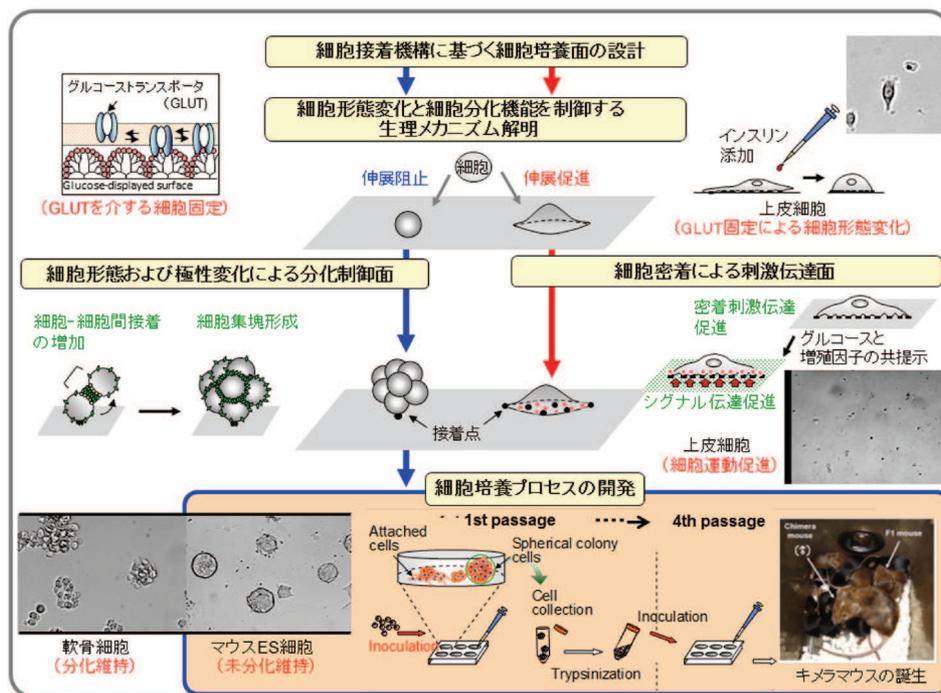


図1. グルコース提示型デンドリマー面の設計と細胞・組織培養への適用

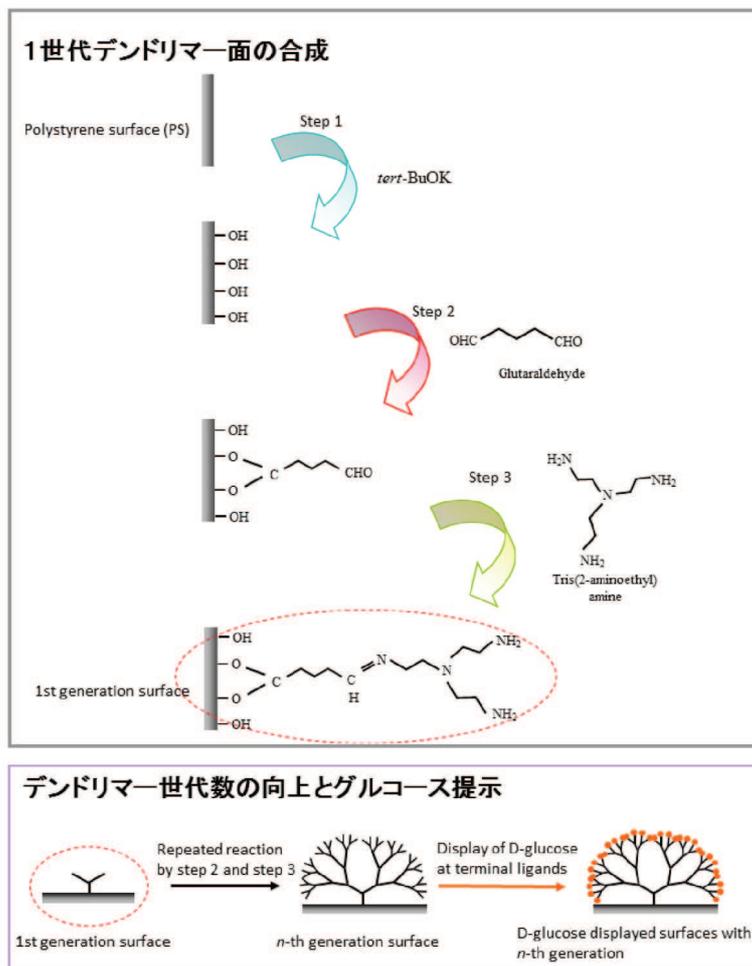


図2. グルコース提示型デンドリマー培養面の作製手順

場合には、hMSC 表面マーカーが陽性であるのに対し、筋系細胞マーカーについては陰性であることが確認された。一方、グルコース提示型デンドリマー面上で培養した細胞は全て筋系細胞に特異的な desmin 陽性であることが確認された。これらグルコース提示型デンドリマー面上での細胞集塊を筋系細胞（骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞）マーカーについて、蛍光染色法により観察したところ（図3）、グルコース提示密度の高い面では部分的ではあるが骨格筋細胞に特異的な fast skeletal myosin heavy chain が陽性であることが示された。さらに、細胞集塊内では、心筋細胞に特異的なマーカー cardiac troponin T 陽性の細胞が存在していることが示され、開発した培養面は、hMSC から筋系細胞への分化に有効な内在性シグナリングを誘発する環境を提供できることが示された。

3. ヒドロゲルを基材とする培養場の開発

3.1 中空マイクロカプセル

動物細胞の培養は広く二次元平板上で行われている。しかし、生体内で三次元的に相互作用しながら存在している細胞の環境とは異なることから、二次元平板上で培養された細胞においては、細胞自身の

有する組織形成能力が低かったり、各種遺伝子発現挙動が生体内の細胞と大きく異なったりすることが知られている。例えば、平板上で培養された株化ガン細胞と三次元的に培養された株化ガン細胞では抗ガン剤に対する薬剤感受性が異なり、後者の方がより高い耐性を有することが報告されている¹⁰⁾。“スフェロイド”と呼ばれる多数の細胞により構成される球状の組織体は、細胞を三次元的に培養して得られる組織体として多くの検討が行われてきた。このスフェロイドを形成させる方法としては、細胞が接着しにくい培養面を使用する方法や、スポンジのような多孔体を使用する方法、培養皿のフタに細胞分散液を付着させてできる液滴中で培養する方法（ハンギングドロップ法）などがある。上記のグルコース提示型デンドリマー面でも、ヒト間葉系幹細胞がスフェロイド様の細胞集塊を形成することが観察されたが、細胞に対しより積極的に三次元空間を提供する場として、著者らは“中空マイクロカプセル”を用いたスフェロイドの作製を行っている。

動物細胞を直径が1 mm 以下の球状の空間に包括する動物細胞包括マイクロカプセルは、1980 年代より非自己の細胞や組織を免疫抑制剤の非投与下で移植するためのデバイスなどとして研究が続けられ

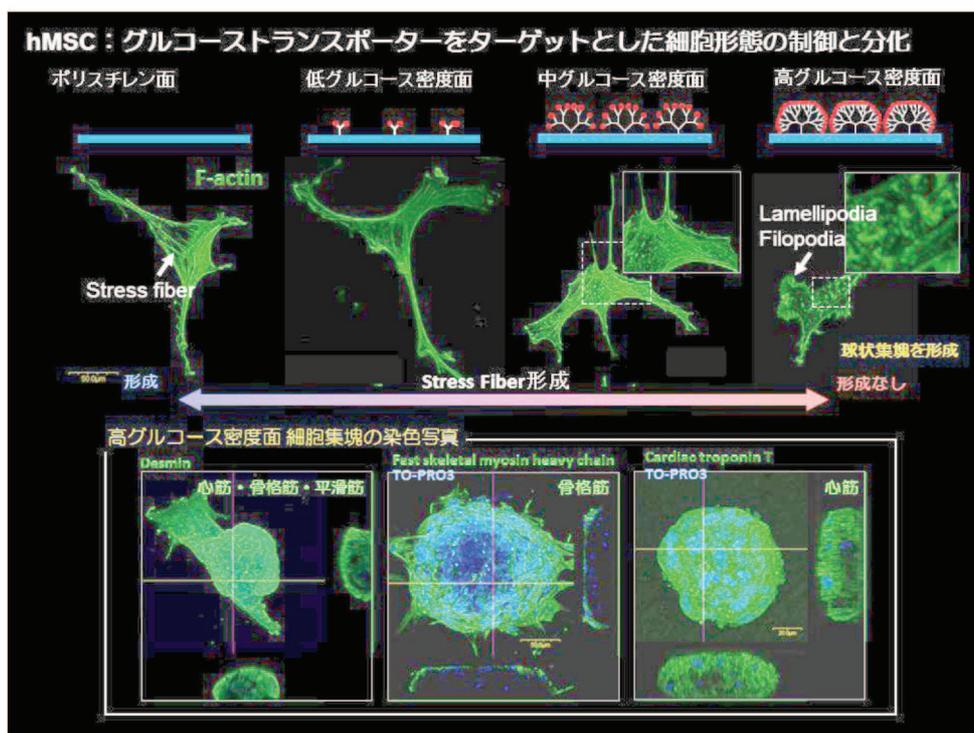


図3. グルコース提示型デンドリマー面上で培養されたヒト間葉系幹細胞の形態変化と分化

てきた¹¹⁾。このデバイスでは、酸素や栄養分、細胞の代謝老廃物を良好に透過する半透膜がカプセル壁材として使用される(図4)。このため、包括された細胞は長期間生存し続けることができる。このデバイスを用いれば、カプセル内の微小空間において細胞をマトリックスと接触させながら三次元的に成長・増殖させることが可能である。さらに、カプセルサイズを微小化することによって細胞が数個入る程度のサイズの閉鎖空間で細胞を培養可能であるなど、他の培養方法では実現が難しい培養場を構築することも可能となる。著者らが開発した中空マイクロカプセルは、直径が数十マイクロメートルから数百マイクロメートルの球形の中空部分で細胞を増殖させ、スフェロイドが形成した後は必要なタイミングで細胞の生存を維持したままカプセルから回収し、各種分析やさらに大きな組織体の作製などへの利用を可能とするものである。

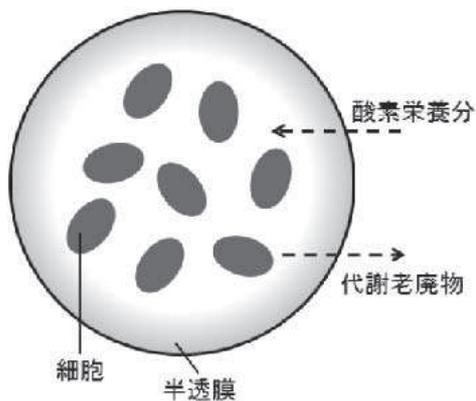


図4. 細胞包括マイクロカプセル模式図

図5にこの中空カプセルを利用したスフェロイド作製法の概要を示す。まず、対象とする細胞を内包する形で、中空構造の鋳型となるゲルビーズを作製する(手順1)。つづいて、このゲルビーズを手順1

で使用したゲル材料と異なる材料からなるゲルビーズに包埋する(手順2)。手順1のゲルビーズを細胞に損傷を与えない方法で分解・溶解可能な材料で作製しておけば、内部のゲルビーズが占有していた部分を中空部分とするマイクロカプセルを得ることができる(手順3)。その後、培養溶液中にて培養を行うことで、中空部分でスフェロイドが形成する(手順4)。最後に、カプセル皮膜を細胞の生存に影響を与えない方法で分解することにより、スフェロイドのみを回収することができる(手順5)。この方法のカギとなるのは、細胞に致命的なダメージを与えずに分解・溶解可能な材料としてどのような材料を使用するのかということである。著者らはこれまでに、手順1のゲルビーズ材料としてはセルラーゼによって分解可能なカルボキシメチルセルロース誘導体のゲルや動物細胞の培養に通常適用される温度37℃で溶解するゼラチンゲルが有用であることを報告している^{12,13)}。また、手順5で分解されるカプセル皮膜材料としては、キレート剤によって溶解可能なアルギン酸カルシウムゲルやアルギン酸リアーゼにより酵素分解可能なアルギン酸誘導体ゲルなどを用いている^{12,13)}。スフェロイドのサイズ制御のためには、中空空間の鋳型となる手順1で作製するゲルビーズのサイズ制御が重要となるが、その詳細に関しては既報の論文¹⁴⁾を参照されたい。

上述の方法により作製した中空部分の直径を約200 μmとする中空マイクロカプセルを用いてヒトの子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞を培養したところ、形成するスフェロイド内の細胞が抗ガン剤に対して高い耐性を有することと、それを導いたと考えられる多剤耐性遺伝子 MDR1 の発現上昇を確認している¹⁵⁾。他のスフェロイド作製法と比較してこの中空マイクロカプセルを使う利点は、一度に大量のスフェロイド(数万~数十万個)を作製可能である点

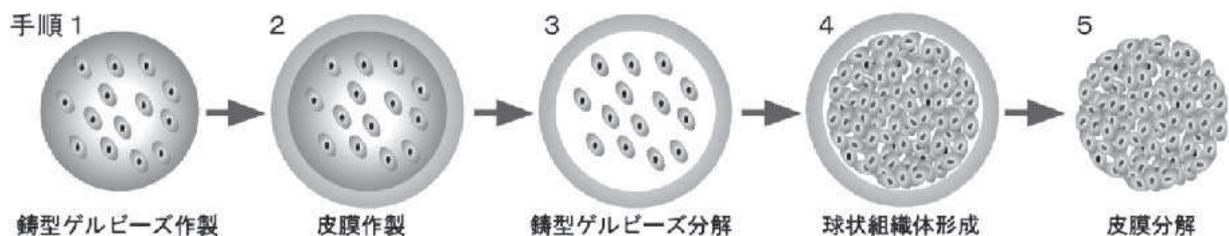


図5. 中空マイクロカプセルを利用したスフェロイド作製手順

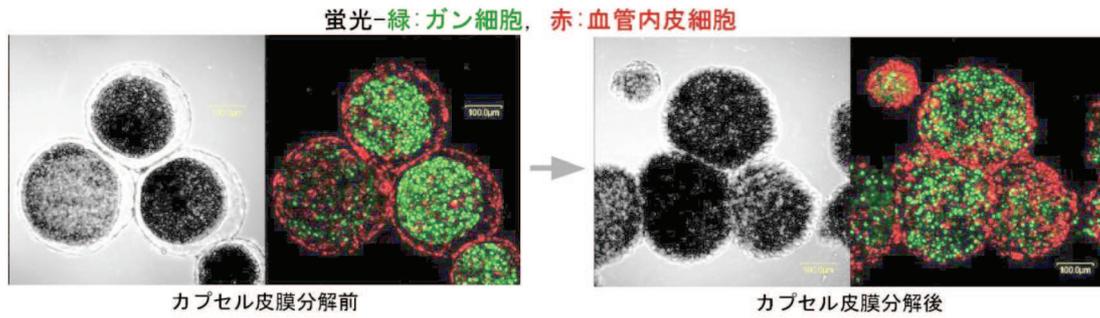


図6. アルギン酸誘導体カプセル内でHeLa細胞(緑)スフェロイドを形成させた後、血管内皮細胞(赤)でカプセル表面を覆い、その後アルギン酸リアーゼでカプセル皮膜を分解した際の形態

や、通常の動物細胞を保存する際と全く同じ手順で、作製したカプセルを液体窒素中で保存しておく必要なときに解凍して使用可能である点が挙げられ、薬剤開発時のスクリーニング等への利用が期待される。また、別の検討例として、カプセル皮膜ゲルに細胞接着性を付与しておくことにより、包括された細胞の増殖を促進させたり、内部でスフェロイドを形成させた後にカプセル皮膜ゲル上に他の細胞層を形成させ、その後カプセル皮膜を分解することで血管内皮細胞層で覆われたガン細胞スフェロイド組織なども作製可能であることを見出している(図6)¹⁶⁾。この血管内皮細胞を表面に配置する組織においては、ガン細胞種や培養条件によって内皮細胞がガン細胞スフェロイド中へ遊走していく挙動が異なることを確認しており、血管を引き込みながら増大していくガン腫瘍組織に関する研究において有用な評価モデルとして利用可能であると考えている。

3. 2 中空ゲルファイバーの開発

中空マイクロカプセルを用いると球状組織体を作製することが可能であることは前述したが、著者らは中空構造を有するゲルファイバーを作製し、血管様の管状組織体やひも状の組織体を作製することにも成功している¹⁷⁾。

中空マイクロカプセルの作製においては、まず中空構造の鋳型となるゲルビーズを作製したが、中空ゲルファイバーの作製ではそのような鋳型は使用せず、過酸化水素を分解するカタラーゼと過酸化水素を消費してフェノール性水酸基同士を架橋する西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)の2つの酵素反応を利用する(図7)。まず、フェノール性水酸基を導入したアルギン酸誘導体の水溶液にHRPとカタラーゼを溶解させ細胞を分散する。この溶液を

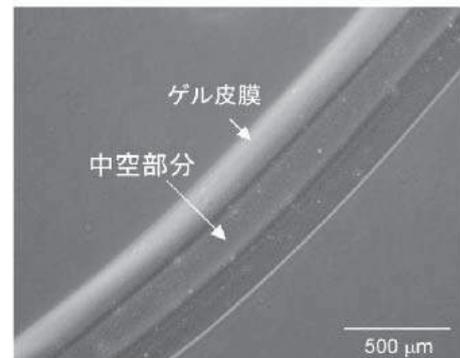
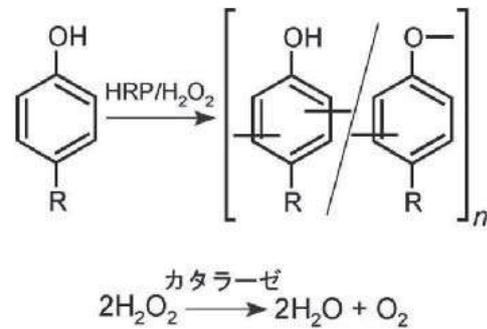


図7. 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)およびカタラーゼの酵素反応およびこれらの反応を経て作製された中空ゲルファイバー

注射針から微量の過酸化水素を含む水溶液に押し出すと、過酸化水素がアルギン酸誘導体溶液中に拡散をはじめ、この過酸化水素を消費してアルギン酸誘導体水溶液のゲル化反応が進行すると同時にカタラーゼによる過酸化水素の分解が生じる。アルギン酸誘導体溶液の表面ほど過酸化水素濃度が高いため表面近くではゲル化が生じるが、表面からある程度の距離があるところではHRPの反応が進行するのに十分な過酸化水素が存在せず、溶液状態のまま残存する。結果として内部が溶液状態の中空ゲルファイバーが生じることになる(図7)。ゲル化しな

かった部分に存在する細胞は増殖し、中空部分の形状に規定されたひも状の組織体を形成する。その後、ゲル皮膜部分を分解することで組織体を回収することができ、分解前にゲル皮膜表面を別の細胞層で覆っておけば、外表面に他の細胞層を配置した組織体を作製することも可能である。さらに、ゲル皮膜材料として細胞が良好に接着する材料を使用すれば、中空ゲルファイバーの内壁表面で細胞を増殖させた血管様の構造体を作製することも可能である。

現在、中空マイクロカプセルを用いて作製される球状組織体と中空ゲルファイバーを用いて作製される血管様組織体を複合化することで、生体組織と同じように血管網を有する組織体の構築を試みている。

4. おわりに

再生医療や関連医療分野における細胞・組織培養の重要な課題は、*in vivo*で機能する環境を、*in vitro*において適切な「場」として再現することである。そのためには、組織再生に関する生化学、分子・細胞生物学などの知見に加え、微視的あるいは巨視的な観点からの培養場、培養空間の設計や細胞制御を伴う培養プロセスの開発、さらには、生産された細胞・組織に対する機能や品質評価など、工学的基盤

に基づく技術開発が今後ますます重要になるものと考えられる。

参考文献

1. Kim M-H *et al*, J Biosci Bioeng, 103, 192 (2007)
2. Kim M-H *et al*, J Biosci Bioeng, 104, 428 (2007)
3. Kim M-H *et al*, J Biosci Bioeng, 105, 319 (2008)
4. Kim M-H *et al*, J Biosci Bioeng, 107, 196 (2009)
5. Kim M-H *et al*, Biotechnol Adv, 28, 7 (2010)
6. Mashayekhan S *et al*, Biomaterials, 29, 4236 (2008)
7. Mashayekhan S *et al*, Polymers, 3, 2078, (2011)
8. Kim M-H *et al*, J Biosci Bioeng, 109, 55 (2010)
9. Kim M-H *et al*, Biomaterials, 31, 7666 (2010)
10. Friedrich J *et al*, Int J Radiat Biol, 83, 849 (2007)
11. Lim F and Sun AM, Science, 210, 908 (1980)
12. Sakai S *et al*, Biomaterials, 30, 5937 (2009)
13. Sakai S *et al*, Acta Biomater, 6, 3132 (2010)
14. Sakai *et al*, Biomaterials, 26, 4786 (2005)
15. Sakai *et al*, Cancer Sci, 103, 549 (2012)
16. Sakai *et al*, Biomaterials, 33, 6721 (2012)
17. Sakai *et al*, Biofabrication, 5, 015012 (8pp) (2013)

