

化学的細胞操作による生体組織モデルの構築



技術解説

松崎 典弥*, 明石 満

Construction of Tissue Models by Cell Accumulation Technique

Key Words : Nanofilms, Cell surfaces, Tissue engineering,
Pharmaceutical application

はじめに

生体内の臓器や組織の機能発現、また、個々の組織を構成する細胞の活動、さらに、細胞周辺の細胞外マトリックス (ECM) でおこる現象のほとんどは、「化学」に基づいている。細胞が生存し、機能を発現するその原理は、複合的かつ連続的な化学反応および相互作用であると考えられる。たとえば、細胞のシグナル伝達機構の多くは、まず、細胞膜上の受容体 (レセプター) に細胞外のシグナル分子 (ホルモンやサイトカインなど) が相互作用することで引き起こされ、受容体の構造変化に伴い細胞内のシグナル分子 (セカンドメッセンジャー) が誘導され、連続的なシグナルの受け渡しをしながら他の経路とも影響し合い、最終的には核内の転写因子による特定遺伝子の転写調節が起こる。受容体は「タンパク質」、シグナル分子の多くは「低分子のペプチドまたはタンパク質」であり、大まかに高分子であると考えられ、受容体とシグナル分子の相互作用は、高分子間相互作用に特徴的な立体構造変化を伴うダイナミックな相互作用であり、また、静電相互作用や水素結合、疎水性相互作用など、いくつかの相互作用が複合的に用いられることで強い結合 (高い結合定数) を実現している。たとえば、一般的な抗体-抗原の解離定数 (K_d : 結合定数 K_a の逆数) は、 $10 \sim 100 \text{ pM}$ ($10^{-10} \sim 10^{-11} \text{ M}$) と、低分子では実現できな

い極めて高い値であることは周知の通りである。従って、タンパク質間の相互作用を良く理解して細胞の現象を考えることは、いかにして細胞を自在に操作するか、という命題に深くかかわっている。つまり、タンパク質の自己組織化による ECM の形成、細胞と細胞の接着、細胞と ECM の相互作用、これらが秩序良く集合して初めて形成される組織体 (構成単位)、組織体がマクロに集合して形成された個々の臓器、と各サイズレベルで生体の現象を化学的に理解し、化学の視点から細胞を操作する「化学的細胞操作」技術を確立しなければならない (図 1)。従来の生物学的な視点からの細胞操作だけでは限界があることは、歴史的に見ても周知の通りである。組織工学を取って考えてみても、90 年代当初に概念が提唱されて以来、未だに生体の複雑かつ高性能な機能を再現した人工組織体の構築には至っていない。生体成分の多くは基本的に高分子 (タンパク質や遺伝子、脂質など) である、という根底に立ち返り、化学の視点からアプローチすることが今後重要になるであろう。

生体組織モデルの重要性

医療・創薬研究において、動物愛護や 3R (Replacement (代替)、Reduction (削減)、Refinement (改善)) の観点から実験動物代替法が盛んに研究されている。期待されているのが、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)¹⁾ から分化誘導して得られる様々な正常および疾患細胞である。特に、患者由来 iPS 細胞から分化誘導した疾患細胞は、ヒトと動物の種差の課題を解決し、候補化合物の薬効や毒性を評価できると期待されている。しかし、生体組織は複数種類の細胞で構成され、種々の細胞が相互作用することで組織としての機能を発現しているため、細胞単体で生体組織と同じ薬剤応答を得ることは困難であ



* Michiya MATSUSAKI

1976年6月生
鹿兒島大学大学院 理工学研究科 物質
生産工学専攻博士後期課程 (2003年)
現在、大阪大学大学院 工学研究科 応
用化学専攻 准教授 博士 (工学)
TEL : 06-6879-7357
FAX : 06-6879-7359
E-mail : m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

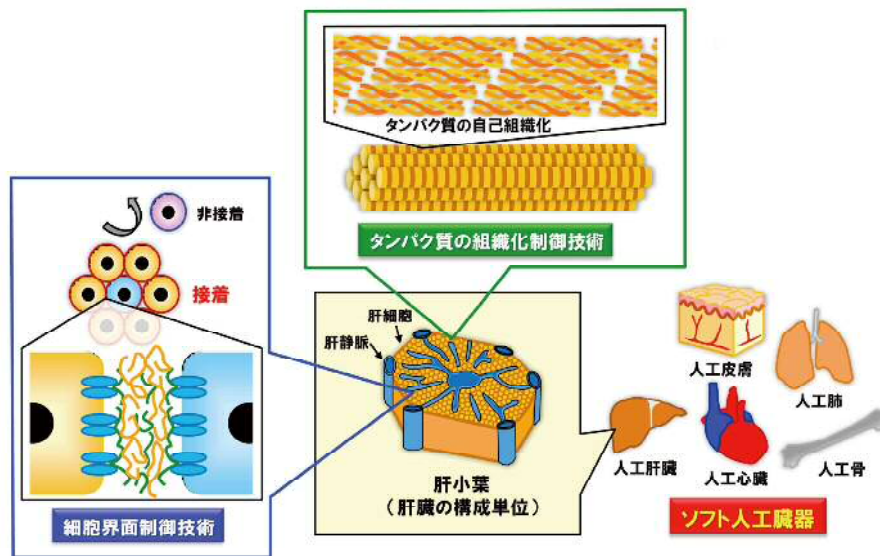


図1 人工臓器を作製に必要な化学的細胞操作。

る。例えば、肝細胞の重要な機能の一つであるアルブミンの産生量は、細胞単体と比較して三次元組織体では10倍以上増加することが報告されている²⁾。そこで、生体組織を構成する様々な細胞とタンパク質を三次元で統合し、生体組織類似の機能を有する三次元組織を構築できれば、生体組織に近い薬効・毒性応答が得られると期待される。

三次元組織構築に関する国際競争は既に激化しているのが現状である。米国では、国防高等研究計画局 (DARPA) と国立衛生研究所 (NIH) の巨額の研究費が投じられ、「Organ on a chip」という、動物実験に代わるヒト細胞のチップを用いた医薬品評価を実現するプロジェクトが進行している³⁾。欧州連合 (EU) では、第7次フレームワークプログラム (FP7) にて「The Body-on-a-chip」プロジェクトが開始されている。iPS細胞で優位に立った日本

がそのリードを維持して激しい国際競争に勝つためには、普遍性の高い三次元組織構築技術の確立が急務である。つまり、医療・創薬・化粧品分野における次の大きな課題は、“いかにして三次元組織を生体外で構築するか”であると言っても過言ではない。生体組織・臓器の代替物として医療・創薬分野に有用な三次元組織の工業的な安定生産・供給が可能となれば、国際競争力に優れた普遍性の高い日本の新しい産業となることが期待される⁴⁾。

組織構築の二つのアプローチ

組織構築研究で主に用いられる手法は、トップダウン法とボトムアップ法に分けることができ (図2)、歴史的にトップダウン法がまず報告された。生分解性高分子、例えばポリ乳酸やポリグリコール酸、コラーゲンやアルギン酸を用いてハイドロゲルや多孔

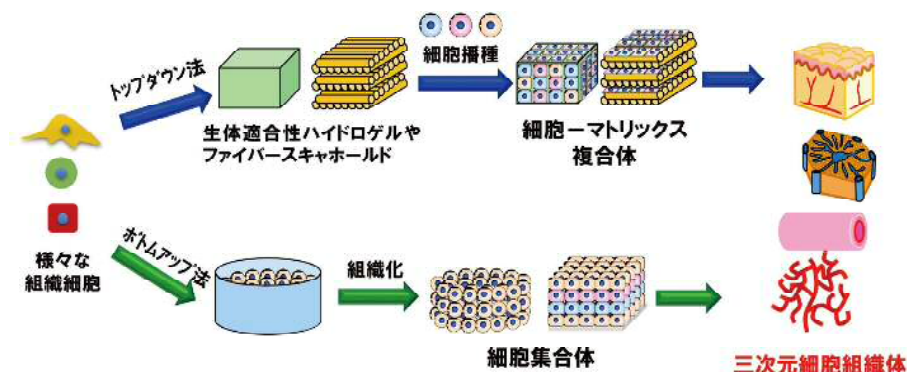


図2 組織構築におけるトップダウン法 (上) およびボトムアップ法のイメージ (下)。

性スポンジ、不織布の足場材料を作製し、細胞を播種して三次元培養が行われた⁵⁾。足場材料の中で培養された細胞は、プラスチック培養皿の上で培養された時とは明らかに異なる性質を示したが、足場材料内部での多種類の細胞の配置を制御し、生体組織類似の組織体を構築するには至っていない。また、コラーゲンなどの動物由来の足場材料の使用や、加水分解に伴う局所 pH の低下が引き起こす炎症惹起性などの課題も明らかとなってきた。

ボトムアップ法としては、感熱応答性高分子の膨潤・収縮特性を利用して細胞をシート状に剥離する細胞シート法⁶⁾や、磁性粒子を与えた細胞を用いて磁力で細胞を組織化させる方法⁷⁾などが報告されてきた。ボトムアップ法は、トップダウン法と比較して細胞の配置を緻密に制御できる特徴を有しているが、ミリメートルからセンチメートルサイズの大きな組織体を構築するためには大量の細胞が必要であり、さらに、細胞密度が高いため内部細胞の壊死を防ぐための毛細血管構造の構築が必須となる。本項では、我々の組織構築法「細胞積層法」およびその改良法である「細胞集積法」を紹介する。

細胞積層法

細胞は、外部との情報交換や機能発現を細胞膜界面で制御している。生体内において、細胞の界面構造と機能の制御に重要な役割を果たしているのが、細胞周辺に存在する ECM タンパク質である。例えば、細胞接着とは細胞膜のインテグリン分子と ECM との相互作用であり、また、ECM 成分であるフィブロネクチンやビトロネクチンと細胞膜分子の相互作用が細胞の生存や増殖、シグナル伝達、分化誘導に強く影響することが明らかにされている。そこで、我々はこの ECM の働きに着目し、ECM のように細胞の界面構造を制御できれば細胞の組織化や機能を操作できると考え、細胞の表面を ECM 成分のナノ薄膜でコーティングし、細胞を一層ずつ積層する「細胞積層法」を考案した (図3)⁸⁾。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、細胞を一層ずつ積み上げる手法である。細胞表面へ ECM 薄膜を形成する手法として、我々は、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」を用いた (図3)。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) の交互積層薄膜 (FN-

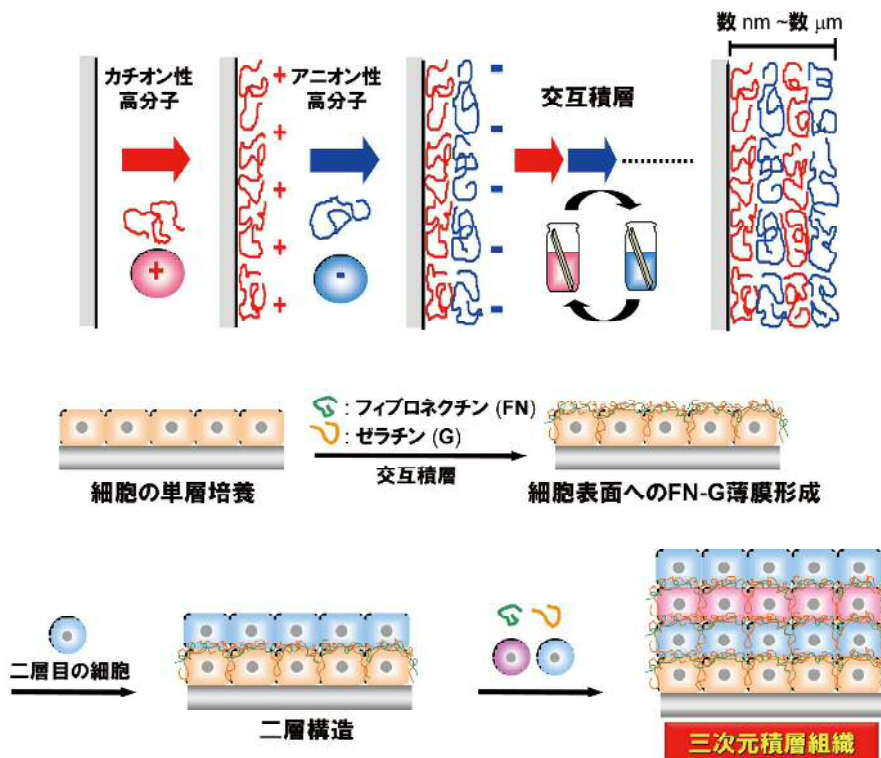


図3 交互積層法のイメージ (上) および細胞積層法のイメージ (下)。

G 薄膜) をおよそ 6 nm の膜厚で細胞表面に形成すると、二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、対照実験として薄膜を形成しない場合や膜厚が薄い場合、均一な二層構造は得られなかった。また、10 nm 以上の薄膜でも同様の効果が確認されたため、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。本手法を繰り返すことで、望みの細胞を望みの層に配置した三次元構造が構築可能となった。我々はこれまで、血管内皮細胞と平滑筋細胞を組み合わせた“血管壁モデル”^{9,10)} や、筋芽細胞による“骨格筋モデル” (図 4)¹¹⁾、がん細胞と線維芽細胞による“腫瘍モデル”¹²⁾ などを構築しており、生体組織により近い応答が得られることも明らかとなった。

細胞集積法

以上のように、細胞積層法は細胞の配置を一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り、1日二層の作製が限度であった。例えば、十層の構造を作製するためには約5日必要である。より短期間で積層構造を構築できれば、幅

広い応用展開が期待される。そこで、単一細胞表面に FN-G 薄膜を形成することで、短時間で三次元組織体を構築できる「細胞集積法」を新たに考案した (図 5a, b)¹³⁾。各細胞が FN-G 薄膜を介して三次元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た。多孔質膜を介して下部から培地を供給できるセルカルチャーインサートを用いて実験を行った。約 6 nm の 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、およそ八層の三次元組織体が確認された。一方、FN-G 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。これは、FN-G 薄膜が三次元的な細胞接着に機能したことを示している。インサートへの播種細胞数を制御することで得られる層数は制御可能であった。さらに、培地の量を増やすことで、細胞の種類に依存せず最大およそ 100 ~ 200 μm の組織体が得られた。生体内には、およそ 100 ~ 200 μm に一本の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 μm 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。そこで、我々は、細胞集積法を用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) や皮膚微小リンパ管内皮細胞 (LEC) のサンドイッチ培養を行うことで、毛細血管だけでなくリンパ管の構築を検討した (図 5c)。その結果、毛細血管およびリン

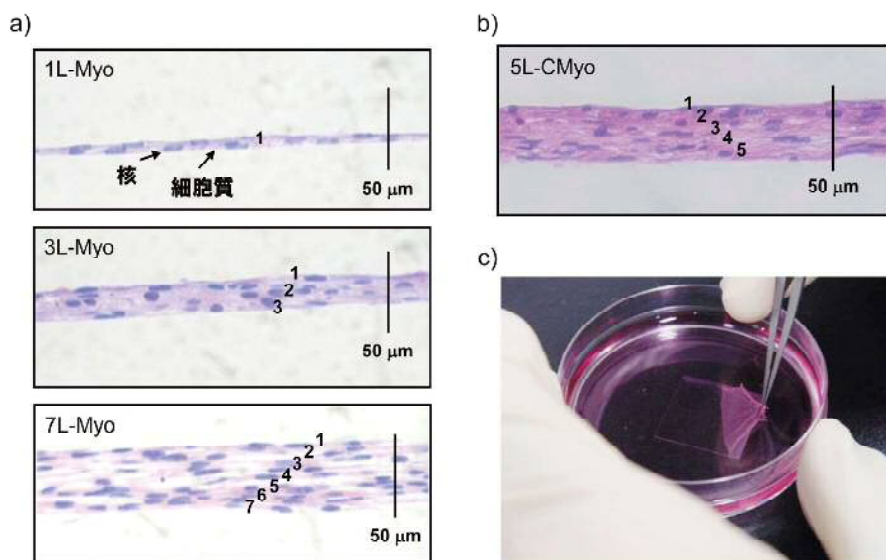


図4 a) マウス C2C12 筋芽細胞 (Myo) の 1, 3, 7 層構造のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色組織切片写真。b) ラット初代心筋細胞 (CMyo) の 5 層構造の HE 染色写真。c) 4 層のマウス L929 線維芽細胞組織をピンセットで基板から剥離している様子。

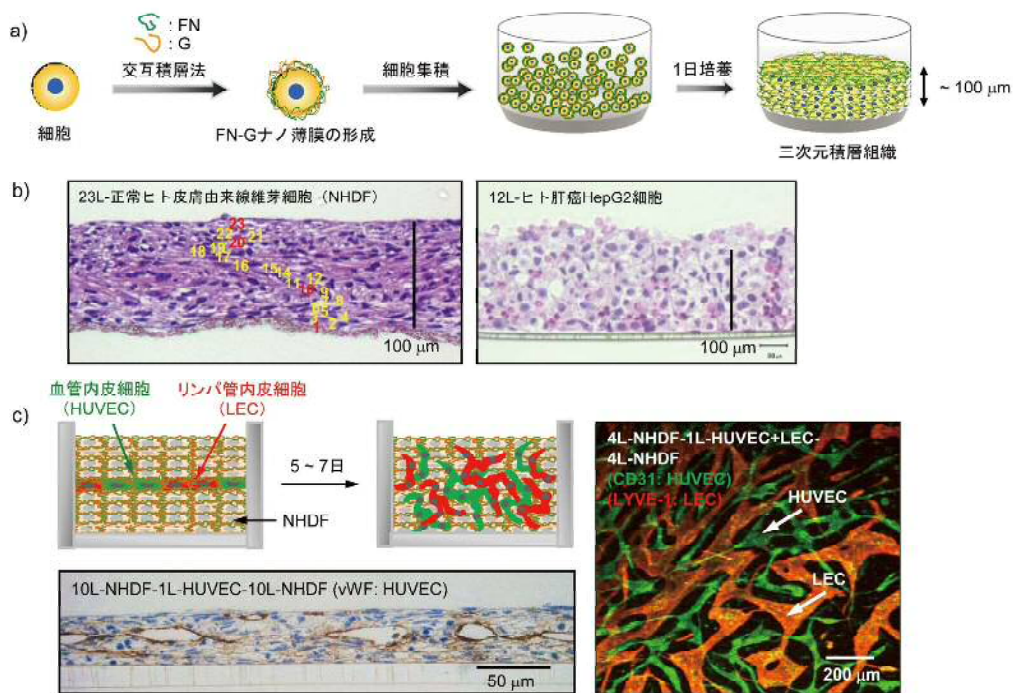


図5 a) 細胞集積法のイメージ。b) 細胞集積法で構築した三次元組織体のHE染色による組織切片写真。c) HUVEC及びLECの積層培養のイメージ(左)と蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡イメージ(右)。HUVEC(緑)とLEC(赤)がそれぞれ独立したネットワーク構造を形成。抗vWF抗体を用いてHUVECを染色したHUVECのみ積層培養後の組織切片写真(左下)。

パ管網が共存した三次元組織体を得ることに成功した^{14, 15)}。これらのネットワークは全体に均一に形成され、ネットワークが占める体積はおよそ50～60%、チューブ間距離は100～150 μmであった。様々な解析により、周辺の線維芽細胞から産生された血管新生因子がHUVECやLECのチューブ化に重要であることが確認された¹⁵⁾。

以上より、細胞集積法を用いることで毛細血管・リンパ管網を有する三次元組織体の構築が可能であった。

肝組織チップによる薬物毒性評価

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様々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。そこで、詳細は割愛するが、インクジェットプリント装置による細胞プリントの技術を開発した(図6a)¹⁶⁾。

組織チップの薬剤評価への応用を目的として、ヒト肝癌細胞(HepG2)とHUVECのヘテロ積層組織

チップの作製に取り組んだ(図6b)。肝臓は化学物質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。しかし、ヒト初代肝細胞は日本国内では入手困難であるため輸入する必要があり、また、継代培養ができないため高価な初代肝細胞を大量に購入して使用しているのが現状である。一方、HepG2のように株化されて継代培養が可能な肝癌細胞も市販されているが、初代肝細胞と比較して代謝活性が激減している。したがって、HepG2細胞の機能を高めて初代肝細胞に近づけることができれば、薬剤評価に大変有用である。肝組織は肝細胞が血管に挟まれた三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の一層から三層の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¹⁶⁾。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三層構造が一層構造と比較して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(図6c)。また、薬物代謝酵素の一種であるシトクロムP450 3A4(CYP3A4)の発現量と活性を評価

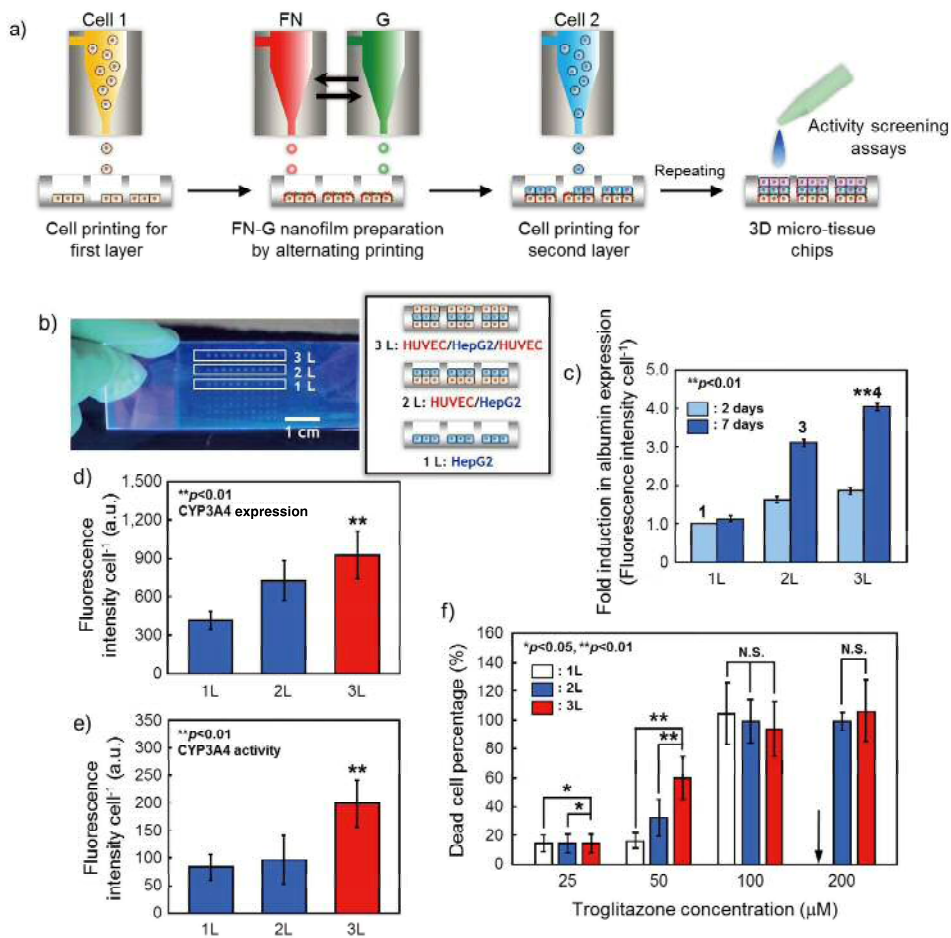


図6 a) インクジェットプリントによる三次元組織チップの構築イメージ。b) ヒト肝臓細胞 (HepG2) とヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) で作製した1~3層構造の肝組織チップの写真。c) アルブミン発現量と層構造の関係。抗アルブミン抗体で蛍光染色した各ウェルの蛍光強度で比較した。d) CYP3A4発現量および e) 活性と層構造の関係。抗CYP3A4抗体での蛍光染色で発現量を評価し、vivid redを用いて活性を評価した。f) トログリタゾン濃度に依存した死細胞の割合と層構造の関係。LIVE/DEADアッセイにより死細胞を蛍光強度で評価した。矢印は死細胞が剥離して定量できなかったことを示す。

した結果、やはり三層構造が最も高い発現量と代謝活性を有していることが確認された (図6dおよび6e)。そこで、実際に肝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¹⁷⁾。そこで、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ため、近年ではCYP3A4の薬物代謝活性試薬として用いられている。図6fに、TGZ濃度に対する層数の死細胞数変化のグラフを示した。三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

μMの場合、一層構造では16%の死細胞割合であったのに対して三層構造では60% (約4倍) まで増加し、HUVECで挟んだ三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。以上より、本三次元肝組織チップは、肝組織のハイスループットな薬効・毒性評価を可能とする革新的なツールとして応用が期待される。

おわりに

本項では、我々の化学細胞操作技術による三次元組織構築を紹介した。細胞集積法を基盤技術とした「細胞積層培養キット: CellFeuille®」¹⁸⁾が住友ベークライト株式会社より販売され、研究者に広く使われて頂ける状況となった。ただ、現状では、得られ

る組織体はまだ小さく、生体組織と比較して単純な構造体しか得ることができない。しかし、ここで強調したいのは、本研究の目的は、「生体組織を作ること」ではなく、「医薬品評価に使える組織体を作ること」である。単純化された構造であるため、余計な因子を省いてシンプルに評価できる可能性がある。究極的には、生体に極めて類似していることが望まれると思うが、まずは、「使える物」を一つ一つ構築することが重要である。

最近、生体の結合組織にヒントを得た、新たな三次元組織体の構築方法を考案した。様々な「化学的細胞操作技術」を適宜組み合わせることで、より生体に近い組織体の構築が期待される。

参考文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007. 131. 861-872.
- 2) Matsuzawa A, Matsusaki M, et al: Construction of three-dimensional liver tissue models by cell accumulation technique and maintaining their metabolic functions for long-term culture without medium change. *J. Biomed Mater Res A* 2015. 103(4). 1554-64
- 3) Huh D, Matthews BD, et al : Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010. 328. 1662-1668.
- 4) 松崎典弥, 明石 満: 第4編 第23章 生体由来ポリマーを用いた三次元組織構築. 進化する医療用バイオベースマテリアル. シーエムシー出版. 2015年. ISBN: 978-4-7813-1054-1.
- 5) Langer R and Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260. 1993. 920-926.
- 6) Yang J, Yamato M, et al: Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005. 26(33). 6415-6422.
- 7) Akiyama H, Ito A, et al: Genetically engineered angiogenic cell sheets using magnetic force-based gene delivery and tissue fabrication techniques. *Biomaterials* 2010. 31(6). 1251-1259.
- 8) Matsusaki M, Kadowaki K, et al: Fabrication of Cellular Multilayers with Nanometer-Sized Extracellular Matrix Films. *Angew Chem Int Ed* 2007. 46 4689-4692.
- 9) Matsusaki M, Amemori S, et al: Quantitative 3D-Analysis of Nitric Oxide Diffusion in a 3D-Artery Model Using Sensor Particle. *Angew Chem Int Ed* 2010. 50. 7557-7561.
- 10) Chetprayoon P, Matsusaki M, et al: Use of three-dimensional arterial models to predict the in vitro behavior of nanoparticles for drug delivery. *Angew Chem Int Ed* 2016. 55. 4461-4466.
- 11) Gribova V, Liu C-Y, et a.: Construction and myogenic differentiation of 3D myoblast tissues fabricated by fibronectin-gelatin nanofilm coating. *Biochem Biophys Res Commun* 474. 515-521.
- 12) Matsusaki M, Komeda M, et al: Desmoplastic reaction in 3D-pancreatic cancer tissues suppresses molecular permeability. *Adv Healthcare Mater*, in press. DOI:10.1002/adhm.201700057.
- 13) Nishiguchi A, Yoshida H, et al: Rapid Construction of Three-dimensional Multilayered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-accumulation Technique *Adv Mater* 2011. 23. 3506-3510.
- 14) Matsusaki M, Ajiro H, et al: Layer-by-layer assembly through weak interactions and their biomedical applications. *Adv. Mater* 2012. 24. 454-474.
- 15) Nishiguchi A, Matsusaki M, et al: Effects of Angiogenic Factors and 3D-Microenvironments on Vascularization within Sandwich Culture. *Biomaterials* 2014. 35. 4739-4748.
- 16) Matsusaki M, Sakaue K, et al: Three-dimensional Human Tissue Chips Fabricated by Rapid and Automatic Inkjet Cell Printing *Adv. Healthcare Mater.* 2013. 2. 534-539.
- 17) Smith MT: Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2003. 16. 679-687.
- 18) <http://www.sumibe.co.jp/product/s-bio/cell-culture/cellfeuille/index.html>