

## 3D組織構築のためのバイオリアクタの開発

\*<sup>1</sup>早稲田大学理工学術院, TWIns, \*<sup>2</sup>東京女子医科大学先端生命医科学研究所, TWIns

坂口 勝久\*<sup>1</sup>, 清水 達也\*<sup>2</sup>

Katsuhisa SAKAGUCHI, Tatsuya SHIMIZU



### 1. はじめに

1993年にランガーとバカンティが細胞から組織を構築する「組織工学」を提唱してから再生医療分野は急速な広がりを見せ、様々な細胞移植法や組織構築法が生み出された<sup>1)</sup>。一方, ES (embryonic stem) 細胞やiPS (induced pluripotent stem) 細胞の開発によって心筋細胞・肝細胞・神経細胞が理論的に大量培養可能となり, 細胞から組織臓器の作製が現実味を増して, 再生医療市場は活気を見せている。

近年, 様々な組織構築法が考案される中, 細胞群をひとつの部品として組織を構築する方法が主流化してきている。球状の細胞凝集塊スフェロイドを精密なマニピレータで並べ構築する手法<sup>2),3)</sup>や, ファイバー状に形成して編み込むことで組織を構築する手法が開発された<sup>4)</sup>。当研究所では, 細胞をシート状に加工したものを積層することで3D組織の構築を進めている<sup>5),6)</sup>。図1はそれぞれ各研究所で行われている部品の形状を示している。

細胞をシート状に作製する方法は, 培養皿の表面を温度にตอบสนองして親水性/疎水性を変化させることにより実現した<sup>7)</sup>。培養基材は, 温度応答性高分子であるポリN-イソプロピルアクリルアミドを市販の培養皿に電子線を用いて表面グラフトしたもので, 温度培養(37℃)では疎水性の表面となるため細胞が接着するのに対し, 温度降下処理(32℃以下)では親水化するため細胞が培養皿表面から剥離する<sup>8)</sup>。この細胞をシート状に回収する技術により, 角膜・

心臓・食道・歯周・軟骨疾患に対する細胞シート治療の臨床応用が実現している<sup>9)~15)</sup>。さらに, 現在の単層または数層の細胞シート治療から, より効果的な治療方法へ高めるために, 細胞シートを積層化して3D組織の構築を試みている。しかしながら, 細胞シートを積層するだけでは, 内部の細胞が酸素栄養素の不足または自身の老廃物によって壊死を起してしまうため, 3D組織の構築は困難である。

そこで, 当研究所では細胞シートに血管を付与し, 構築した血管に血液のような培養液を灌流する方法を考案した。この構想で重要となる点は細胞シートに内皮細胞を導入することで, 自発的に血管網が構築することを見出したところにある。図2は線維芽細胞との共培養をすることで, 内皮細胞が網目状のネットワークを形成している状態を示している。この血管網が付与された細胞シートを移植することで, 血管網がないものに比べて顕著に移植効率が良くなることが確認できた。移植した細胞シート上の血管網がホストの血管に結合することで心筋細胞シートを維持するためである。この生体内での心筋組織構築法を基に, 生体外で3D組織構築を行い, 2種類の血管床バイオリアクタを開発した。本稿では, 細胞シート技術を基にした3D組織構築法の開発について報告する。

### 2. 細胞シート上の血管網構築

血管網は酸素・栄養を供給し老廃物を除去する役割を有しているため, 3D組織構築には必須のものである。当研究所では, 細胞シートを用いて機能的な心筋組織を再生する研究を展開してきた。より収縮力が強く, 高機能的な心筋組織の再生させる上で課題となるのが, いかに血管網を付与し再生組織の厚みの増大を図るか, である。心筋組織では血管が約10%の体積を占有しており, 毛細血管交互の距

#### ■ 著者連絡先

早稲田大学理工学術院  
(〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 TWIns 3F (03C-204))  
E-mail. katsuhisa@aoni.waseda.jp

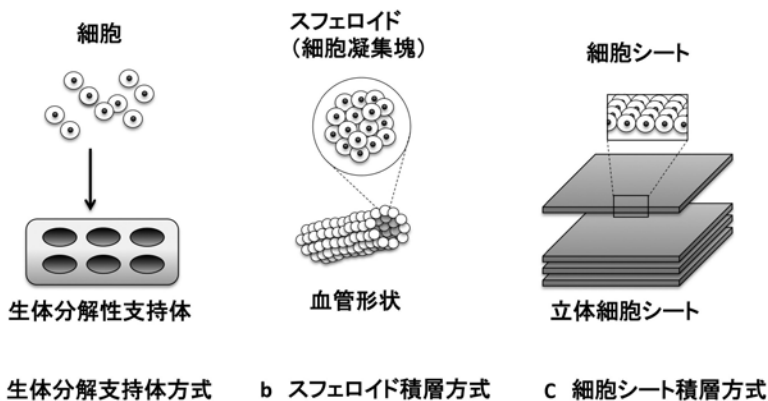


図1 組織群を1つの部品として組織を構築する方法

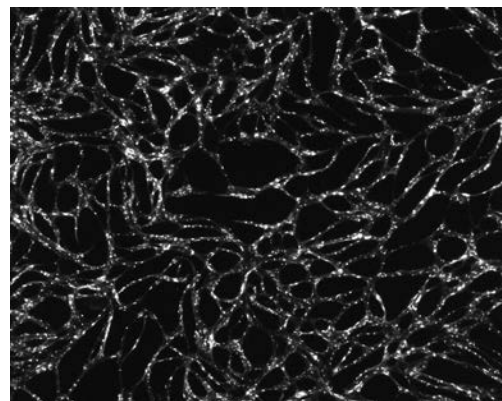


図2 細胞シート内血管網

離も約 $15\mu\text{m}$ と極めて高密度な血管網が形成されている<sup>16)</sup>。毛細血管網を伴わず培養液の拡散のみで生存できる心筋組織の厚さは数細胞分と考えられており、それ以上の厚みある心筋組織の再生には新たな技術開発が必要となっている。

我々も細胞シート工学を基盤として多面的なアプローチで、3D組織を構築する上で細胞シート内に血管網を構築する方法を見出す必要があった。しかしながら、前述したように、内皮細胞と線維芽細胞を共培養するだけで血管網が構築されることが分かり、目的の細胞であるラット心筋細胞と内皮細胞を共培養においても、細胞シート内の血管内皮細胞では自発的に網目構造が形成されることを確認した。そこでこの血管網の機能性を確認するために、血管網付き心筋細胞シートをヌードラット背部に移植した。結果、細胞シートはホストの組織に生着し、細胞シート内の血管網に血液が循環してホスト背部の血管とのキメラ血管を構築していた<sup>17)</sup>。また、血管網がない細胞シートに関しては移植細胞生着率が著しく低下することが分かった。これにより、自発的に構築された血管網は機能性を有し、移植するにあたっていかに血管網が重要であるかということも分かった。

次に、疾患部においても細胞シート内血管網が機能性を有するかを確認するために、心筋細胞シートを心筋梗塞部位にも移植した。心機能治療効果を検証したところ、血管網がない細胞シートに比べて有意に心機能の改善に至った。共培養で細胞から構築された血管網は、心筋梗塞部位であっても機能性を有していた。

このように細胞から構築された血管網が機能性を有していることが証明されたため、3D組織構築する上でこの血管網を利用することを考えた。ちなみに、細胞シート内血管網の自発的な発達に関して、心筋細胞以外の組み合わせ

である線維芽細胞と内皮細胞、筋芽細胞と内皮細胞の組み合わせも、同様に血管網の構築が確認され、移植生着率のよい結果となった<sup>18)</sup>。すなわち、細胞シート内に形成された内皮細胞による血管網は機能性を有し、移植後にホストの血管と結合して血液が流れて細胞生存率が維持されることが証明された。

### 3. 生体内における3D組織構築

内皮細胞を共培養、または細胞シートに扶むことによって血管網が自発的に構築することを見出し、この血管網が細胞シートの移植効率を向上させることが分かった。しかしながら、血管網付きの細胞シートでも移植枚数には限界があり、一度に4層以上の細胞シートを移植しても定着するのは困難であった。そこで、ヌードラット背部へ移植した積層化心筋細胞シート(3層)に十分な血管が新生されるのを待った後に、新たな積層化心筋細胞シートを段階的に繰り返し移植することを試みた。

3層の積層化心筋細胞シートを、24時間のインターバルにおいて、10回にわたり組織移植した結果、血管網を伴った厚さ約1 mm (30層)の3D心筋組織が構築された。さらには移植した全ての心筋細胞シートは同期して自律拍動することを確認した。

生体内で再生した3D心筋組織の異所移植可能性を示すために、インクを使って流れを観察した。ホスト大腿部動脈静脈血管上に心筋細胞シートを移植し、動脈付きの3D心筋グラフトを作製した。この心筋グラフトの動脈からインクを流したところ、静脈から出てくるのを確認した。さらに、形態観察によって移植細胞シートにインクが流れていることが確認された<sup>19)</sup>。これにより、動脈ループを有している心筋組織の構築を示しており、異所移植の可能性を示した。

次の取り組みとして、心筋細胞シートが心不全患者の補助ポンプとなりうるチューブ状の3D心筋組織を構築する試みが始まっている。ラット腹部大動脈を採取し、その周囲に心筋細胞シートを連続的に巻き付けることによって、チューブ状の心筋組織を構築した。このチューブ心筋組織をラット腹部大動脈と置換移植し、心拍動の補助を行えるかどうかを検討した。移植したチューブ心筋組織はホスト心臓とは独立した自律拍動が確認され、肉眼および電位測定で確認できるとともに約6 mmHgの内圧較差が計測された<sup>20)</sup>。以上の結果から、チューブ状の心筋組織が補助ポンプとして機能し得ることを示した。

段階的な繰り返しの移植による3D組織構築は、今までにないスケールで細胞をデリバリーする手法で、細胞治療を超えて組織治療として非常に期待ができる。しかしながら、多数の手術を必要とし、実用化にはまだハードルがある。そこで、生体外で同様の繰り返し積層によって3D組織が構築できるかについて検討を行った。

#### 4. 生体外における3D組織モデルの構築

生体内において、細胞シートを積層化することで3D組織を再生することが確認された。これは疾患に対する移植組織の再生のみならず、薬剤試験として3D組織モデルの構築においても有用である。近年、「この3D組織モデルを使った薬効試験によって安価・高速化・定量化が可能」と予測され、各国がこの取り組みに大きな予算を立てている。したがって、大企業や多くのベンチャー企業がこの3D組織モデルに参入してきている。

我々の研究所でも、肝細胞シートと血管内皮細胞との積層化により生体と類似した構造を作製することにより、これまでになく長期間その機能を維持することが可能な3D肝細胞培養モデル系を実現している<sup>21)</sup>。ここで、さらに生体に近い厚さで、機能性を有する3D組織を作るには、通常の培養法では極めて困難である。そこで近年、注目されているのが、バイオリアクタを用いた3D組織構築法である。バイオリアクタを用いて生体に類似した環境を模倣することで、より機能的な組織を再生できる可能性が示唆されている。我々の研究所では、心筋細胞シート内の血管網に培養液が灌流可能な2種類のバイオリアクタを開発した。①生体由来の筋組織上培養と、②微小流路付きコラーゲンゲル上培養である。

##### 1) 生体由来の筋組織上培養

生体由来の筋組織上でのバイオリアクタの作製方法は以下の通りである。まず、動脈付きのラット大腿部筋組織を単離して動脈血管から培養液を流し込んで筋組織を灌流

培養する。その上に心筋細胞シートを接着させると、3～5日間の灌流培養後には大腿部筋組織の血管網と心筋細胞シートの血管網が結合して培養液が流れ込んだ。このラット大腿部筋組織を用いた灌流装置の模式図を図3に示す。各々の血管網同士が結合して細胞シートに培養液が流れ込んだ後に、細胞シートの追加積層を行うと、一度に積層するよりも細胞シートの積層が可能となった。段階的な3層積層を繰り返すことで合計12層もの細胞シートが積層可能となった<sup>22)</sup>。

次に、生体外で構築した組織が移植可能かどうかを検討するために、大腿部から単離した動脈付きの血管床で作製した心筋組織を頸動脈部に異所移植した。移植した心筋組織は肉眼で拍動が観察され、生存したことを確認した。これらの結果から、生体外においても細胞レベルから移植可能な3D心筋組織が構築できることを示した。

##### 2) 微小流路付きコラーゲンゲル上培養

生体外で細胞シート内血管網に培養液を流す方法として、②微小流路付きコラーゲンゲル上で培養する方法を開発した。血管網付き心筋細胞シートを微小流路付きコラーゲンゲル上に接着した後に、微小流路に培養液を灌流して培養を行った結果、心筋細胞シート内血管網がコラーゲンに浸潤し、さらなる血管ネットワークを形成して培養液が細胞シート内に流れ込んだ。微小流路付きコラーゲンと細胞シートへの灌流培養装置を図4に示す。細胞シート内への流れを確認するために、血液、蛍光粒子、エポキシ樹脂により流れの検証を行ったところ、コラーゲンゲル内に形成された内皮細胞ネットワークに流れ込み、ゲル内微小流路と細胞シート内血管網が結合したことが観察された。また、筋組織時と同様に血管網が流路に結合した後に、追加の心筋細胞シート積層を行ったところ、一度に積層するよりも細胞シートの積層が可能となった。3層ずつ5日間隔で、段階的に積層培養を行うことで、壊死することなく12層の組織を構築した<sup>23)</sup>。

#### 5. おわりに

以上のように、積層した細胞シート内の血管網に培養液を灌流するバイオリアクタ開発により、生体外においても3D組織を構築することに成功した。この3D組織構築により、動物を使用しない薬剤試験の実現や新しい再生医療技術の発展が大いに期待できる。将来、さらなる高次機能を有する臓器を構築するには、高速で積層する方法の開発、ヒトiPS細胞やES細胞の大量培養技術、フィードバック制御を有する培養液循環装置、さらには酸素や栄養の供給と老廃物の中和・除去が効率よく行われる培養液を開発しな

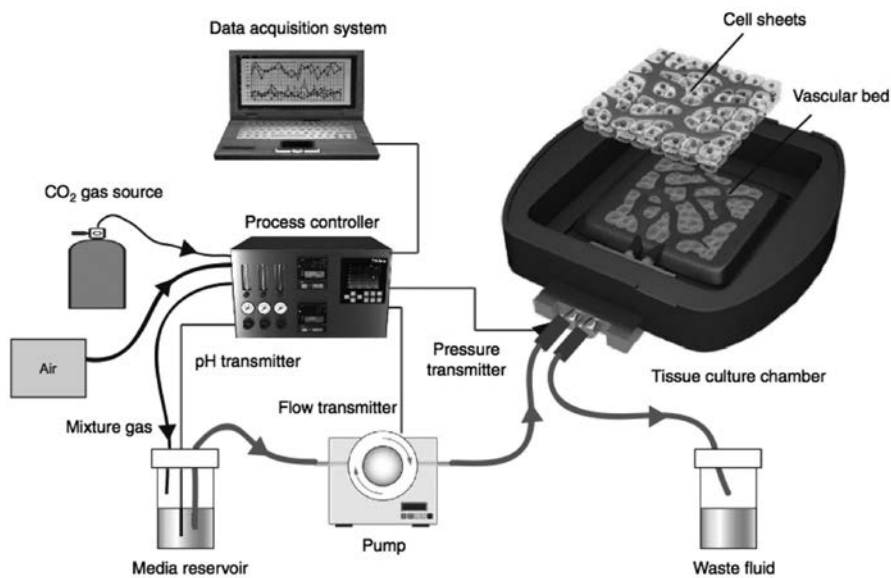


図3 筋組織血管床

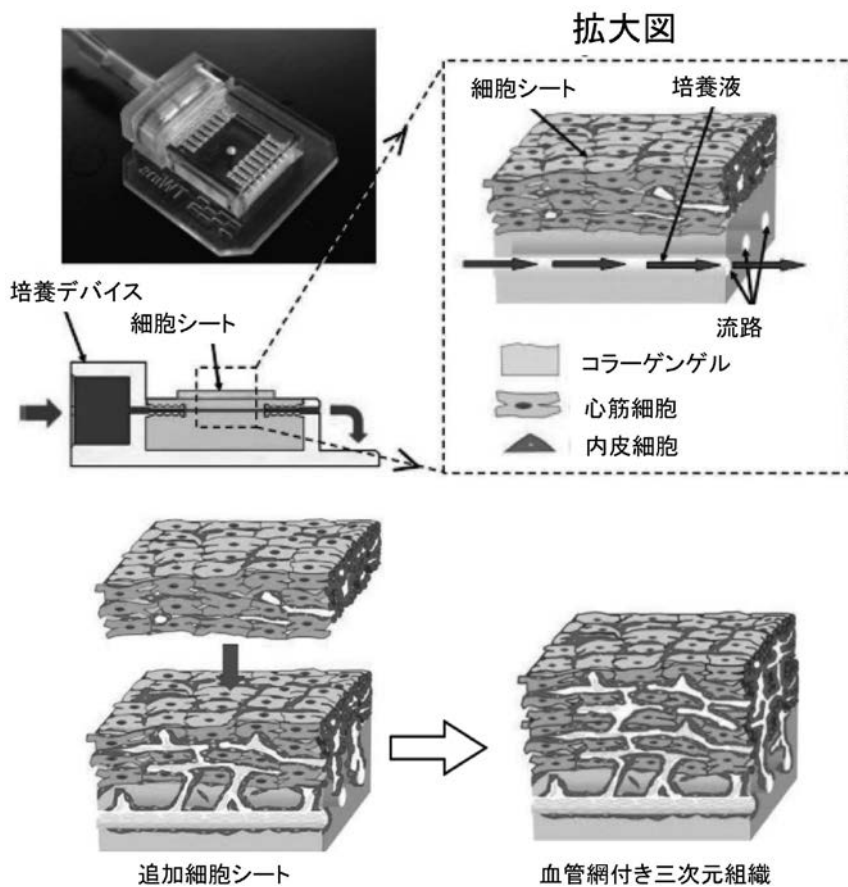


図4 コラーゲンゲル血管床

ければならない。このような装置開発が完成に至れば、臓器創出を可能とし全世界数百万人と言われるドナー不足を解消し、多くの不治の病を解決するものと期待される。

#### 利益相反の開示

清水 達也：【株】株式会社セルシード

【研究費・寄附金】日本光電工業株式会社、旭化成株式会社、株式会社東海ヒット、株式会社ニコン、大日本印刷株式会社、株式会社日立製作所、株式会社セルシード、テルモ株式会社

その他の著者には規定されたCOIはない。

#### 文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* **260**: 920-6, 1993
- 2) Norotte C, Marga FS, Niklason LE, et al: Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**: 5910-7, 2009
- 3) Shimoto T, Hidaka N, Sasaki H, et al: Bio Rapid Prototyping Project: Development of Spheroid Formation System for Regenerative. *Medicine Information Technology Convergence* **253**: 855-62, 2013
- 4) Onoe H, Okitsu T, Itou A, et al: Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. *Nat Mater* **12**: 584-90, 2013
- 5) Yamato M, Okano T: Cell Sheet Engineering. *Materials Today* **7**: 42-7, 2004
- 6) Yang J, Yamato M, Kohno C, et al: Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **26**: 6415-22, 2005
- 7) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* **27**: 1243-51, 1993
- 8) Kushida A, Yamato M, Konno C, et al: Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res* **45**: 355-62, 1999
- 9) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **351**: 1187-96, 2004
- 10) Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, et al: Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today* **42**: 181-4, 2012
- 11) Iwata T, Yamato M, Zhang Z, et al: Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol* **37**: 1088-99, 2010
- 12) Hama T, Yamamoto K, Yaguchi Y, et al: Autologous human nasal epithelial cell sheet using temperature-responsive culture insert for transplantation after middle ear surgery. *J Tissue Eng Regen Med* 2015 [Epub ahead of print]
- 13) Ohki T, Yamato M, Ota M, et al: Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* **143**: 582-8, 2012
- 14) Kanzaki M, Yamato M, Hatakeyama H, et al: Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea. *Tissue Eng* **12**: 1275-83, 2006
- 15) Sato M, Yamato M, Hamahashi K, et al: Articular cartilage regeneration using cell sheet technology. *Anat Rec (Hoboken)* **297**: 36-43, 2014
- 16) Stoker ME, Gerdes AM, May JF: Regional differences in capillary density and myocyte size in the normal human heart. *Anat Rec* **202**: 187-91, 1982
- 17) Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, et al: Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 573-82, 2006
- 18) Sekine H, Shimizu T, Hobo K, et al: Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* **118**(14 Suppl): S145-52, 2008
- 19) Shimizu T, Sekine H, Yang J, et al: Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J* **20**: 708-10, 2006
- 20) Sekine H, Shimizu T, Yang J, et al: Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation* **114**(1 Suppl): I87-93, 2006
- 21) Kim Y, Ohashi K, Utoh R, et al: Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials* **33**: 1406-13, 2012
- 22) Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, et al: In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun* **4**: 1399, 2013
- 23) Sakaguchi K, Shimizu T, Horaguchi S, et al: In vitro engineering of vascularized tissue surrogates. *Sci Rep* **3**: 1316, 2013