68　機械刺激の深化 -細胞集団への適応-	袴田　昌高

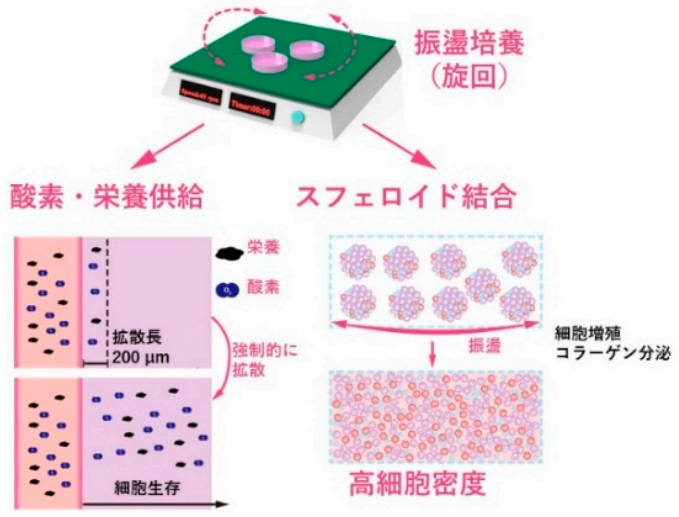
【目的】高細胞密度かつ階層的血管網（hierarchical vascular networks：HVN）を持つミリメートルサイズの3D 組織を開発するために、著者らはスフェロイドの集団に振盪（周期的機械的刺激）を与えて高細胞密度組織の自己組織化を促進することを着想した。振盪は機械的な刺激のほかにも、酸素・栄養の供給を促進する効果がある。その他の工夫として、血管の形成・安定化・成熟に関連する周皮細胞を取り入れ、また容器作製に 3D バイオプリンティングも援用することとした。

【方法】スフェロイドは、マイクロウェルのプレートまたはディッシュを用いて作製した 3 種の細胞を組み合わせたスフェロイド（以降、3 細胞スフェロイドと称する）の場合、正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、ヒト肝星状細胞（HSC）を 10：1：0、10：1：1、10：1：10 の細胞比で混合した。混合細胞を 200 細胞／マイクロウェルで播種し、3〜5 日間の前培養を行った。作製したスフェロイドはすべて、EBM-2（CC-3162）を用い、37℃、5%CO_2下の加湿雰囲気で保管した。

また、バイオプリント用のバイオインクは、GelMA 粉末を、光重合開始剤であるフェニル（2,4,6-トリメチルベンゾイル）ホスフィン酸リチウム（LAP）を含む 10 mL の DPBS に溶解し、適切な温度条件で使用した。また、犠牲バイオインク（プルロニック）を 4℃で印刷し、CAD モデルに基づいた 3D 構造体を作製した。この構造体を液体 GelMA の入った容器に移し、GelMA を波長 405 nm の光で 1 分間架橋した。最後に温度を 4℃に下げてプルロニック構造体を除去し、GelMA 容器とした。容器は DPBS 中、4℃で最低でも 1 週間保存した後、チャンバーにスフェロイドを充填して高細胞密度前駆体とした。この前駆体を 45 rpm で 2 週間振盪培養し、高細胞密度組織を作製した。試料は各種顕微鏡観察・遺伝子発現分析に供した。

【結果】高細胞密度前駆体を振盪培養にかけた結果、試料を構成するスフェロイド間の結合が強化され、組織をピンセットでつまみ上げ、崩れることなく何度もつまむことができ、同時に高細胞密度（$>10^8$細胞／cm^3、生体内の臓器の細胞密度とほぼ同等）が達成された。スフェロイド同士の融合が各種観察により確認され、かつ、高密度細胞組織の中心にプルロニック犠牲材構造体から作製された人工的なマクロ流路（＝擬似人工動脈）が明瞭に観察された。また、毛細血管はこの擬似人工動脈と吻合していた。薄切試料のα平滑筋アクチン（αSMA）の免疫染色後の観察から、活性化した HSC が管腔構造の周囲に偏在し、成熟した HVN の迅速な形成を支えていることが示唆された。さらに、蛍光ビーズを含む培地を流した試料の蛍光顕微鏡観察により、培地は組織中央の擬似人工動脈から組織内の毛細血管へと流れていること、毛細血管が擬似人工動脈とつながっていること、毛細血管と蛍光ビーズが同じ場所にあることが確認された。

機械刺激（振盪培養）によるミリメートルサイズの 3D 組織創製



68. 機械刺激の深化－細胞集団への適応－

袴田　昌高

京都大学 大学院エネルギー科学研究科 エネルギー応用科学専攻

Key words：生体材料，組織工学，血管形成，高細胞密度組織，周皮細胞

緒　言

三次元（3D）組織の生物工学的創製は急速に進歩している。臓器に類似した構造と機能を持つ *in vitro* 組織の作製を可能にし、再生医療・薬剤スクリーニング・疾患モデリングへの応用のためのプラットフォームを確立しつつある［1〜3］。組織をモデルしたものとしてスフェロイドやオルガノイドなどの細胞集団も用いられているが、これらの大きさは、通常 50〜200 μm である。一方、3D 組織の代表寸法がミリメートルサイズを超えると、血管網などのより複雑な構造の作製が可能になり、生体内環境の再現が可能になる［4〜6］。

一般に生体組織では、酸素と栄養素の拡散の限界は約 200 μm であり、ミリメートルサイズの組織を作製する際の課題となっている［7］。ミリメートルサイズを超える高細胞密度組織に酸素と栄養を十分に供給するために、生体内の血管網に似た動脈・静脈・毛細血管からなる階層的血管網（hierarchical vascular networks：HVN）が必要となる。HVN が血管新生によってのみ形成される場合、新生速度が遅いと HVN 形成の完了前に低酸素症によって多くの細胞が死滅してしまう。したがって、細胞密度の高い 3D 組織の作製には迅速な HVN 形成が不可欠である。著者らは毛細血管網を含む共培養細胞シートから HVN を備えた高細胞密度組織の作製に成功しているが［4］、これらの共培養細胞シートからなる組織には、より高い細胞生存率、より複雑な構造、そしてさらなるスケールアップが望まれる。

高細胞密度かつ HVN を持つミリメートルサイズの 3D 組織を開発するために、著者らはスフェロイドの集団に振盪（周期的機械的刺激）を与えて高細胞密度組織の自己組織化を促進することを着想した（図 1）。振盪は酸素・栄養の供給促進にも効果を有する。この際、血管の形成・安定化・成熟に関連する周皮細胞を取り入れ、また 3D バイオプリンティングも援用することとした。

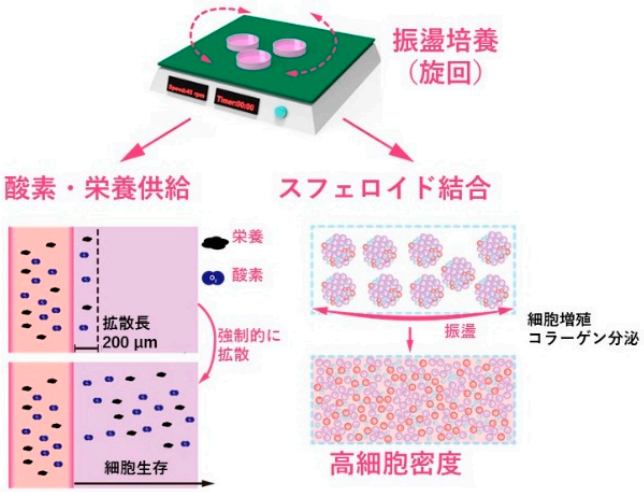


図 1. 振盪培養によるミリメートルサイズの 3D 組織創製
振盪により酸素や栄養を内部まで供給するとともに、機械的刺激によりスフェロイドどうしの結合を促進する。

方　法

1. スフェロイドの調製

スフェロイドは、1,400 マイクロウェルのプレート（EZSPHERE™ SP Multi-Well：4810-900SP）または 17,000 マイクロウェルのディッシュ（4020-900SP）を用いて作製した。マイクロウェルの寸法は直径 400～500 μm、深さ 100～200 μm であった。プレートとディッシュを DPBS で 3 回洗浄して微細気泡を除去し、細胞を播種した。正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）のみからなるスフェロイドの場合、細胞は 200 個／マイクロウェルで播種し、3 日間前培養した。3 種の細胞を組み合わせたスフェロイド（以降、3 細胞スフェロイドと称する）の 場合、NHDF、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、ヒト肝星状細胞（HSC）を 10：1：0、10：1：1、10：1：10 の細胞比で混合した。混合細胞を 200 細胞／マイクロウェルで播種し、3～5 日間の前培養を行った。作製したスフェロイドはすべて、EBM-2（CC-3162）を用い、37℃、5%CO_2下の加湿雰囲気で保管した。

2. GelMA を用いたバイオプリンティングと高細胞密度組織の作製

バイオプリント用のバイオインクは、製造業者のプロトコルに従って調製した。具体的には、GelMA 粉末（Sigma-Aldrich）を、光重合開始剤であるフェニル（2,4,6-トリメチルベンゾイル）ホスフィン酸リチウム（LAP）を含む 10 mL の DPBS に溶解し、10%（w/v）GelMA／0.05%（w/v）LAP バイオインクを作製した。このバイオインクを－20℃で保存し、37℃で融解して使用した。犠牲バイオインクであるプルロニック F127（F-AV-PLU-100ML；Allevi）をシリンジに分注し、4℃で保存した。

高細胞密度組織は以下の方法で作製した。プルロニック F127 バイオインクを 4℃で印刷し、CAD モデルに基づいた 3D 構造体を作製した。この構造体を液体 GelMA の入った容器に移し、GelMA を波長 405 nm の光で 1 分間架橋した。最後に温度を 4℃に下げてプルロニック構造体を除去し、GelMA 容器とした。容器は DPBS 中、4℃で最低でも 1 週間保存した後、チャンバーにスフェロイドを充填して高細胞密度前駆体とした。この前駆体を 45 rpm で 2 週間振盪培養し、高細胞密度組織を作製した。

3. 高細胞密度組織の 3D イメージング等

組織を培養チャンバーから取り出し、4%パラホルムアルデヒドで 1 日間室温固定し、DPBS で 3 回洗浄した。その後、CUBIC-L と DPBS を 1:1 の割合で混合した液に 1 日間室温浸漬ののち 100%CUBIC-L で 3 日間 310 K で脱脂し、さらに DPBS で 3 日間室温洗浄した。さらに組織を CUBIC-R＋と DPBS を 1：1 の割合で混合した溶液に室温で 1 日間浸漬し、100%CUBIC-R＋溶液で 3 日間室温洗浄した。これら一連の過程で透明化された組織は、ライトシート蛍光顕微鏡と共焦点顕微鏡を用いて観察した。その他、病理組織ブロック作製～薄切～H&E・免疫染色～観察等も行った。

結果および考察

1. HVN を備えた高細胞密度組織の作製

前駆体中のスフェロイド間には特に強い結合はなく、前駆体は機械的強度に乏しかった。実用的な機械的強度を有する高細胞密度組織を作るには、スフェロイド間の強い結合が必要である。一方で、スフェロイド間の結合が強すぎれば、酸素や栄養分の供給が制限されるため、組織内部の細胞は死んでしまう。従って、ミリメートルオーダのサイズを有する 3D 高細胞密度組織を作製するためには、スフェロイド間の強固な結合と酸素・栄養分の十分な供給を同時に達成する必要がある。この目的で前駆体を振盪培養にかけた結果、試料を構成するスフェロイド間の結合が強化され、組織をピンセットでつまみ上げ、崩れることなく何度もつまむことができ（図 2）、同時に高細胞密度（$>10^8$ 細胞／cm^3、生体内の臓器の細胞密度とほぼ同等）が達成された。

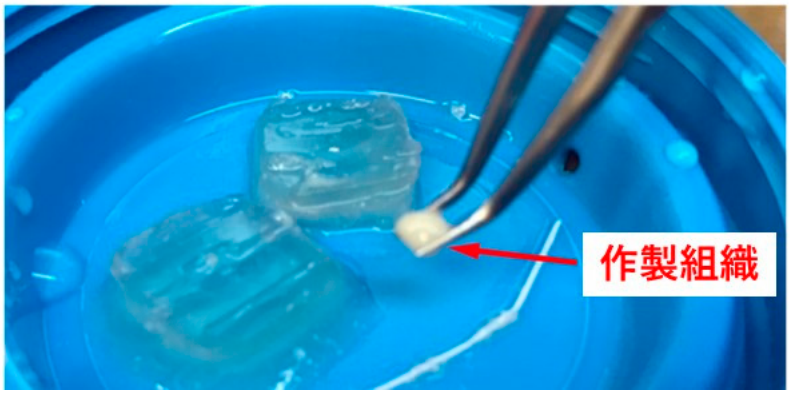


図 2.　3 細胞スフェロイドから作製した 3D 組織の外観およびピンセットでの取り扱い
良好に作製された 3D 組織はピンセットでつまんでも崩れることなく、一体性を保ったまま取り扱える。

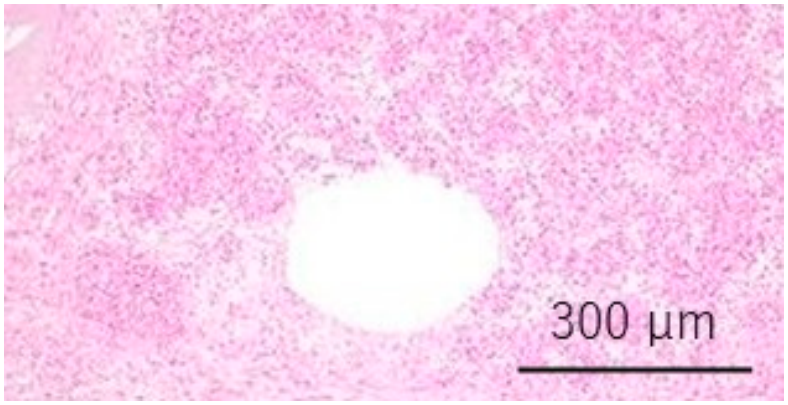


図 3.　3 細胞スフェロイドから作製した 3D 組織の H&E 染色写真
核の染色された生細胞が緻密に組織を形成している。中央の空洞は疑似人工動脈断面。

薄切 H&E 染色試料の観察によればスフェロイド同士の融合が確認され、かつ、高密度細胞組織の中心にプルロニック犠牲材構造体から作製された人工的なマクロ流路（＝擬似人工動脈）が明瞭に観察された（図 3）。また、毛細血管はこの擬似人工動脈と吻合していた。薄切試料のα平滑筋アクチン（αSMA）の免疫染色後の観察から、活性化した HSC が管腔構造の周囲に偏在していることが明らかになり、HSC が HVN の迅速な形成と成熟を支えていることが示唆された。

蛍光ビーズを含む培地を流した試料の蛍光顕微鏡観察により、培地は組織中央の擬似人工動脈から組織内の毛細血管へと流れていること、毛細血管が擬似人工動脈とつながっていること、また毛細血管と蛍光ビーズが同じ場所にあることが確認された。経時的な 3D イメージングにより、擬似人工動脈と毛細血管の吻合が振盪培養中に達成されていることもわかった。

2.　振盪による細胞増殖と細胞外マトリックス分泌の活性化

スフェロイドの自己組織化に対する振盪培養の効果を調べた（簡単のために、スフェロイド原料として NHDF のみを用いた）。振盪せずに作製した組織ではスフェロイド様球状構造が残っており、壊死による細胞死が観察された（図 4a）。一方、振盪培養を行った試料では細胞死は見られず、細胞密度の高い強固な組織が形成された

（図 4b）。これらの結果から、振盪培養により酸素と栄養分がミリメートルオーダの距離を拡散し、細胞密度の高い組織内部に到達することが示唆された。スフェロイドの自己組織化に対する細胞遊走や増殖の影響を調べるため、RNA シークエンシングを行った結果、翻訳開始・細胞外マトリックス組織化・微小管束形成が振盪によって高発現していること、また振盪培養は細胞増殖と細胞外マトリックス（ECM）分泌を促進するが、細胞遊走にはあまり影響しないことを示した。

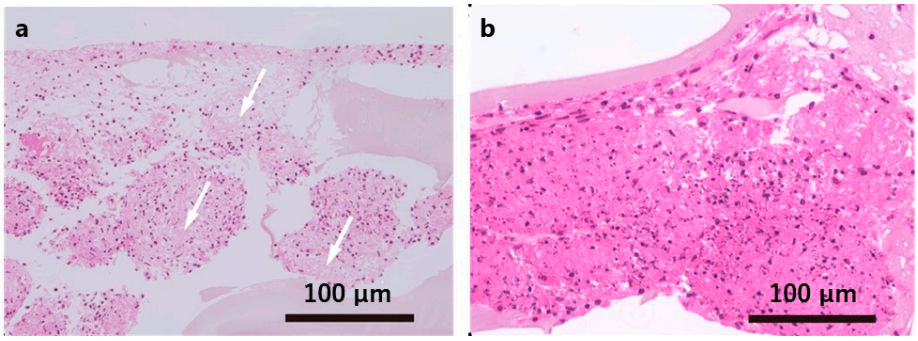


図 4. NHDF スフェロイドから作製した 3D 組織の H&E 染色写真

a）振盪なし。

b）振盪あり。

振盪なしの試料ではスフェロイド様球状構造中央部の核が染色されず細胞死が起こっている一方、振盪ありの試料では核が染色され、スフェロイド様球状構造を残さずに高細胞密度状態を達成できた。

その他、リアルタイム PCR 解析や免疫染色写真等の結果を総合すると、振盪により、酸素と栄養の供給だけでなく、細胞増殖と細胞外マトリクス分泌も促進されていることもわかった。

謝　辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院エネルギー科学研究科資源エネルギーシステム学分野教授の馬渕守である。また、本研究の顕微鏡観察や試料作製、各種解析の一部は、京都大学医学・生命科学研究支援機構、京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センターの共用設備・サポート制度を用いて行った。2022 年度公益財団法人上原記念生命科学財団によって支援されたことにも感謝申し上げる。

文　献

1） Hoang P, Ma Z. Biomaterial-guided stem cell organoid engineering for modeling development and diseases. Acta Biomater. 2021 Sep 15:132:23-36. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33486104 DOI: 10.1016/j.actbio.2021.01.026

2） Hsiao SK, Liang CW, Chang TL, Sung YC, Chen YT, Chen Y, Wang J. An in vitro fibrotic liver lobule model through sequential cell-seeding of HSCs and HepG2 on 3D-printed poly(glycerol sebacate) acrylate scaffolds. J Mater Chem B. 2022 Nov 30;10(46):9590-9598. PMID: 36106522 DOI: 10.1039/d1tb02686k

3） Jain P, Kathuria H, Dubey N. Advances in 3D bioprinting of tissues/organs for regenerative medicine and in-vitro models. Biomaterials. 2022 Aug:287:121639. Epub 2022 Jun 20. PMID: 35779481 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121639

4) Wu P, Asada H, Hakamada M, Mabuchi M. Bioengineering of High Cell Density Tissues with Hierarchical Vascular Networks for ex vivo Whole Organs. Adv Mater. 2023 Mar;35(9):e2209149. Epub 2023 Jan 1. PMID: 36545785 DOI: 10.1002/adma.202209149
5) Szklanny AA, Machour M, Redenski I, Chochola V, Goldfracht I, Kaplan B, Epshtein M, Yameen HS, Merdler U, Feinberg A, Seliktar D, Korin N, Jaroš J, Levenberg S. 3D Bioprinting of Engineered Tissue Flaps with Hierarchical Vessel Networks (VesselNet) for Direct Host-To-Implant Perfusion. Adv Mater. 2021 Oct;33(42):e2102661. 2021 Sep 12. PMID: 34510579 DOI: 10.1002/adma.202102661
6) Sphabmixay P, Raredon MSB, Wang AJS, Lee H, Hammond PT Fang NX, Griffith LG. High resolution stereolithography fabrication of perfusable scaffolds to enable long-term meso-scale hepatic culture for disease modeling. Biofabrication. 2021 Sep 21;13(4). PMID: 34479229 DOI: 10.1088/1758-5090/ac23aa
7) Grebenyuk S, Fattah ARA, Kumar M, Toprakhisar B, Rustandi G, Vananroye A, Salmon I, Verfaillie C, Grillo M, Ranga A. Large-scale perfused tissues via synthetic 3D soft microfluidics. Nat Commun. 2023 Jan 12;14(1):193. PMID: 36635264 PMCID: PMC9837048 DOI: 10.1038/s41467-022-35619-1