

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

マイクロ・ナノテクノロジーを用いた細胞組織構築のための培養皿の開発

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 福田 淳二

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
マイクロ・ナノテクノロジーを用いた 細胞組織構築のための培養皿の開発	----- 1
福田 淳二	
II. 分担研究報告	
肝細胞スフェロイドの肝不全ラットへの移植	----- 17
崎山 亮一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 19

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（総括）研究報告書

マイクロ・ナノテクノロジーを用いた細胞組織構築のための培養皿の開発
研究代表者 福田 淳二 筑波大学数理物質科学研究科

研究要旨

本研究では、電気化学的原理に基づき培養皿から細胞を素早く脱離する技術を確認することを目的としている。本研究課題の実施1年目である平成20年度は、ペプチドの設計と細胞脱離の評価、微細な金ワイヤーへの応用を検討し、本技術の有用性を示した。工学的アプローチにより確立する本技術は、研究開発用ツールとして、さらに再生医療の基盤技術として有望である。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

崎山 亮一・東京女子医科大 助手
岡村健太郎・筑波大学 研究員

A. 研究目的

タンパク分解酵素を用いる一般的な細胞回収法では、細胞同士の結合も切断されることから、構築した組織を回収し、再生医療へと応用することはできない。そこで現在、温度応答性ポリマーを修飾した培養皿が細胞シートの回収技術として注目され、臨床応用への積極的な展開がなされている。しかしながら、問題点として細胞脱着に50分以上の時間を要することや、アクリルアミドの毒性の問題が挙げられている。

本研究では、金表面に金-チオール結合に

より化学吸着した細胞接着ペプチドが電位印加により還元脱離する現象に着目し、培養皿から細胞シートや組織を非侵襲的かつ素早く脱離する技術の確立に取り組む。これまでに、アルカンチオール分子の自己組織化単分子膜（SAM）を金表面に形成した場合、-1.0V程度の比較的小さい電位を約5分間印加することにより、SAMの脱離に伴い接着細胞を完全に脱着できることを確認している。さらに予備検討において、この方法によって細胞シートを非侵襲的に回収し、積層化可能であることを示してきた。

本研究では両末端にシステイン、中央に細胞接着配列を持つペプチドを用い、システインのチオール基を金との結合に利用する。ここで、細胞の脱離時間は細胞シートの積層化プロセスにおいて重要であるが、この金-チ

オール結合は数秒で脱離が完了することから、原理的には素早い細胞脱着に適していると考えられる。そこで本研究では、培養皿表面の微細加工などの工夫を施し、cmサイズの細胞シートを数分以内に剥離可能な技術を確認する。

これまでに、電気化学的な原理に基づく細胞脱離技術の報告はなく、また本技術は温度応答性ポリマーのように特殊な電子線重合装置や技術を必要とせず、培地交換などの際に温度管理の必要性がないことから、安全性や操作性、さらに素早い細胞脱離が可能な優れた独創的技術となりうる。本研究では、電気化学的原理に基づく細胞操作技術の確立から、その技術を金ワイヤーに応用して血管構造を有する細胞組織を構築する。また、小動物実験により本細胞組織を利用した治療効果の検討を行う。以上により、本技術が再生医療の実用化に向けた有望な技術シーズであることを示す。

B. 研究方法

1. 細胞脱離挙動の評価

ここでは、RGDペプチドの脱離に必要な電位を測定するとともに、RGDペプチドの脱離に伴い細胞を脱着させることが可能かどうか検討した。

1.1 実験装置と試薬・材料

【装置】

- ・電気化学測定装置：AUTOLAB EN 55022 (Eco Chemie 製)
- ・スパッタ装置 (CFS-4ES, 芝浦メカトロニクス製)
- ・ダイシングソー (A-WD-10A, 東京精密製)
- ・ポテンシオスタット/ガルバナスタット (HA-151, 北斗電工製)
- ・位相差顕微鏡 (蛍光顕微鏡) (OLYMPUS 製)

- ・クリーンベンチ (三洋電機製)
- ・遠心分離機 (三洋電機製)
- ・インキュベータ (三洋電機製)
- ・超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)

【試薬・材料】

- ・パイレックスガラス基板 (No.7740 直径3inch 厚さ500 μm Corning製)
- ・アンモニア水 (和光純薬工業製)
- ・過酸化水素水 (和光純薬工業製)
- ・塩化カルシウム (和光純薬工業製)
- ・塩化マグネシウム・六水和物 (和光純薬工業製)
- ・HEPES (和光純薬工業製)
- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・水酸化ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化カリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化水素 (和光純薬工業製)
- ・エタノール (関東化学製)
- ・血管内皮細胞用増殖培地 EBM-2・添加因子セット (Table 1、三光純薬製)

Table 1 EBM-2・添加因子

試薬	培地組成
Heparin	0.5 ml
Hydrocortisone	0.2 ml
アスコルビン酸	0.5 ml
hEGF	0.5 ml
FBS	10 ml
VEGF	0.5 ml
hFGF-B	2 ml
R3-IGF-1	0.5 ml
GA-1000	0.5 ml
ゲンタマイシン	50 mg/ml
アンホテリシン	50 μg/ml

- ・リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Saline：PBS (GIBCO製)

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC (理研 Cell bank)
- ・Cell Matrix Type I-A (新田ゼラチン製)
- ・Ham-F12 培地 (Powder, GIBCO製)
- ・RGD ペプチド (配列 : CCRRGDWLC) (SIGMA製)
- ・培養用ディッシュ(Φ10 cm, 6 cm, 3.5 cm) (TPP製)

1.2 実験方法

1.2.1 RGDペプチド修飾-金チップ作製の作製手順

(1) 洗浄

ガラス基板と25%アンモニア水 : 30%過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 4の沸騰水溶液に5分間浸漬させ、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

(2) Au/Cr層のスパッタリング

スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。

※基板に細胞を播種した場合に位相差顕微鏡で細胞を観察できるように、スパッタリング時間を短くし、金膜を薄く形成するよう工夫した。

(3) ダイシング

Au/Cr層をスパッタしたガラス基板をダイシングソーにてダイシングした。チップサイズは、縦15 mm × 横 10 mmとした。

(4) RGDペプチドの修飾 (Fig. 1)

純水を用いて1.0 mMに希釈したRGDペプチド溶液に、予めアセトンで洗浄した金チップをそれぞれ一晩浸漬させた後、純水で洗浄した。

更に細胞を播種する場合は、クリーンベンチ内で70%エタノール内に5分間浸漬を二回行

い、滅菌した純水でよくすすぎ、使用するまで純水中に保存した。

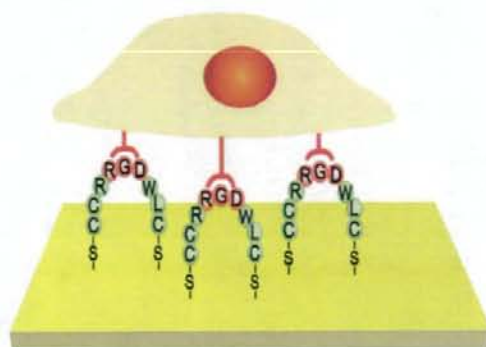


Fig. 1 RGD ペプチド接着細胞



Fig. 2 三電極系および電気化学測定装置

1.2.2 サイクリックボルタンメトリー (CV) によるRGDペプチド還元脱離電位測定方法

電気化学測定装置AUTOLABに、作製したRGDペプチド修飾チップを作用極に、銀/塩化銀電極 (内部溶液 : 飽和KCl) を参照極に、白金板を対極に接続して、三電極系で測定した (Fig. 2)。電解質溶液には、溶存酸素を除去するために15分間窒素バブリングをした0.5MのKOHを用い、下記の条件で電気化学測定を行った。

開始電圧・・・ -0.3 V
 最大掃引電圧・・・ -0.3 V
 最小掃引電圧・・・ -1.0 V
 掃引速度・・・ 20 mV/sec

1.2.3 電位印加の時間変化に対する細胞脱離評価手順

(1) 細胞播種

作製したRGD修飾チップを細胞培養用ディッシュに数枚入れ、下の条件に揃えて、血管内皮細胞用増殖培地EBM-2で血管内皮細胞 (HUVEC) が均一になるように播種し、37°C、5%CO₂-Airのもとで一晩インキュベーションした。

Table 2 細胞培養条件

ディッシュ直径 (cm)	播種密度 (cells/dish)	培地量 (ml)
3.5	1.5×10^5	2
6	$2.5 \sim 3.0 \times 10^5$	6

(2) 電位印加

ポテンシostatを用いて、細胞が接着したチップを作用極に、銀/塩化銀電極 (内部溶液: 飽和KCl) を参照極に、白金板を対極に接続し、支持電解液としてPBSにカルシウムイオンとマグネシウムイオンを溶かした溶液 (PBS+) をビーカーに入れ、三電極を構成した (Fig. 3)。この状態で、-1.0 Vを印加し、印加時間をストップウォッチで計りながら行った。印加時間は最大7分間とし、その間に細胞の様子を観察するとともに細胞数をカウントした。

(3) 位相差顕微鏡で画像撮影

電位印加時間0, 1, 2, 3, 5, 7分に対して、その都度チップを取り出し、PBS+で満たした

φ3.5 cmディッシュに浸した。そして、各チップにおいてFig. 3のように計数範囲を三箇所 (各面積2.3 mm²) 決め、位相差顕微鏡で事前にチップに付けた印 (キズ) を目印に、できる限り同じ箇所を撮影した。



Fig. 3 三電極系とチップ計数範囲

(4) 細胞計数

撮影した画像をプリントアウトし、面積2.3 mm²の範囲で細胞数を計測した。接着細胞は伸展細胞のみとし、電位により完全に丸まった細胞は剥がれた細胞としてカウントした。

(5) 細胞脱離の時間変化

各チップの印加時間毎に計数した三箇所の合計を出し、印加時間0 minを基準の100%として、脱離細胞割合を導出した。これを3チップ間で平均して、縦軸: 細胞脱着割合 (%), 横軸: 印加時間 (min) のグラフにプロットした。また各印加時間において、3チップ間の脱離細胞割合の標準偏差により、偏差を計算し、再現性を考慮して結果を表示した。

(6) ネガティブコントロール

ネガティブコントロールとして、RGDペプチドを修飾せず、-1.0 Vの電位を印加した場合、RGDペプチドを修飾し、金-チオー

ル結合の脱離電位に満たない-0.5 Vの電位を印加した場合の二条件に対して、上記(1)～(5)の同様の実験を行い、比較した。

1.2.4 コラーゲンゲル内での細胞脱離評価

(1) 細胞播種

作製したRGD修飾チップを細胞培養用ディッシュに数枚入れ、Table 2の条件に揃えて、血管内皮細胞用増殖培地EBM-2で細胞(HUVEC)が均一になるように播種し、インキュベータ内で37°C、5%CO₂-Airのもとで、80%コンフルエントになるように一晚培養した。

(2) 銀/塩化銀線作製

コラーゲンゲル内で正確に電位印加するために、二電極系の参照極となる銀/塩化銀線を作製した。

1) 試薬調製・・・1 M KCl溶液を作り、HClを加え、pH 2.2にした。

2) 銀線をエメリーペーパーなどで研磨し、適当な長さに切断した。

3) ガルバノスタットに三電極を接続し、ピーカー内の上記1)の調製試薬に浸した。ただし、作用極には銀線、参照極には銀/塩化銀電極(内部溶液:飽和KCl)、対極には白金板を接続した。

4) ガルバノスタットを用いて、電流値0.5~0.6 mAを5分間流し、銀/塩化銀線を作製した。

(3) コラーゲンゲル調製

以下のA、B、Cの溶液を用意し、氷中に冷却した。

A: 0.3% Cellmatrix Type I-A

B: 10倍濃度の濃縮培地(粉末のHam-F12 培地をミリQ超純水に溶解し、濾過滅菌して使用した。)

C: 再構成用緩衝液(0.05N水酸化ナトリウ

ム溶液100 mlに対し、炭酸水素ナトリウム2.2 g、HEPES 4.77 gを溶かし、濾過滅菌して使用した。)

そして、低温に保ったまま、A、B、C液を8:1:1の割合で混合した。ここで、まずA液とB液を均一になるようにゆっくりピペッティングしながら全体が薄黄色になるまで攪拌する。つぎにC液を加え、同じくピペッティングしながら、全体が均一のピンク色になるまで攪拌する。気泡の混入に注意する。

この混合液を、インキュベータで37°C、5%CO₂-Airのもとで15分間置くと、ゲル化することを確認した。

(4) 細胞脱離評価

1) 細胞で覆われたチップ上に、コラーゲン混合液を滴下し、インキュベータ内でゲル化させた。この時、インキュベート時間を15分と60分で実験を行った。

2) ポテンシオスタットの作用極をチップに、参照極(参照極+対極)を銀/塩化銀線に接続した。

3) 電位-1.0 Vを5分間印加した。

4) ピンセットでチップからゲルを剥がし、チップ上の細胞とゲルに転写された細胞を位相差顕微鏡で観察した。

5) コラーゲンゲルに転写された細胞をFDA/EB染色により、生死評価した。まず、ゲルをφ3.5 cmディッシュ内で、PBS+を用いて洗浄をし、FDA/EB混合染色液に浸し、インキュベータ(37°C、5%CO₂-Air)で10分間置いた。その後、FDA/EB染色液を捨て、PBS+で洗浄を三回行った。更に、PBS+にゲルを浸して、蛍光顕微鏡で観察し、生死評価を行った。

6) ネガティブコントロールとして、電位印加せずにゲルを剥がしたときの細胞の脱離数、生死染色を観察し、電位印加した場合と

比較した。

2. 金ワイヤー血管様構造の作製

ここでは、RGDを修飾した金ワイヤーに細胞を接着させるために、培養ディッシュ内で細胞播種する段階から、血管様構造を形成させるまでの手順を示した (Fig. 4)。

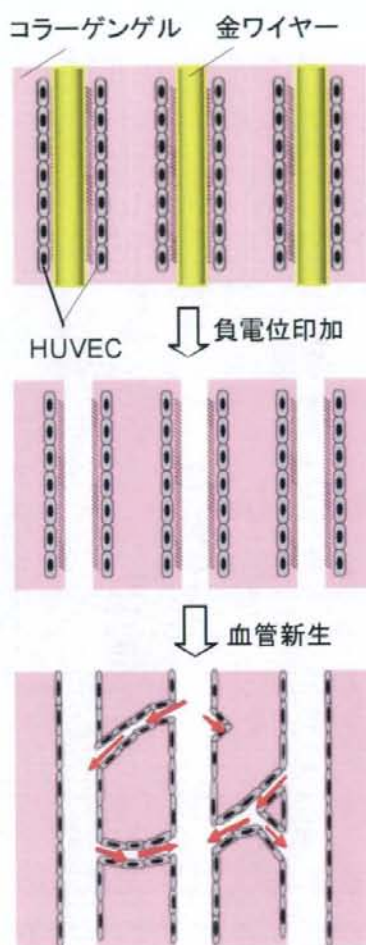


Fig. 4 血管様構造の作製

2.1 実験装置と試薬・材料

【装置】

・スパッタ装置 (CFS-4ES, 芝浦メカトロニクス製)

- ・ダイシングソー (A-WD-10A, 東京精密製)
- ・ポテンショスタット/ガルバノスタット (HA-151, 北斗電工製)
- ・位相差顕微鏡 (蛍光顕微鏡) (OLYMPUS製)
- ・クリーンベンチ (三洋電機製)
- ・遠心分離機 (三洋電機製)
- ・インキュベータ (三洋電機製)
- ・超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)
- ・真空デシケータ (VR, アズワン製)
- ・真空ポンプ (DTC-21, ULVAC製)
- ・電子顕微鏡 ED-SEM (日本電子)
- ・シリンジポンプ (アズワン製)
- ・マイクロシリンジ (5 ml, テルモ製)

【試薬・材料】

- ・パイレックスガラス基板 (No. 740 直径3 inch 厚さ500 μm Corning製)
- ・ガラスキャピラリー (容量0.5, 3, 20 μl 長さ3.2 cm ドイツ製)
- ・アンモニア水 (和光純薬工業製)
- ・過酸化水素水 (和光純薬工業製)
- ・塩化カルシウム (和光純薬工業製)
- ・塩化マグネシウム・六水和物 (和光純薬工業製)
- ・HEPES (和光純薬工業製)
- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・水酸化ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化カリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化水素 (和光純薬工業製)
- ・エタノール (関東化学製)
- ・オスミウム水溶液 (0.1%, TAAB)
- ・t-ブチルアルコール (和光純薬工業製)
- ・Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit : DiI solutions (invitrogen製)
- ・ポリジメチルシロキサン前駆体(PDMS) (KE-1300T, 信越化学工業製)
- ・PDMS硬化剤 (CAT-1300, 信越化学工業)

製)

- ・ Glutaraldehyde Solution (Fluka製)
- ・ リン酸緩衝液 : Phosphate Buffered Saline : PBS (GIBCO製)
- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC (理研 Cell bank)
- ・ Cell Matrix Type I-A (新田ゼラチン製)
- ・ Ham-F12 培地 (Powder, GIBCO製)
- ・ RGD ペプチド (配列 : CCRRGDWLC) (SIGMA製)
- ・ 培養用ディッシュ (Φ 10 cm, 6 cm, 3.5 cm) (TPP製)
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地 EBM-2・添加因子セット (三光純薬製)

2.2 実験方法

2.2.1 金ワイヤー作製と細胞培養の操作手順

(1) 洗浄

ガラスキャピラリー (容量0.5, 3 μl) をPDMS製の固定用台に20本前後差込み固定する。その状態で、25%アンモニア水 : 30%過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 4の沸騰水溶液に5分間浸漬させ、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

(2) Au/Cr層のスパッタリング

スパッタリング装置を用い、PDMS固定台に固定したままスパッタ層の中央部にポリイミドテープで固定し、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。※細胞の状態を位相差顕微鏡で観察できるように、スパッタリング時間は比較的短く設定している。

(3) RGDペプチドの修飾

純水を用いて1 mMに希釈したRGDペプチド溶液に、予めアセトンで洗浄した金ワイヤーをそれぞれ一晚浸漬させた後、純水で洗

浄した。

(4) 細胞の播種・培養

RGDペプチド修飾した金ワイヤーをクリーンベンチ内で、70%エタノール (5分浸漬×2)、滅菌水の順に洗浄し、φ3.5 cmディッシュに1ディッシュ当たり4~5本並べて配置した (Fig. 5)。そしてHUVECを培地2 mlに細胞密度 3.0×10^5 cells/dishを懸濁し播種した。それを数日間、インキュベータ内で37°C、5%CO₂-Airのもとで培養した。

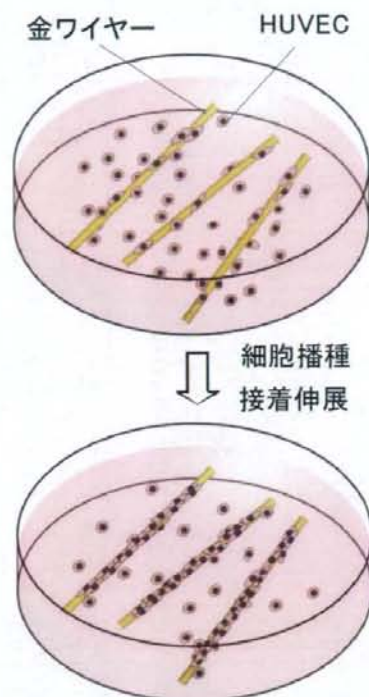


Fig. 5 金ワイヤーへの細胞播種

2.2.2 電子顕微鏡ED-SEMによる組織観察手順

HUVECが金ワイヤーの周囲を覆っているのかを確認するために、培養日数3~4日間の金ワイヤー周囲の細胞を、電子顕微鏡 (ED-SEM) を用いて観察した。

(1) 組織の固定

・前固定

2%パラホルムアルデヒド溶液と2.5%グルタルアルデヒド溶液/0.1 M buffer(pH7.4)を混合し、PBS+で洗浄した金ワイヤーを室温で1時間浸漬した。

・後固定

1%オスミウム水溶液 (OsO₄) / 0.1 M buffer(pH7.4)に金ワイヤーを4°Cで1時間浸漬した。

(2)脱水処理

金ワイヤーをエタノールに浸漬し、エタノール濃度30, 50, 70, 90%(on ice, 5min)の順に脱水処理した。最後に100%エタノール(室温, 5min×3)に置換した。

(3)凍結乾燥

t-ブチルアルコール溶液に置換し、4°Cで凍結させる。次に、真空デシケータを用いて、t-ブチルアルコール溶液を凍結させたまま乾燥させた。

(4)電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡で金ワイヤー周囲の細胞観察を行った。

(5)分析

金ワイヤーを細胞が覆うのに要する培養日数の確認や細胞同士の連結の様子を確認した。

2.2.3 血管様構造の作製

血管代替の流路を作製するために、HUVECで覆われた金ワイヤーとコラーゲンゲルを用いて、PDMS容器の中で血管様構造を作製することを目指した。

(1) 銀/塩化銀線作製

・コラーゲンゲル内で電位印加するために、三電極系の参照極となる銀・塩化銀線を作製した。

1) 試薬調製・・・1 M KClを作り、HClを加

え、pH 2.2に調整した。

2) 銀線をエメリーペーパーなどで研磨し、適当な長さに切った。

3) ガルバノスタットに三電極を接続し、ビーカー内の試薬に浸した。

【作用極：銀線、参照極：銀/塩化銀電極(内部溶液：飽和KCl)、対極：白金板】

4) ガルバノスタットを用いて、電流値0.5~0.6 mAを5分間流し、銀・塩化銀線を作製した。

(2)コラーゲンゲル調製

1) 準備：以下のA、B、Cの溶液を用意し、氷中で冷却する。

A：0.3% Cellmatrix Type I-A

B：10倍濃度の濃縮培地

・粉末のHam-F12 培地をミリQに溶かし、濾過滅菌して使用。

C：再構成用緩衝液

・0.05N水酸化ナトリウム溶液100 mlに対し、炭酸水素ナトリウム2.2 g、HEPES 4.77 gを溶かし、濾過滅菌して使用。

2) 調製：冷却しながら、A、B、C液を8：1：1の割合で混合する。

まず、A液とB液を均一になるようにゆっくりピペティングしながら攪拌し、全体が薄黄色になったら、更にC液を加え、同じくピペティングしながら、全体が均一のピンク色になるまで攪拌する。

3) 混合とゲル化：この混合液を、インキュベータで37°C、5%CO₂-Airのもとで15分間置くと、コラーゲンがゲル化する。

(3) マイクロチャンバーの作製

HUVECで覆われた金ワイヤーをコラーゲンゲル内で引き抜きその後の血管伸長を観察するための培養マイクロチャンバーを作製した。このチャンバーはPDMSとアクリル

板の鋳型を用いて作製した。

1) PDMS前駆体に硬化剤を10 : 1の割合で加えて混合し、真空デシケータに入れ、真空ポンプで脱泡した。

2) 混合したものをアクリルの鋳型に流し込み、真空デシケータ内で空気が抜けるまでポンプによる脱泡を繰り返した。

3) アクリル鋳型に入った状態で、80°Cオーブンで25~30分間BAKEし、PDMSを硬化させた。

4) 作製したPDMS容器の中央の壁をカッターできれいに切り取った。

5) 更に両壁に、短くカットした容量20 μ lのガラスキャピラリーを差し込んで固定した。これは金ワイヤーをPDMS容器に固定するために取り付けた。

この容器をクリーンベンチ内で70%エタノール、滅菌水の順に洗浄して乾燥させた。

(4) 血管様構造の作製手順 (Fig. 6)

1) 培養中の金ワイヤーを培養チャンパー両末端のガラスキャピラリーを通して固定した。

2) コラーゲン溶液を培養チャンパーへ流し込み、インキュベータ (37°C、5%CO₂-Air) に15分間入れ、ゲル化させた。

3) ゲル化後、銀/塩化銀線および白金板をゲル内に差し込み、ポテンショスタットの作用極を金ワイヤーに、参照極を銀/塩化銀線に、対極を白金板に接続し、電位-1.0 Vを5分間印加した。

4) 印加後、金ワイヤーを真っ直ぐ引き抜き、位相差顕微鏡で血管様構造形成を確認した。

5) 培養チャンパーを ϕ 3.5 cmディッシュに入れ、作製した血管様構造構造に培地が行き届くように培地で満たし、ゲルが蒸発しないように培養チャンパー上面にカバーガラスでフタをし、数日間培養した。

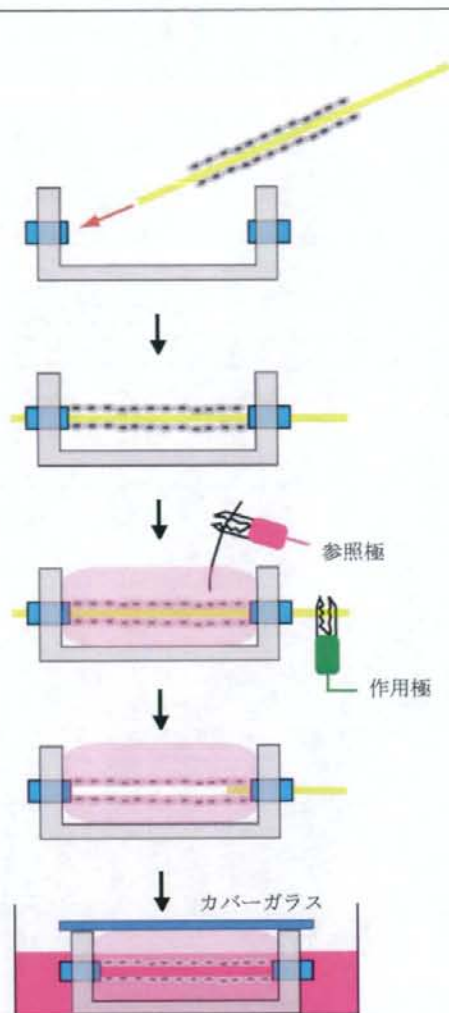


Fig. 6 マイクロチャンパー内におけるコラーゲンゲル内への血管様構造作製

2.2.4 Cell-Labeling染色による管腔評価

構築した管腔構造を評価し易くするために、予めCell-Labeling染色したHUVECを用いて、前節と同様に管腔構造を構築し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

・試薬 : Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit ; DiI solutions...Es* (最大吸収波長) : 549 nm、Em* (最大蛍光発光波長) : 565 nm

1) 培地からサンプルを取り出し、余分な培

地を慎重に吸い取る。

2) 培地1 mlに対し、Dil solutionを5 μ lを加えて攪拌し、染色液を準備する。

3) サンプルに染色液を滴下し、全体に行渡らせる。

4) 20分間インキュベート (5%CO₂-Air、37°C) する。

※この染色最適時間は細胞によって異なり、HUVECは20分で染色されることを確認した。

5) 染色液を捨て、予め37°Cに温めておいた培地を加え、10分間インキュベートする。

6) この操作を三回繰り返し、洗浄する。

7) サンプルを培地または、PBSで満たし、蛍光顕微鏡で観察する。

2.2.5 送液培養による分岐流路の伸展

作製した血管用構造内に、血管新生促進因子 (VEGF) を含有した培地を送液することで管腔構造 (分岐流路) の伸展を促した。

<送液培養条件>

- ・ 5 mLマイクロシリンジ使用 (シリコンチューブ接続)
- ・ flow rate : 10 μ L/min
- ・ インキュベータ内 (37°C、5%CO₂-Air) で48h培養
- ・ 8hおきにシリンジ交換 (培地補充)

<せん断応力>

作製した血管様構造にかかるせん断応力: τ について条件を以下の公式に当てはめて計算する。

$$\tau = \mu \cdot 6Q / \pi \cdot r^3$$

τ : せん断応力 [mPa]

μ : 粘度[mPa · s]

Q : 流量 [μ L/s]

r : 流路の内径 [mm]

※生体内の毛細血管に付加されるせん断応力は、1~5 dyn/cm² (100~500 MPa)

C. 研究結果と考察

3. 電気化学的細胞脱離の検討

3.1 CVによるRGDペプチド還元脱離電位測定

RGDペプチドを修飾した金表面に電位を走査し、分子の還元脱離に伴う電流値の変化 (サイクリックボルタモグラム、CV) をを Fig. 7に示した。RGDペプチド修飾チップでは、-0.3 V~-1.0 Vの範囲で走査速度20 mVで掃引したところ、-0.86 V付近で鋭いピークが確認された。この電流ピークは、負電位の印加により金チップ表面でRGDペプチド両末端のシステインが有するチオール基が還元脱離し、その脱離に伴い還元電流が生じたために発生する。このような分析手法がよく用いられる自己組織化単分子膜 (SAM) の研究では、10-Carboxy-1-decanethiol修飾金電極で同様にCVを測定したところ、-0.85 V付近にピークが観察されるという報告がある。SAMの性質として、還元ピークの位置は自己組織化単分子膜の安定性、つまりアルカン

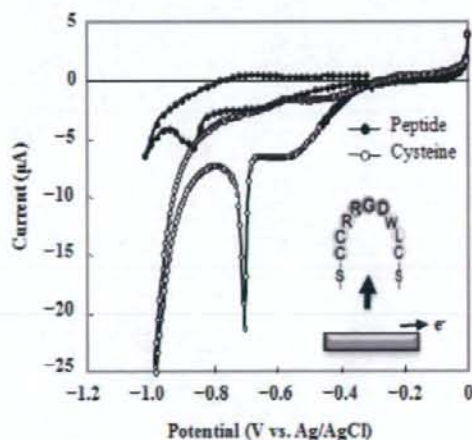


Fig. 7 RGD ペプチド修飾電極のサイクリックボルタモグラム

チオールアルキル鎖長 n の長さに依存することがわかっている。これは分子同士のファンデルワールス力がアルキル鎖長が長いほど大きくなり安定するからである。今回使用した配列のRGDペプチドは、アルキル鎖10のアルカンチオールと同程度の還元電位を持つため、一概には言えないが、同等の安定な分子膜層が形成されていることが示唆された。

尚、バックグラウンドとして、 -0.7 V より負電位側で、負が大きくなるにつれ負電流が増加しているのがわかるが、これは電解溶液中に溶存する物質が金チップ表面上で還元され水素を生成する反応が起こっているからである。細胞を用いる際には、この反応におけるpH変化が細胞へ及ぼす影響を評価する必要がある。

いずれにしても、この実験結果より、RGDペプチドをチップから脱離させるには、 -1.0 V の電位を印加すれば十分であることがわかった。

3.2 電位印加の時間変化に対する細胞脱離評価

RGDペプチドに細胞を接着させたチップを用いて、PBS+中で -1.0 V と -0.5 V の電位を印加した際の細胞脱着の写真をFig. 8に示した。また、電位印加時間毎の細胞脱着の様子と定量的に評価した結果をそれぞれFig. 9とFig. 10に示した。

Fig. 8から、RGDペプチドの還元脱離ピーク電位以上または以下の電位を印加した場合に、細胞脱離に明らかな差が見られることがわかった。次に、Fig. 9より細胞脱離プロセスについて、伸展している周辺部から中央に引き寄せられるように収縮していることが分かった。



-1.0 Vの電位印加前と印加5分後



-0.5 Vの電位印加前と印加5分後

Fig. 8 細胞脱離の印加電位依存性

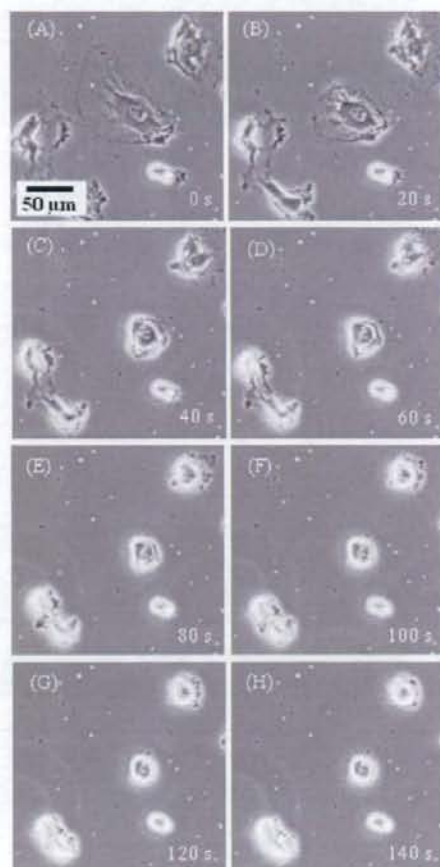


Fig. 9 細胞脱離の継時変化

細胞の中心位置が大きく変化していないことから、ペプチドの脱離は細胞膜の電気抵抗が少ない周辺部から生じ、シュリンクしながら脱離が連続的に生じているものと予測された。このことから、Fig. 7に示したように、RGDペプチドの脱離は数秒以内に生じるにも関わらず、細胞の脱離が分のオーダーである原因は細胞膜の電気抵抗である可能性が示唆された。

Fig. 10に細胞脱離における細胞数の定量的評価を行った結果を示した。RGDペプチドを修飾したチップで-1.0 Vを印加した場合は、印加時間3分で90%近い細胞が脱離し、その後グラフはほぼ横這いとなった。つまり、細胞は印加開始3分程度でほぼ全て脱離することがわかる。また-0.5 Vを印加した場合やペプチドを介さず直接細胞を金の表面に接着させた場合では、7分後までほぼ横這い状態が続き、細胞がほとんど脱離しないことが示された。約20%のわずかな細胞が脱離しているが、これは溶液の交換や非特異吸着した分子の脱離に伴って脱着したものと考えられる。いずれにしても、この結果から細胞がRGDペプチドの還元脱離に伴って効率的に脱離できることが示された。

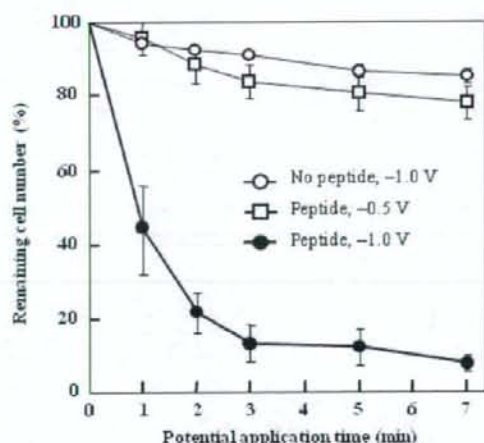


Fig. 10 細胞脱離の経時変化

3.3 コラーゲンゲル内での細胞脱離評価

チップ上の細胞をコラーゲンゲルで覆い、ゲル内にて三電極系で電位印加したときの細胞の脱着挙動を評価した。本実験では、Fig. 11に示したように、インキュベート15分後（コラーゲンのゲル化直後）の細胞脱離と、インキュベート60分後の細胞脱離挙動を観察した。これは、コラーゲン混合液がゲル化するのに要する時間が10~15分であるため、ゲル化直後に電位をかけて細胞を脱離させる場合と、細胞がコラーゲンゲルに接着する時間を与えた場合の細胞の脱離の様子を比較するためである。

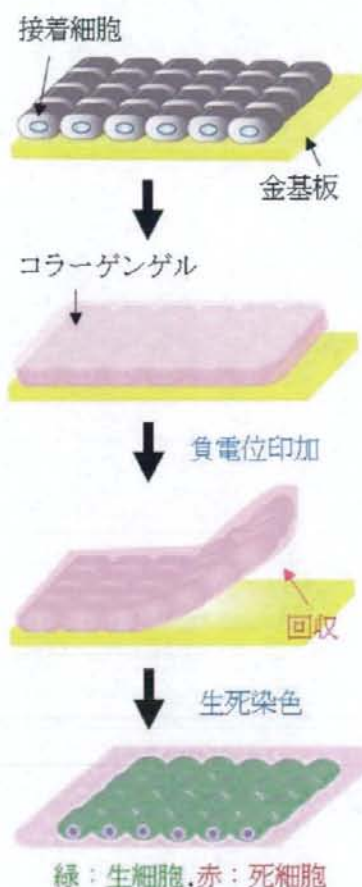
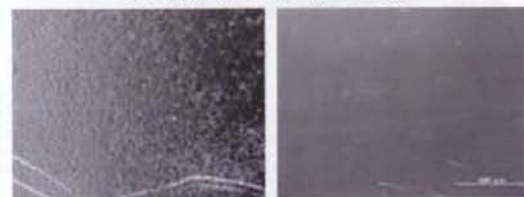


Fig. 11 コラーゲンゲルを支持層とした電位印加による細胞回収

Fig. 12より、ゲル化直後に電位印加した場合でも、ゲル化後時間を置いてから電位印加した場合でも、差がなく細胞がきれいに剥がれたことがわかる。またFig. 13の電位印加無しでゲルを剥がした場合に細胞の脱離がほとんど見られなかった。



ゲル化時間15分後の脱離



ゲル化時間60分後の脱離

Fig. 12 コラーゲンを支持層とした場合の細胞脱離前後の基板表面の様子



ゲル剥離前 ゲル剥離後

Fig. 13 コラーゲンゲル剥離の細胞脱離に及ぼす効果

Fig. 14では、ゲルに転写された細胞をFDA/EB（生死）染色したところ、電位印加有無に関わらず死細胞はわずかし確認されなかった。電位を印加していない場合は、培養表面に存在する死細胞がゲルに転写されるため、死細胞が観察されたが、その数は

電位印加の有無に依らなかった。以上の結果より、細胞の脱離にはコラーゲンゲルのみでは不可能であること、電位印加との組み合わせによって細胞の位置を保存したままコラーゲンゲル側に転写可能であることを示した。特に、コラーゲンゲル内でも電位印加に問題はなく、その電位印加による細胞への影響はほとんどないことが実証された。

また、チップから電位印加により脱離した細胞を含むコラーゲンゲルを培地（EBM-2）中でインキュベータ内（37℃、5%CO₂-Air）で一晩培養した後の細胞の様子をFig. 15に示した。写真に見られるようにゲル内でHUVECは増殖し血管様構造を自発的に形成するという本来の性質が現れている。これより、電位印加は細胞の性質（少なくとも管腔構造の形成）に影響を与えないことが示された。

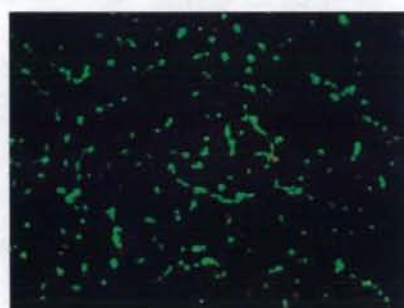


Fig. 14 コラーゲンゲル層に脱離転写したHUVECの生死染色蛍光写真

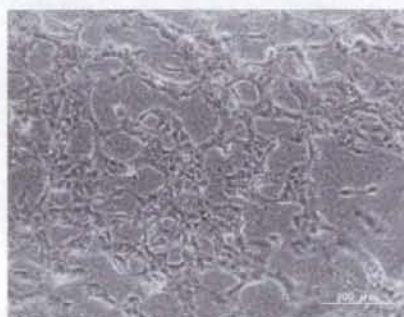


Fig. 15 コラーゲンゲル支持層に脱離転写したHUVECの増殖と管腔形成

3.4 金ワイヤー周囲の細胞接着評価

RGDペプチドを修飾した金ワイヤー表面へ細胞を接着させ、伸展・増殖して周囲を覆うかどうかを検討した。HUVECを播種してから金ワイヤーを覆うまでの日数を調べるために、培養3~4日後の金ワイヤーを電子顕微鏡(ED-SEM)を用いて観察した。

その結果、直径500 μm の金ワイヤー周囲を均一に接着伸展している様子が観察された。

(Fig. 16) 拡大写真を見ると、細胞同士が密に配置されていることがわかる。これより細胞非接着性培養ディッシュを用いれば、HUVECが選択的に金ワイヤーに接着し、モノレイヤーを形成することが確認された。更に、培養日数は播種してから3、4日間程度でよいことが示された。

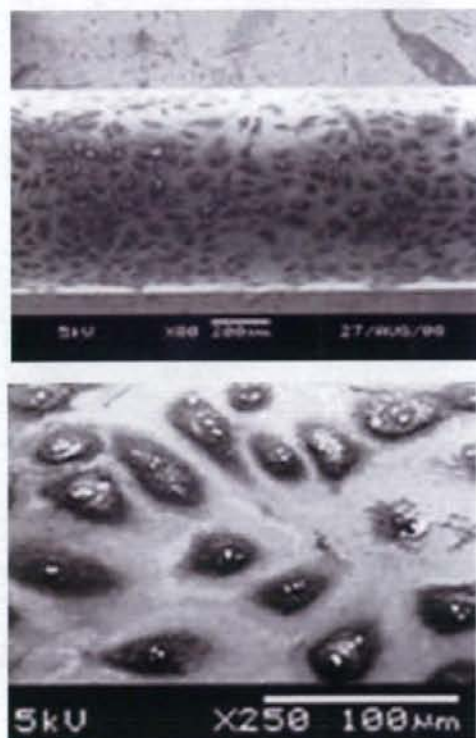


Fig. 16 金ワイヤー上で接着・伸展したHUVECのSEM写真

3.5 血管様構造の形成と細胞の脱離評価

3~4日培養した金ワイヤーを用いて、血管様構造の作製を行った。この実験では、金ワイヤーをゲルから正確に水平に引き抜くための工夫として、PDMSチャンバーの両端にガイドとなるキャピラリーを固定した。これにより、スムーズな金ワイヤーの脱着が可能となった。金ワイヤーを引き抜いた直後は細胞が金ワイヤーから脱離し丸くなった状態であるため、培地で満たして数時間インキュベートした。すると、全長16 mmの内壁が均一な細胞一層からなる血管様構造が確認された。(Fig. 17)

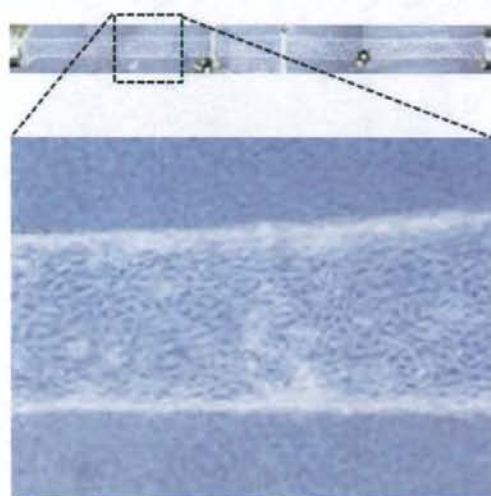


Fig. 17 コラーゲンゲル内に形成された内腔をHUVECで覆われた血管様構造

3.6 Cell-Labeling染色による血管様構造評価

予め金ワイヤーに接着した細胞を蛍光染色しておくことで、コラーゲンゲル内に血管様構造を構築した後に、内腔を覆っている細胞の様子を蛍光観察した。今回用いたDiI染色は、蛍光顕微鏡で細胞が赤く染まって見えるものである。

Fig. 18より、蛍光染色された細胞が内腔を覆っているのが観察された。ただし、ゲル内

の観察であるため、バックグラウンドが高く、またコラーゲンゲルの調製において微小気泡の混入が生じることから、観察手法および調製手順について、改善する必要があることが示された。今後、より高強度の蛍光を観察可能なようにあらかじめ細胞へ蛍光タンパク遺伝子を導入することを検討している。

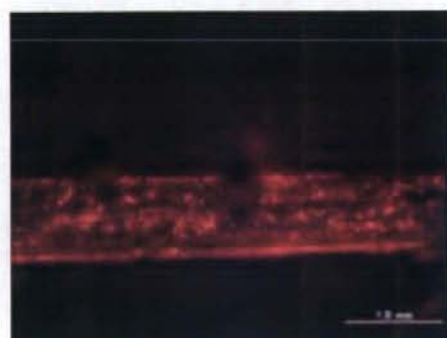


Fig. 18 血管様構造の蛍光顕微鏡写真

3.7 送液による内皮細胞の配向性と管腔の伸長

作製した血管様構造に内皮細胞増殖促進因子 VEGF を含んだ培地をシリンジポンプで送液することで培養した。すると、送液開始 6h で内壁を覆っている細胞が流れ方向に沿って配向性を示した。(Fig. 19)

更に送液を続けると、管腔構造が伸展し始め、多数の分岐流路が形成され、送液開始 48 時間後には、最大約 500 μm の伸展が観察された。(Fig. 20) このことから、送液によって細胞がゲル側に管腔を伸展していくことがわかり、この手法を用いると、500 μm 程度の間隔で配置した血管様構造が、48 時間程度の送液によってお互いに連結することが示唆された。

作製した血管様構造の内径が約 500~600 μm であったことからせん断応力を計算すると、約 0.2 dyn/cm^2 となり、生体内の毛細血管を流れる血液の約 10 分の 1 のせん断応力が付加されていることがわかった。今後、より生体内に近い環境を *in vitro* で実現するために、マイクロチャンバーなどの構造を

検討し、より生体に近いせん断応力の負荷が可能なデバイスを作製し、評価していきたい。



送液培養前



送液培養後

Fig. 19 送液による HUVEC の配向



Fig. 20 血管様構造からの管腔の伸長

D. 結論

本研究課題 1 年目にあたる平成 20 年度は、RGDペプチドの設計とその電気化学的な脱離特性の評価を行った。そして、本研究課題の基盤技術となる RGDペプチドを介した細胞接着と電気化学的脱離が可能であることを示した。さらに、本手法を金ワイヤーに応用し、コラーゲンゲル内に血管様構造を作

製し、管腔構造が伸展する様子を示した。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers for Engineering Cellular Tissues, R. Inaba, A. Khademhosseini, H. Suzuki, J. Fukuda, *Biomaterials*, in press

2. 学会発表

国際学会

1. Electrochemical Cell Detachment and Its Application for Engineering Tissue Constructs with Capillary Structure, S. Seto, R. Inaba, H. Suzuki, J. Fukuda, Oral, TERMIS-AP 2008, Taiwan

2. Micropatterned cell co-cultures on three extracellular matrix components, S. Takahashi, R. inaba, H. Yamazoe, H. Suzuki, J. Fukuda, Poster, The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, Japan

3. Engineering Two- and Three-dimensional Cellular Aggregates by Electrochemical Reaction, R. Inaba, H. Suzuki, J. Fukuda, Oral, MRS Fall Meeting 2008, Boston, USA

国内学会

1. 電気化学的原理に基づくティッシュ・エンジニアリング、福田淳二、稲葉里奈、瀬戸祐希、鈴木博章、第7回日本再生医療学会

2. 毛細血管を有する三次元組織体構築のための基礎検討、瀬戸祐希、稲葉里奈、岡村健太郎、鈴木博章、福田淳二、化学工学会第40回秋季大会

3. 血管新生能評価用マイクロデバイスの開発 亀岡典哲、稲葉里奈、瀬戸祐希、鈴木博章、福田淳二、化学工学会第74年会

4. 電気化学的な細胞脱離を利用した細胞組織の構築、福田淳二、稲葉里奈、瀬戸祐希、鈴木博章、化学工学会第74年会

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

(特許取得予定) 培養方法及び培養装置、特願2007-145786、出願日：平成19年(2007年)5月31日、出願人：筑波大学、発明者：福田淳二、鈴木博章、稲葉里奈、岡村健太郎

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（分担）研究報告書

肝細胞スフェロイドの肝不全ラットへの移植
研究分担者 崎山 亮一 東京女子医科大学臨床工学科

研究要旨

本研究では、スフェロイド培養皿から得られた粒径の均一な肝細胞スフェロイドアレイを肝不全動物へ移植し、スフェロイド内の肝細胞の生存状態などから、移植用組織として有用であることを示した。

A. 研究目的

開発したスフェロイド培養皿上で形成させた細胞組織体が再生医療分野において有用であることを示すために、電位印加により肝細胞スフェロイドを一括して回収後、アンモニア代謝機能を評価するとともに、外科的に肝不全としたラットに移植してスフェロイドの生存状態を評価した。来年度の動物実験に向けた予備的検討として位置づけている。

B. 研究方法

1) スフェロイドをそのまま脱離させると互いに凝集し、巨大な細胞凝集体となり内部で酸素枯渇による壊死が生じる。そこで、脱離前にコラーゲンゲルで全体を包埋し、電位印加によりアレイ状態のスフェロイドを回収した。電位印加は、定電位-1.0 Vを5分間印加した。

2) コラーゲンゲルへ転写・回収したスフェロイドを12穴ディッシュの各ウェルに入れ、1 mMのアンモニアを添加した培地中で培養して、その代謝速度を評価した。

3) Wister ラットの腹部を正中切開し、肝臓の左葉および中葉根元の門脈枝を結紮した後、これらの葉を切除（2/3部分肝切除）した。さらに、門脈を15分間虚血し、残存

肝について広範性肝壊死を誘発した。

4) コラーゲンゲルに包埋・回収したスフェロイドを腹腔内の脾臓、肝臓、腸間膜付近へそれぞれ留置した後、腹部を縫合し、覚醒させた。移植24時間後、開腹し、移植したゲルを取り出し、染色により評価した。

C. 研究結果と考察

1) コラーゲンゲル内に包埋後、電位印加によりスフェロイドをゲル側へ転写可能であることを示した。これにより、スフェロイド同士の癒着を防止し、操作性、回収効率を向上させた。

2) 回収後のスフェロイドのアンモニア代謝能は、培養日数が経過するにつれ僅かに低下したものの、チップ上で培養を続けたスフェロイドとほとんど差がなく、本手法が有用であることが示された。

3) 急性肝不全モデルラットの腹腔内に移植したスフェロイドは少なくとも24時間は生存状態を保っていることをヘマトキシリン・エオジン染色により示した。

D. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
R. Inaba, A. Khademhosseini, H. Suzuki, J. Fukuda	Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers for Engineering Cellular Tissues	<i>Biomaterials</i>	in press		