

200906015A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福田 淳二

平成22(2010)年 5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

電気化学細胞脱離を利用した心筋細胞シートの作製	-----	16
崎山 亮一		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	24
-----------------	-------	----

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 筑波大学大学院 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立することを目的としている。本研究課題の実施2年目である平成21年度は、前年度構築した微細な金ワイヤを利用した微小血管構築技術の確立、およびナノ孔メンブランを利用した細胞シートの作製技術の確立を行った。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 助教

A. 研究目的

近年、日本発のアプローチである細胞シート工学を利用した再生医療が注目されており、臨床試験を含めた精力的な研究が進められている。現在の細胞シート工学には、温度応答性ポリマーを利用した培養皿が用いられているが、このアプローチの競争力を保ち我が国発の独自性を担保していくには、根幹となる細胞脱離技術について安全性・脱離時間などの観点から他の技術シーズも発掘しておく必要があると思われる。

一般に細胞回収にはタンパク質分解酵

素を用いるが、この方法では細胞同士の結合も同時に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。現状の温度応答性ポリマーを修飾した培養皿においても、培養期間を通して温度調整に気を配る必要がある点や、アクリルアミドモノマーの安全性の懸念、細胞脱離に30分以上の時間を要する点などが課題として挙げられる。そこで本研究では、電気化学的原理に基づき、電位印加のみで培養表面から素早く細胞を脱離する独自技術を提案する。ここで電気化学的原理とは、金-チオール結合によって培養皿表面に自発的に結合させたオリゴペプチドが、負電位の印加により還元され脱離する現象のことである。すなわち金蒸着培養皿上で、ペプチドを介して細胞シートを

形成・高度化し、ペプチドの還元脱離とともに回収する。ペプチドには、細胞外マトリクスに存在する細胞接着アミノ酸配列を組み込み細胞の足場を確保する。さらにその末端にはシステインを配置することで、システインの持つチオール基を金との結合に利用する。ペプチドは分解されてもアミノ酸が生じるのみであり、将来の臨床応用においても高い安全性が期待できる。

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。

また、回収した細胞シートを多層積層化して、生体外で生体類似構造を形成させるためには、実用的なサイズのシート回収が求められる。サイズが大きくなれば、細胞シート全体への均一な電位印加が細胞層の電気抵抗により妨げられることや、細胞へ栄養が充分供給されないことが予想される。そこで、培養皿表面にナノ孔を有する多孔質メンブレンを用いることによって、厚みのある細胞シートの形成とともに細胞シートのサイズに依らない脱離技術を目指す。また本研究では、この技術を金ワイヤに応用して血管構造を有する細胞組織を構築する。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とともに、再生医療用の製品として実施例を示す。

B. 研究方法

1. ナノ孔メンブレン上でのシングル細胞脱離

細胞シートを構築するためには、細胞を培養基板上で増殖させ、細胞同士が積層化した組織を構築する必要がある。しかしながら、通常のプラスチック培養ディッシュでは、細胞密度がコンフルエントに近い状態ですでに低酸素状態となっていることが分かっており、厚みのある細胞シートの形成には限界がある。そこで、本研究では基板表面にナノメートルの孔を有するメンブレンを用い、酸素の供給を改善することでメンブレン上において厚みのある細胞シートを作製し、これを脱離回収して積層化することを目的とした。ここでは、細胞シートを電気化学的に脱離させる前段階として、まずシングル細胞のメンブレン上からの脱離を定量的に評価した。

1.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4 HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, BD Falcon
- Multiwell 6 well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列: -CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- マウス線維芽細胞: 3T3 Swiss Albino (RCB1642), Riken Cell Bank
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS-, GIBCO

[装置]

- スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ポテンショスタット/ガルバナスタット: HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極: #012167, BAS Inc.
- 位相差顕微鏡: IX-71, Olympus.
- クリーンベンチ, 三洋電機
- 遠心分離機, 三洋電機

- ・インキュベータ, 三洋電機
- ・超純水製造装置: Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE

<実験手順>

- 1) Au/Cr層のスパッタ 細胞培養用の Cell Culture Insert (Fig. 1) をスパッタリング装置のチャンバーに装着し、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを30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。
- 2) オリゴペプチドの固定 0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成した Cell Culture Insert のメンブレン全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐために4°Cの冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。

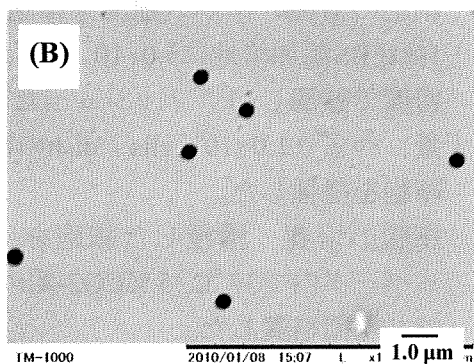
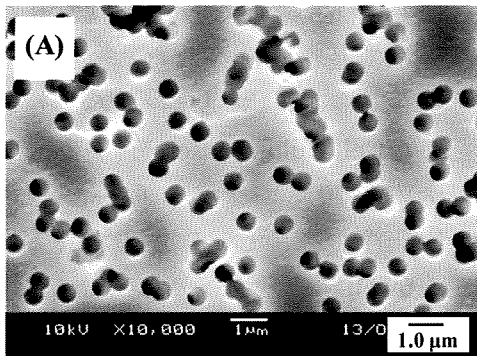


Fig. 1 ナノ孔を有するメンブレンの走査型電子顕微鏡写真。(A) 高密度ナノ孔タイプ、(B) 低密度ナノ孔タイプ

- 3) 基板の滅菌 オリゴペプチドを固定した Cell Culture Insert 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滅菌し、専用の培養容器である6 wellマルチウェルプレートに入れた。
- 4) 細胞の播種 マウス線維芽細胞3T3を10%FBS添加培地に 5.0×10^4 cells/mL の密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 mL量、すなわち 1.0×10^5 cells/dish の密度で細胞を播種した。
- 5) 細胞の培養 播種した細胞をインキュベータ内で37°C、5%CO₂-Airのもとで約12-18時間培養した。
- 6) 電位の印加 (Fig. 2) Cell Culture Insert 内の培地をPBS-に交換した。細胞培養ディッシュを作用極、市販のAg/AgCl電極(内部電解液: 飽和NaCl溶液)を参照極、白金板を対極とし、3電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続して定電位-1.0 Vを1分間印加した後、軽くピペッティングして溶液を15 mL遠心管に入れ、新しいPBS-を Cell Culture Insert 内に入れた。これを電位印加時間が6分間になるまで繰り返した。
- 7) トリプシン処理 電位印加しても剥がれなかった細胞を全て回収するために、Cell Culture Insert 内にトリプシンを1 mL入れ、5分間インキュベートした。その後、培地を4 mL加えてピペッティングし、15 mL遠心管に入れた。
- 8) 細胞数のカウント 脱離した細胞の懸濁液を1000 rpm、180分間遠心し、細胞を沈殿させた後、上清を吸引して全量100 uLとして再懸濁した。懸濁液をヘモサイトメーターに入れ、位相差顕微鏡を用いてカウントした。

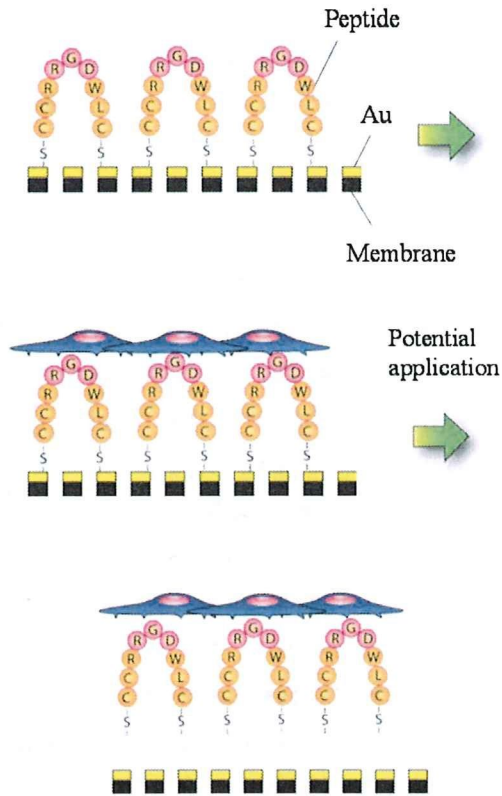


Fig. 2 電位印加による細胞脱離

2. ナノ孔メンブレンからの細胞シートの脱離および積層化

多孔質メンブレン上において形成される細胞シートと、通常のガラス基板上で培養した細胞シートとを比較するとともに、上記1.にて確立した技術を用いることで、厚みのある細胞シートを形成させ、なおかつ回収・積層化する技術を確立した。

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4 HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Multiwell 6well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列: -CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- マウス線維芽細胞: 3T3 Swiss Albino (RCB1642), Riken Cell Bank

[装置]

- スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ポテンショスタット/ガルバナスタット: HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極: #012167, BAS Inc.
- 位相差顕微鏡: IX-71, Olympus.

<実験手順>

- 1) Au/Cr層のスパッタ 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Cell Culture Insertに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。
- 2) オリゴペプチドの固定 0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成したCell Culture Insertのメンブレン全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐために4℃の冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。
- 3) 基板の滅菌 オリゴペプチドを固定したCell Culture Insert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滅菌し、専用の培養容器である6wellマルチウェルプレートに入れた。
- 4) 細胞の播種 マウス線維芽細胞3T3を10%FBS添加培地に 5.0×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells / dishの密度で細胞を播種した。
- 5) 細胞の培養 播種した細胞をインキュベータ内で37℃、5%CO₂-Airのもとで2週間培養した。
- 6) 電位の印加 Cell Culture Insert内の培地をPBS-に交換した。細胞培養ディッシュを作用極、市販のAg/AgCl電極(内部電解液: 飽和NaCl溶液)を参照極、白

金板を対極とし、3電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続して定電位-1.0 Vを5分間印加した。

- 7) 細胞シートの回収 シリコンシートをメンブレンの直径に合うようにリング状にくり抜き、φ3cmディッシュに固定した。シリコンリングとディッシュによって形成されたくぼみに、あらかじめPBS-を満たしておき、その上からCell Culture Insert押し込むことで、気孔からPBS-が供給されることで細胞シート浮き上がらせた(Fig. 3)。最後に、浮遊した細胞シートをピペットで回収した。

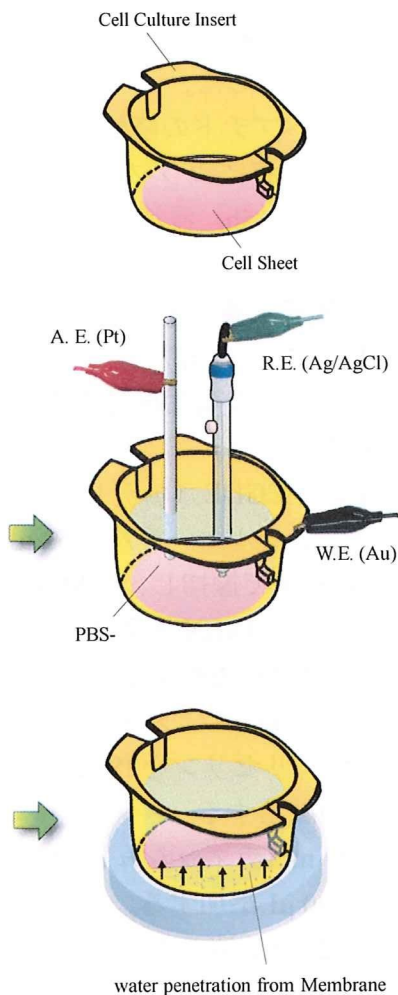


Fig. 3 細胞シートの多孔質メンブレンからの脱離

- 8) 細胞シートの積層化 回収した細胞シートをディッシュに移動させ、その上から新たな細胞シートを重ね、37°C、5% CO₂-Airの雰囲気下で5分間インキュベートした。その後、さらに新たな細胞シートをその上から重ね、同様にインキュベートさせることで、積層化した細胞シートを形成した。

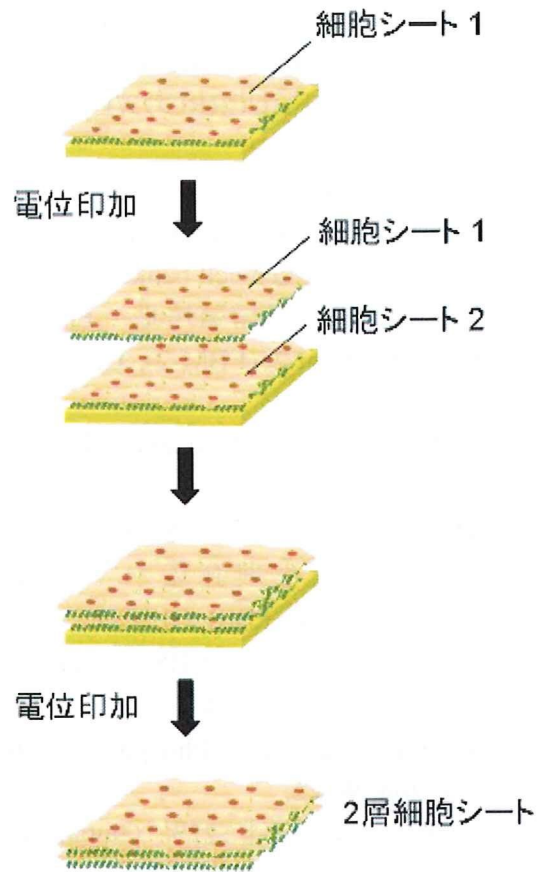


Fig. 4 細胞シートの積層化

3. 微小血管構造の構築技術の構築

ティッシュ・エンジニアリング分野における最も重要な課題の一つは如何に血管構造を張り巡らせた組織を構築するかということである。本研究で確立した電気化学的な細胞脱離技術は、平面のみなら

ず、微細な金ワイヤにも応用可能である。そこで、金ワイヤに接着させた血管内皮細胞をコラーゲンゲルの内腔に転写し、内表面が血管内皮細胞に覆われた微小流路構造を作製する技術を確立した。血管内皮細胞は、その後の還流培養において、自発的に管腔構造をコラーゲンゲル側に伸長し、血管ネットワークを形成した。

【試薬】

- ・ガラスキャピラリー：φ600 μm×3.2 cm, Hirschmann Laborgeräte, Germany.
- ・オリゴペプチド (CCRRGDWLC)：Sigma Aldrich Japan.
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・PDMS (Polydimethylsiloxane)：KE-1300T, ShinEtsu.
- ・PDMS硬化剤：CAT-1300, ShinEtsu.
- ・リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO.
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・パラホルムアルデヒド：4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution, Wako.
- ・グルタルアルデヒド：25% Glutaraldehyde Solution in water, Fluka Bio chemika.
- ・オスミウム酸：Osmium tetroxide EM, TAAB.
- ・t-ブチルアルコール：t-Butyl Alcohol, Wako.

【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・電子顕微鏡：JSM-5510SEM, Japan Electron Optics Laboratory (JEOL)

<実験手順>

金ワイヤの準備

- 1) ガラスキャピラリー洗浄 30~50本のガラスキャピラリーをPDMSで作製した土台に垂直に差し込み、純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4の沸騰水溶液に5分間浸漬し、更に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 PDMSの土台にガラスキャピラリーを差し込んだ状態で、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力100 W、アルゴン雰囲気下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。引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。
- 3) RGDペプチドの修飾 1mM RGDペプチド溶液にガラスキャピラリーを一晩 (12~15h) 浸漬させた後、純水で洗浄した。

細胞非接着培養ディッシュの準備

- 1) BSA (ウシ血清アルブミン) 0.6 gをPBS (リン酸緩衝生理食塩水) 20 mLに溶解するした。
- 2) 架橋剤EGDE (エチレングリコールジグリシジルエーテル) 652 μL加えたる。
- 3) 24h室温で攪拌し、架橋反応させる。
- 4) 未反応のEGDEを除去するために、室温で2~3日透析する。
- 5) 透析後30 mLにメスアップする。
- 6) 50%グリセリンを284 μL加える。
- 7) ろ過滅菌する。
- 8) φ35 mmディッシュに架橋アルブミンを500 μL添加する。
- 9) 10~20分放置した後に、アルブミン溶液を除去する。
- 10) クリーンベンチ内 (無菌状態) で、一

晩乾燥させる。

金ワイヤへの細胞接着 (Fig. 5)

- 1) 金線の滅菌 RGDペプチドを修飾した金線をクリーンベンチ内で70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ5分間浸漬し、滅菌した。
- 2) 細胞の播種 金線を架橋アルブミンコートディッシュに5~10本入れ、EBM-2に 7.5×10^4 cells/mLの密度で懸濁したHUVECを1ディッシュ当たり2 mL量、つまり 1.5×10^5 cells/dishの密度で播種した。
- 3) 細胞の培養 播種した細胞をインキュベータ内で37°C、5% CO₂-Airのもとで、金線周囲を完全に覆うまで、3~4日間培養した。

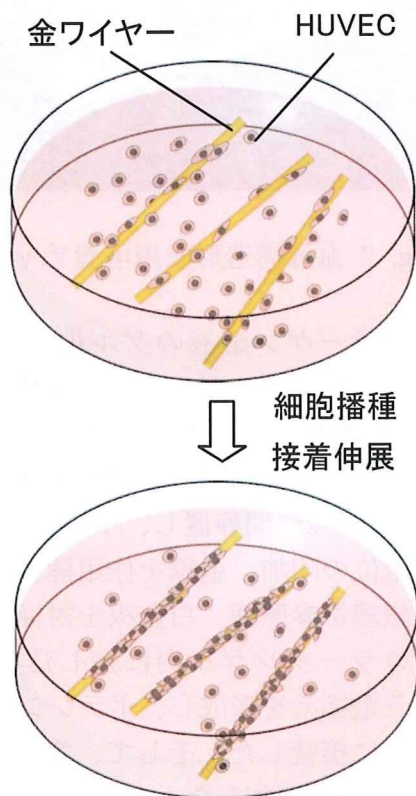


Fig. 5 金ワイヤーへの細胞播種

電子顕微鏡ED-SEMによる組織観察

HUVECが金ワイヤ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
 - (ア)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を室温で1時間浸漬した。
 - (イ)後固定: 1%オスmium水溶液(OsO₄)/0.1 M buffer(pH7.4)に金ワイヤを4°Cで1時間浸漬した。
- 2) 脱水処理 金ワイヤ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周囲の細胞観察を行った。
- 5) 分析 金ワイヤ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。

血管様構造構造の作製 (Fig. 6)

- 1) 培養チャンバーの作製 厚さ3 mmの亚克力板をレーザー加工機で指定の形状に切断し、接着剤(アクリサンデー)を用いて、培養チャンバーを作

製した（内側：1 cm×2 cm×0.5 cm）。細胞に害を与えないように、80℃オーブンに数時間入れて、接着剤を完全に乾燥させた。さらに、純水に一晩漬けた後、70%エタノールで滅菌して使用した。（Fig. 7上）

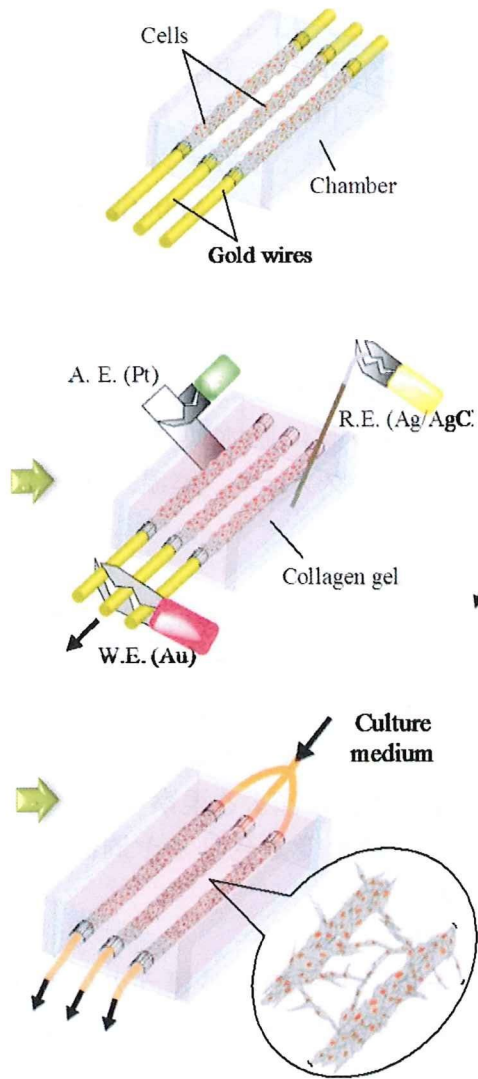


Fig. 6 微小血管構造の作製手順

- 2) 金線の固定 培養した金線をPBS溶液に一度漬けてから、表面の細胞を乾燥させないように、アクリルの培養チャ

ンバーに3本固定した（Fig. 7下）。このとき、チャンバーの両側に開けた穴のサイズと金線の直径があまり変わらないので、細胞を傷つけないように注意しながら差し込んだ。

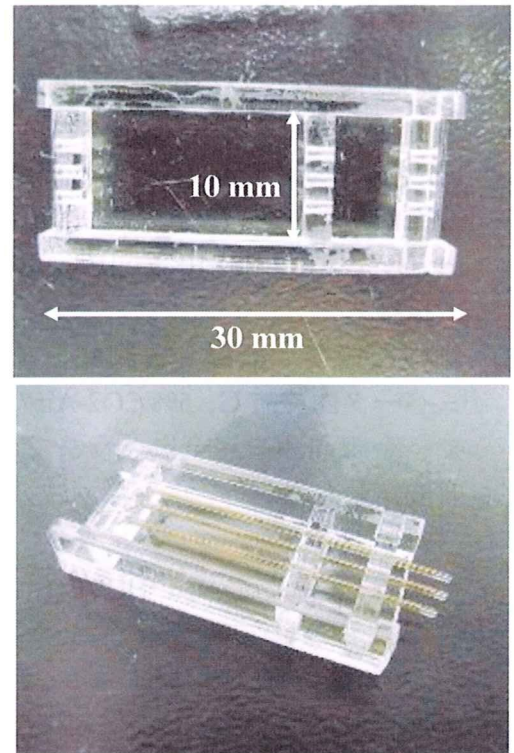


Fig. 7 血管構造形成用培養チャンバー

- 3) コラーゲン溶液のゲル化 氷上で調製したコラーゲンゲル前駆体溶液1 mLを培養チャンバーに流し込み、インキュベータ内で37℃、5% CO₂-Airのもとで1~2時間静置し、ゲル化させた。
- 4) 電位の印加 金線を作用極、銀/塩化銀線を参照極、白金板を対極として、コラーゲンゲル内に差し込むことで三電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 Vを5分間印加した。
- 5) 血管様構造の形成 電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、P

DMSチャンバーから金線を3本とも丁寧に真っ直ぐ引き抜くことで、コラーゲンゲル内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

- 6) 血管ネットワーク形成 作製した血管様構造をPMA含有培地中で培養し、管腔構造を伸長させた。また、PMAを含んだ培地をシリンジポンプで送液しながら培養することで、管腔の形成を促進させた。そして、血管様構造同士が互いに連結するまで培養し、位相差顕微鏡で観察した。

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 ; Dil 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った。
- 2) 培地1 mlに対し、Dil solutionを5 μ lを加えて攪拌し、染色液を準備した。
- 3) サンプルに染色液を滴下し、全体に行渡らせた。
- 4) 20分間インキュベート (5%CO₂-Air、37°C) した。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した。
- 6) この操作を三回繰り返す、洗浄した。
- 7) サンプルを培地または、PBSで満たし、蛍光顕微鏡で観察した。

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)

C. 研究結果と考察

1. ナノ孔メンブラン上でのシングル細胞脱離

本実験では、オリゴペプチドによる脱離効果を明確にするために、次の3条件において細胞の脱離挙動を定量的に評価した。

- 1) オリゴペプチドあり/電位印加なし、2) オリゴペプチドなし/電位印加あり、3) オリゴペプチドあり/電位印加あり。これらの条件における細胞の脱離挙動を Fig. 8 に示した。ここで、縦軸は電位印加に伴って基板から脱離した細胞脱離率を示しており、電位印加して脱離した細胞数とトリプシン処理によって剥がれた細胞数の合計を100とした。

オリゴペプチドを修飾した基板を使用し、-1.0Vの電位を印加した場合、最初の2分間で半数以上の細胞が脱離し、電位印加5分後には約90%の細胞が脱離した。これに対し、オリゴペプチドを修飾し、電位印加していない場合は、5分後もほぼ細胞は基板に接着した状態であったことから、電位印加によってオリゴペプチドが基板から脱離するのに伴って、ペプチドを介して接着していた細胞も脱離すると考え

られる。

一方、オリゴペプチドを修飾していない基板を使用し、 $-1.0V$ の電位を印加した場合、電位印加 5 分後には 20% 弱の細胞が脱離している。オリゴペプチドを修飾していないのにも関わらず、一部の細胞が脱離しているのは、細胞が金表面に接着する際、吸着タンパクや細胞外マトリックスを介して接着しており、これらの一部は負電位の印加により除去されたため、細胞が足場を失い脱離したためと考えられる。実際に、電極に電位を走査することで、電極表面の有機物等を除去する、電解洗浄という手法が知られている。

以上より、オリゴペプチドを介して細胞を接着させることで、5 分間という短時間のうちに、ほぼ全ての細胞を回収することが可能であり、オリゴペプチドの脱離によって細胞脱離現象が起こることが示された。

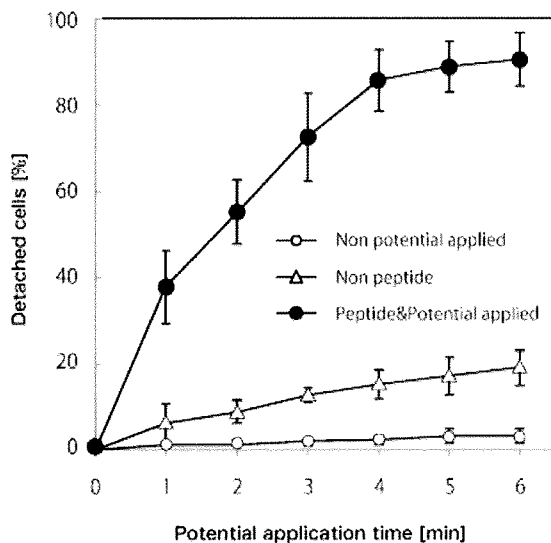


Fig. 8 メンブラン上からの電気化学細胞脱離

また、多孔質メンブレンの高密度タイプは透明度が低く、位相差顕微鏡では細胞が観察することができない。そこで、電気化学的に細胞が脱離されているかを確認するために、電位印加前・後のメンブレン表面を、電子顕微鏡にて観察した (Fig. 9)。(A)が負電位印加前、(B)が負電位を 5 分間印加後に培地交換を行ったメンブレン表面の電子顕微鏡画像である。これらにより、メンブレン上の細胞がオリゴペプチドの脱離によって、電気化学的に脱離されることが確認された。

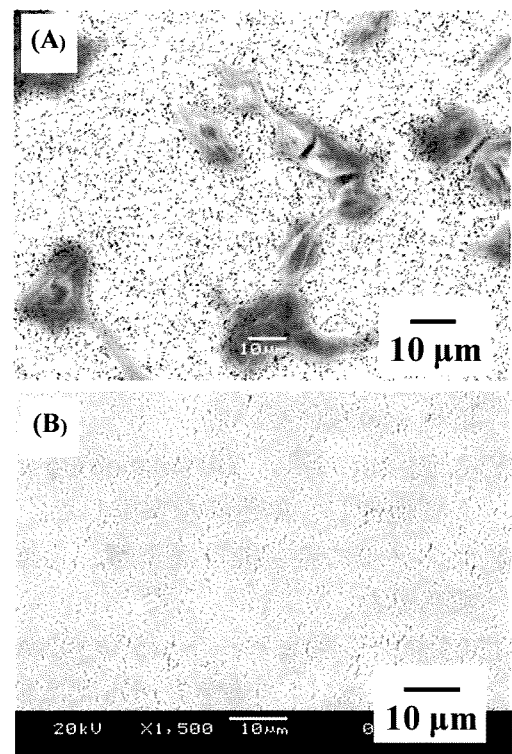


Fig. 9 メンブラン上に接着した SEM 写真

さらに、電気化学的に脱離させた細胞が、電位印加によってダメージを受けて本来の機能を失っていないかどうかを調べるために、脱離した細胞を新しいプラスチ

ック製ディッシュに播種し、経過を観察した。Fig. 10 の(A)は再培養 24 時間後、(B)は 2 日後、(C)は 3 日後の位相差顕微鏡写真である。24 時間後には培養基板にしっかり接着・伸展し、増殖を繰り返す、3 日後にはセミコンフルになるまでに増殖していることが確認できる。つまり、電位印加による細胞へのダメージは見られず、良好な生存状態および増殖能を保持されていることが示された。

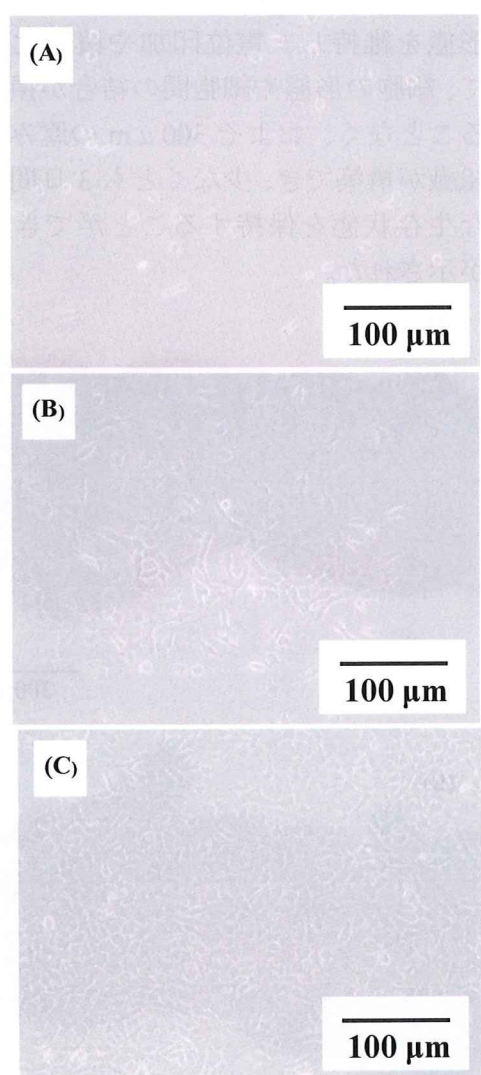


Fig. 10 脱離させた細胞の再接着後の増殖

2. ナノ孔メンブレンからの細胞シートの脱離および積層化

多孔質メンブレン上でマウス線維芽細胞(3T3 Swiss Albino)を 2 週間培養し、電位を 5 分間印加して回収した細胞シートの写真を Fig. 11 に示す。一般的に細胞シートの回収は、支持体として親水性 PVDF 膜やニトロセルロース、またはゲル化したコラーゲンを用いて、それらに細胞を転写させることで回収することができる。しかしながら、PVDF 膜やニトロセルロースでは細胞脱着に適した柔軟性や吸水性を有していないために、細胞シートをうまく転写・回収できなかつたり、ホストへの移植が困難であったりといった問題がある。そこで本研究では、メンブレンが多くの孔を有することを利用し、電位をかけることで剥がれやすくなった細胞シートに、メンブレンの底部から PBS-を送液することによって、支持体を使わずに細胞シートを回収する方法を確立した。回収した細胞シートのサイズは、メンブレンと同様に直径 25 mm である。Fig. 11 では実際のサイズよりも小さく見えるが、これは支持体を用いていないため、細胞シートが自発的に収縮したためであると考えられる。

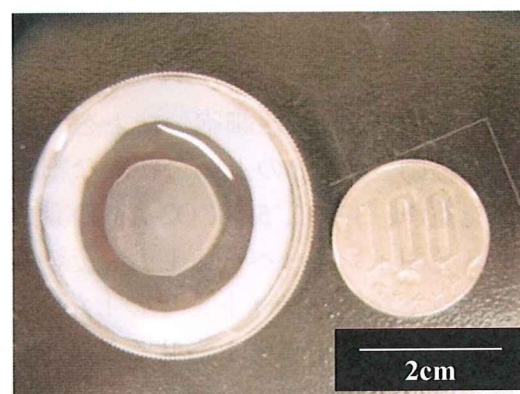


Fig. 11 回収した一層の細胞シート

また、細胞の生存状態を確認するために、回収した細胞シートを生細胞/死細胞染色をおこない、蛍光顕微鏡で観察した。FDA/EB 染色では、生細胞は FDA によって緑に、死細胞は EB によって赤に染まる。Fig. 12 上が位相差顕微鏡、下が蛍光顕微鏡で観察した細胞シートであるが、ほとんどの細胞が緑に染まっている、すなわち生存状態であることが確認された。

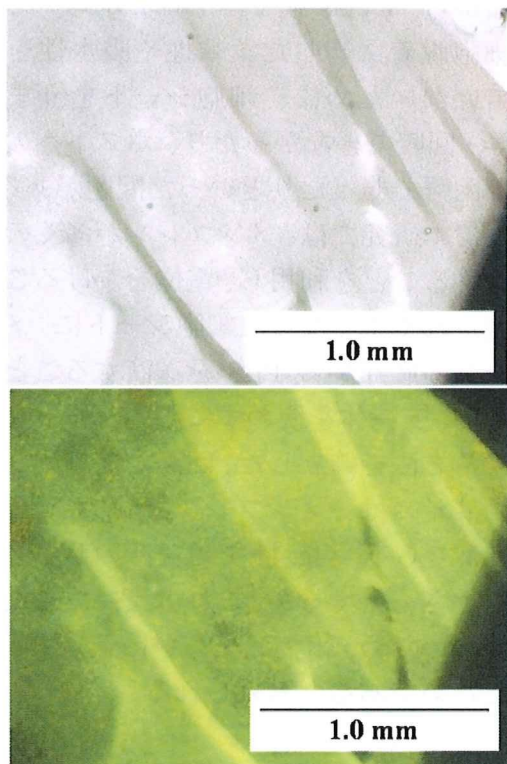


Fig. 12 脱離させた細胞シートの生死染色

さらに、回収した細胞シートをディッシュに移動させ、その上から新たな細胞シートを重ね、37 °C、5 %CO₂-Air の雰囲気下で5分間インキュベートした。その後、さらに新たな細胞シートをその上から重ね、同様にインキュベートさせることで、積層化された細胞シートを形成した。回収した細胞シートの下面には、脱離したオリゴペプチドの他に、細胞自身が生産した細胞外

マトリックスが存在する。よって、細胞シート同士は単純に重ねることによって、5分ほどで完全に接着した。

Fig. 13 は、回収した細胞シートを3層重ね、それをさらに3日間培養したものの組織染色である。Fig. 13 の上下はそれぞれ、H.E.染色と Azan 染色である。H.E.染色では細胞核は濃紫、細胞質は淡紫に染められ、一方 Azan 染色では細胞核はオレンジから赤、膠原線維は深青色に染まる。積層化した細胞シートが正常に染色されていることから、組織内の細胞が良好な本来の形態を維持し、電位印加や積層化によって、細胞の形態や細胞間の結合が損なわれることなく、およそ300 μm の厚みのある組織が構築でき、少なくとも3日間は良好な生存状態を保持することができることが示された。

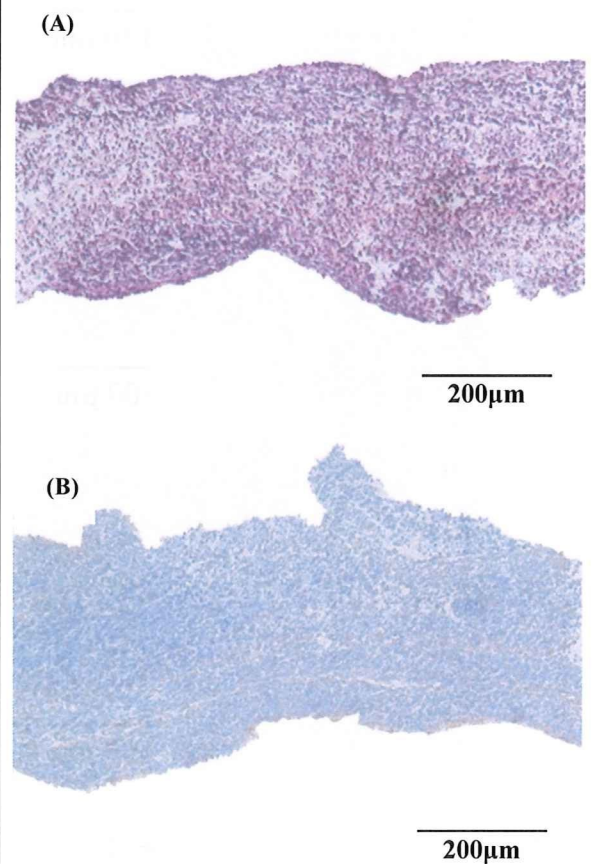


Fig. 13 3層積層化した細胞シート

ここで、1層の厚みは多く見積もってもおよそ $60\mu\text{m}$ であり、今回は細胞シートを3層重ねたので理論上はおよそ $180\mu\text{m}$ の厚みになると考えられる。しかしながら、Fig. 13 のようにおよそ $300\mu\text{m}$ という厚みが形成された。これは、本章の実験では細胞シートの回収に支持体を用いずに、細胞シートのみを重ねることで積層化させ、さらにその後3日間の培養を行ったため、組織体が凝集したためであると考えられる。すなわち、回収した際に細胞シート自身がまず収縮を起こし、積層化後の培養によって組織全体としても収縮が起こったため、およそ $300\mu\text{m}$ という厚みが形成されたと考えられる。

3. 微小血管構造の構築技術の構築

アクリル製培養チャンバーを用いて、金線を約 $500\sim 600\mu\text{m}$ の間隔で並列に3本配置し、電位を印加して引き抜いたところ、互いの間隔を保ったまま並列した3本の血管様構造が形成された。培地に浸してしばらく培養したところ、互いの間隔が崩れることなく、その構造を維持したまま、血管様構造が形成された (Fig. 14)。これにより、微小間隔で配置した複数本の血管様構造を作製することが可能であることが示された。血管様構造をアクチン・核染色によって蛍光観察したところ、Fig. 15 に示したように、内壁を隙間なく覆っていることが示された。

作製した血管様構造に PMA を作用させると、送液することなしに多数の分岐管腔構造が伸展していく様子が観察された (Fig. 16)。数日で管腔を伸展し始め、二週間程度の培養で隣り合った血管様構造同士が連結した。次に、血管様構造に PMA を含んだ培地を送液することで管腔形成

能を上昇させ、より短時間で血管様構造同士が連結しないかを検討したところ、一週

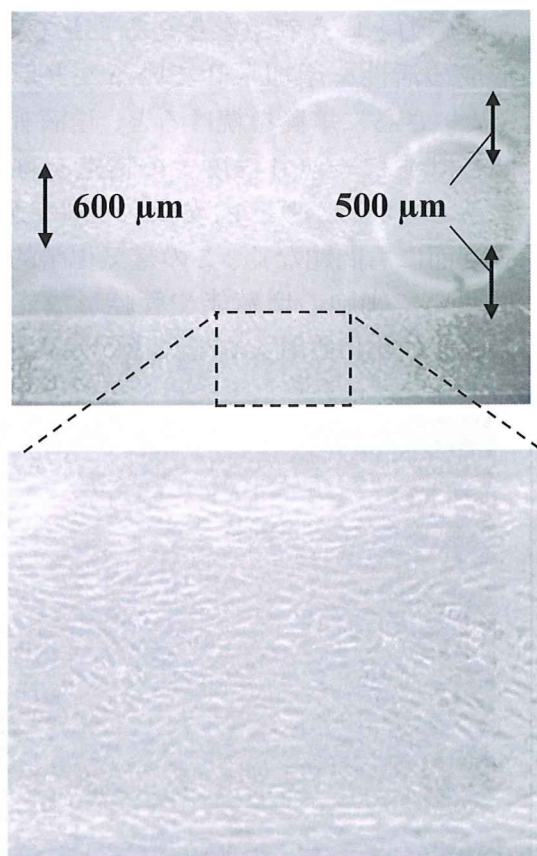


Fig. 14 内表面を血管内皮細胞に覆われた微小流路構造

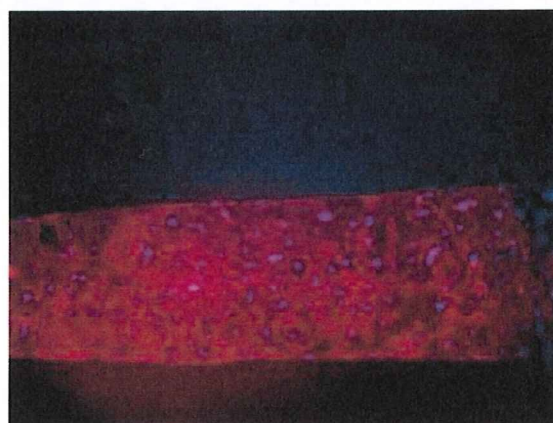


Fig. 15 血管内皮細胞の蛍光染色写真 (赤、アクチン；青、核)

間程度の培養で、約 500 μm の間隔で形成された血管様構造同士が連結した。このことより、送液によって内皮細胞に対してせん断応力という刺激を与えることで、管腔形成の活性を増加させていることがわかった。さらに培養を続けると、送液有無に関与せずに一ヶ月程度その構造を維持できることがわかり、内皮細胞一層ながら、強度面にも問題なく、この電気化学的手法において細胞の増殖能や管腔形成能が失われずに維持されていることが示された。

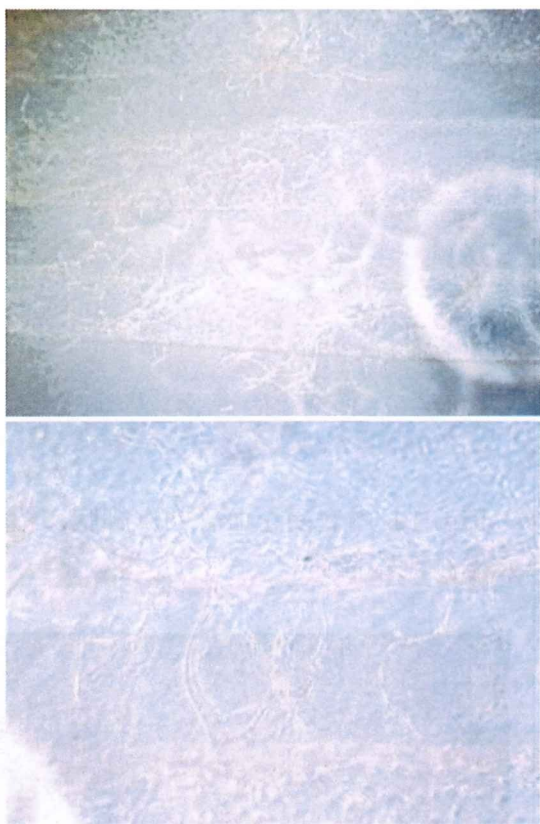


Fig. 16 微小血管構造からの管腔構造の伸長と微小血管同士の結合

今後、この分岐構造の断面が本当に管腔構造になっているのかを観察するために、共焦点顕微鏡の観察や、切片の組織染色などを実施したいと考えている。

D. 結論

本研究課題 2 年目にあたる平成 21 年度は、電気化学的な細胞脱離を応用して、ナノ孔膜を利用した厚みのある細胞シートの作製と微小血管構造を構築した。細胞脱離に必要な電圧は 1.0 V 以下であり、乾電池一本を接続すれば細胞脱離が生じることから、非常にシンプルな再生医療用培養器具として実用化できると考えている。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Seto, R. Inaba, T. Okuyama, F. Sassa, H. Suzuki, J. Fukuda, Engineering of Capillary-Like Structures in Tissue Constructs by Electrochemical Detachment of Cells, *Biomaterials*, 31, pp. 2209-15 (2010)

2. 学会発表

国際学会

1. Engineering Cell Sheets and Spheroids Using Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers, J. Fukuda, R. Inaba, H. Suzuki, Poster, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Korea.
2. Microfabrication of Capillary-like Structures Using Electrochemical Desorption of an RGD-Containing Peptide, Y. Seto, H. Suzuki, J. Fukuda, Poster, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Korea.
3. Microfluidic Cell Culture System for Cytotoxicity and Migration Assays, T. Okuyama, H. Yamazoe, H. Suzuki, J.

Fukuda, Poster, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Korea.

4. Cell-based Microanalysis System Equipped with the Processing Functions of Nanoliter-scale Liquid Plugs Y. Kamooka, S. Takahashi, F. Sassa, H. Suzuki, J. Fukuda, Poster, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Korea.
5. Microflow system for cell micropatterning and assays under concentration gradients, T. Okuyama, H. Yamazoe, H. Suzuki, J. Fukuda, Poster, APCE & APLOC 2009, Shanghai, China.

国内学会

1. 電気化学アンモニアセンサを搭載した細胞チップデバイス、福田 淳二、佐藤 航、鈴木 博章、口頭、第61回日本生物工学会大会、名古屋大学
2. 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、瀬戸祐希、鈴木博章、口頭、第9回日本再生医療学会総会、広島国際会議場
3. 電気化学的細胞脱離を利用した血管網構築の試み、福田淳二、瀬戸祐希、鈴木博章、口頭、第9回日本再生医療学会総会、広島国際会議場
4. マイクロ流路内での細胞パターンニングと細胞遊走試験、奥山智章、山添泰宗、鈴木博章、福田淳二、口頭、化学工学会第75年会、鹿児島大学

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

(特許申請準備中) 細胞脱離のためのオリゴペプチド、出願人：筑波大学、発明者：福田淳二、鈴木博章、望月直人、掛川貴弘

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

電気化学細胞脱離を利用した心筋細胞シートの作製
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、ラット胎児から心筋細胞を調製し、ペプチド修飾基板上で形成させた心筋細胞シートを電位印加により剥離して、フィブロネクチン分子を結合したコラーゲンゲルへ転写した。そしてこの操作を繰り返すことで多層化した心筋細胞シートを作製し、ゲル全体が拍動する心筋細胞シートを作製する技術を確立した。

A. 研究目的

心筋細胞シートは、拡張型心筋症などの重篤心不全に対する治療法として期待されており、また生体内埋め込み型マイクロデバイスのポンプ動力としても有望であると考えられている。本研究では、電気化学的な細胞脱離技術が心筋細胞シートの構築に有用であることを示した。

B. 研究方法

【実験動物】

- ・妊娠19日 Wisterラット (オリエンタルバイオサービス関東)
- ・生後2日 Wisterラット (オリエンタルバイオサービス関東)

【装置・備品】

- ・恒温振動機 (アズワン製)
- ・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)
- ・ラボ・オートクレーブ (三洋電機製)
- ・pHメーター (東亜DKK製)
- ・ホットプレート (AS ONE 製)
- ・デシケータ (サンプラテック製)
- ・0.22 μ mメンブレンフィルター (Corning 製)
- ・細胞培養用ディッシュ (Φ 10 cm) (TPP 製)
- ・Centrifuge tube (50ml) (TPP製)
- ・セルストレーナーmesh 40 μ m (Falcon製)
- ・ホールオペクトグラス (池本理化工業製)
- ・フィブロネクチンコート細胞培養ディッシュ (6well plate) (Falcon製)
- ・銀/塩化銀参照極 (堀場製作所製)
- ・パイレックスガラス基板 (No.7740 直径

3inch 厚さ500 μ m Corning製)

- Lab-Tekチェンバースライド(ウェル 1)
(Nalge Nunc International K.K. 製)
- マイクロカバーガラス (24×24mm, 松浪硝子工業製)
- 真空デシケータ (VR, アズワン製)
- 真空ポンプ (DTC-21, ULVAC製)

【試薬・材料】

- D-MEM/HamF12 500ml (GIBCO BPL製)
- コラゲナーゼ (和光純薬工業製)
- ITS-X (GIBCO 製)
- BSA 30% 溶液 (SIGMA製)
- トリパンブルー染色液 (GIBCO 製)
- ペニシリン・ストレプトマイシン液体 (GIBCO製)
- ウシ胎児血清FBS (GIBCO製)
- HEPES buffered minimum salt solution : MSS
- 25%アンモニア水 (和光純薬工業製)
- 30%過酸化水素水 (和光純薬工業製)
- エタノール (関東化学製)
- ジエチルエーテル (和光純薬工業製)
- Fibronectin (SIGMA製)
- 10-Carboxy-1-decanethiol (同仁化学研究所製)
- 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)
- 98%硫酸 (和光純薬工業製)
- Water Soluble Carbodiimide : WSC (同仁化学研究所製)
- N-Hydroxysuccinimide : NHS (和光純薬工業製)
- リン酸緩衝生理食塩水: Phosphate Buffered Saline : PBS (GIBCO製)
- Fibronectin Active Fragment (GRGDS) (ペプチド研究所製)
- Cell Matrix Type I-A (新田ゼラチン製)

- Fluorecein dacetate : FDA (和光純薬工業製)
- Ethidium bromide : EB (和光純薬工業製)
- Dimethyl sulfoxide : DMSO (和光純薬工業製)
- Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit (Ivrogen 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)

1. 初代ラット心筋細胞の調製

胎児ラット及び新生児ラットを使用した。コラゲナーゼ分散法を用いて、初代ラット心筋細胞の調製を行った。

<調製手順>

- 1) ジエチルエーテルを用いて、デシケータ内で妊娠ラットに吸入麻酔を行った。
- 2) 麻酔下で、妊娠ラットを手術台に固定して腹部を70%エタノール消毒し、開腹して腹腔内を露出させた。
- 3) 子宮を取り出して胎児を胎盤ごと摘出した。
- 4) 頸椎と胸部を切り心臓を取り出し、心臓はすばやくMSSの入ったビーカー (on ice) に入れた。全ての胎児の心臓を取り出したらクリーンベンチへ移動させた。
- 5) MSSが入ったディッシュを4枚用意した。ピンセットで心臓をすくい、1つ目のディッシュに入れ洗浄し、2枚目のディッシュに移した。心房部分を切り離し3枚目のディッシュに心室部分を移した。
- 6) 心室に付いた外膜まで良く見てピンセットとハサミで取り除いた。その後、心室を4枚目のディッシュに移し、洗浄した。

- 7) ホールオペクトガラスのくぼみに1~2mlのMSSを入れ、その中に心室をピンセットですくって移した。
- 8) 心室をハサミで1mm角以下まで切り刻み、細片になった心室をMSSが入った遠心tubeに移し2~3分静置した。
- 9) 上清を捨てて、コラゲナーゼ/MSS (2mg/ml) を遠心tubeに加えた。心室をコラゲナーゼごとフラスコに移した。
- 10) フラスコに蓋をして、37°C恒温振動機を用いて125~130/minでシェイクした。10分後にスポイトで良く塊をほぐした。
- 11) 40 μ m meshを遠心tubeにピンセットで取り付け、コラゲナーゼ入り心筋をスポイトでよくほぐし、meshでこして遠心チューブに落とす。
- 12) MSSを加えてフラスコの壁を洗いながら、心筋を全て回収しmeshでこした。
- 13) 1000rpm 4°C 4minで遠心した。また、meshに残った心筋は回収し、新しいコラゲナーゼで再び11)から全ての心筋がなくなるまで繰り返した。
- 14) 以下、コラゲナーゼ除去と再コラゲナーゼ分散を並行に行った。
- 15) 遠心後上清を捨て、MSSを加えてピペッティングをし、再び1000rpm 4°C 4min遠心分離をした。
- 16) 遠心後上清を捨て、心筋細胞調整用培地を30ml加えて念入りにピペッティングした。
- 17) Φ 100mmのディッシュ 3枚に10mlずつ撒き(2腹以上のときは、4枚で)、CO₂ インキュベータで30分間インキュベートした。
- 18) 30分後、軽くディッシュを叩き、培地を新しいディッシュ3枚(2腹のときは、4枚で)に均等に撒いた。
- 19) 再び30分間インキュベートした。

- 20) 軽くディッシュを叩き、培地を遠心tube 2本に均等に回収し、350 rpm 4°C 10 minで遠心分離した。
- 21) 各遠心tubeの上澄(赤血球などを含む)を捨て、BSAを添加していない細胞培養用培地を加え、1000 rpm 4°C 4 min遠心分離した。
- 22) 遠心後、上澄を捨てて、細胞培養用培地を加えた。

2. 心筋細胞シートの積層化

<細胞シート積層手順>

- 1) Fig. 1の培養チャンバー内に、 1×10^6 cellsの心筋細胞を播種し培養する。
- 2) 予めゲル化させ、フィブロネクチンを修飾したコラーゲンゲルで基板表面を覆い培地を加え、1晩培養する。



Fig. 1 心筋細胞培養用チャンバー

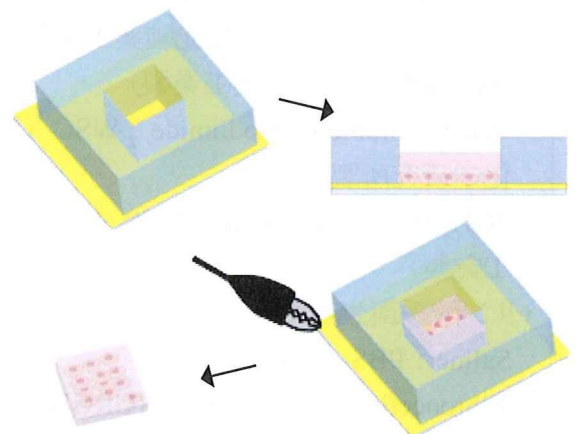


Fig. 2 心筋細胞シートの脱離手順