

201106019A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 福田 淳二

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

培養皿の表面設計と細胞脱離技術の確立 ----- 1

福田淳二

II. 分担研究報告

1. 細胞シートの作製と移植に関する研究 ----- 11

蛸沢克己

2. ハイドロゲルの設計に関する研究 ----- 22

伊藤大知

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 32

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

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発
研究代表者 福田 淳二 筑波大学 数理物質系

研究要旨

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している。特に、ナノ孔を有するメンブレン上へこの技術を応用することで、厚みのある細胞シートの作製を実現する。当該細胞脱離のメカニズムには、金-チオール結合によって培養表面に結合させたオリゴペプチドが電気化学的に還元され脱離する現象を利用している。研究1年目である平成23年度は、静電力によって自己組織化し、密な分子層を形成するオリゴペプチドを設計した。この技術をナノ孔を持つメンブレンへ応用し、厚みのある細胞シートを作製した。そして、これを電気化学細胞脱離を繰り返すことで順次重ね、厚みが200 μm 程度の5枚積層化細胞シートを作製した。また、細胞シートを容易に取り扱うために、ヒアルロン酸をベースとしたハイドロゲルを創製した。

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

蛭沢克己・名古屋大医学部 病院助教
伊藤大知・東京大医学部 准教授

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は、温度応答性ポリマーを利用した培養皿を重要な基点として展開が計られているが、このアプローチの国際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。

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。特に、ナノ孔を有するメンブレン上にこの技術を応用し、物質移動を促進した厚みのある細胞シートの形成により、従来にない高度な組織形成を実現する。本研究の細胞脱離には、金-チオール結合によって培養表面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を利用する。すなわち、ペプチドを介して金蒸着メンブレン上で細胞シートを形成・高度化し、ペプチドの還元脱離とともに回収するものである。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。特に従来技術との差別化を意識し、脱離時間の10分の1

までの短縮や成長因子徐放型ハイドロゲルとの融合などを旨す。

研究期間内に、静電力やファンデルワールス力によって自己組織化し、密な層を形成するオリゴペプチドを設計する。そして、この表面に接着させた細胞を短時間で電気化学的に脱離させる。特に、酸素拡散の観点からメンブラン上で形成できる細胞シートの厚みを決定するとともに、物理的な刺激（静水圧および流通培養）によって血管構造導入などの工夫を施し、組織を高度化させた上で脱離・回収する。さらに、作製した細胞シートをヒアルロン酸ベースの生分解性ハイドロゲルを利用して転写し、脱離後の細胞シートの操作および移植部位への確実な固定に供する。このようにして作製した細胞シートは、実験動物に移植し、本培養器具が様々な疾患の再生医療に広く応用可能であることを実証し、汎用的な研究用ツールとして普及させることが将来的な目標である。

B. 研究方法

1. オリゴペプチドの設計

一般にタンパク質の非特異吸着を抑制するためには、表面を親水性にすることが重要であると考えられている。一方近年、両性イオン分子を修飾した表面が良好なタンパク非接着表面として注目されている。例えば、ポリカルボキシベタイン修飾表面へのタンパク質の吸着は、SPR測定で検出不可能な程に少ないことが明らかとなっている。こうした、非特異吸着を非常によく抑制する表面には、分子レベルで正負の電荷が中和されることが重要である。ここでは、正負の電荷を持ったアミノ酸を交互に配置したオリゴペプチドを設計することで、タンパクの非特異吸着および細胞接着を強く

抑制する配列を設計した。この細胞非付着表面の上に、細胞接着配列を付与すれば、分子層の脱離によって素早い細胞脱離が得られるものと発想した (Fig. 1)。

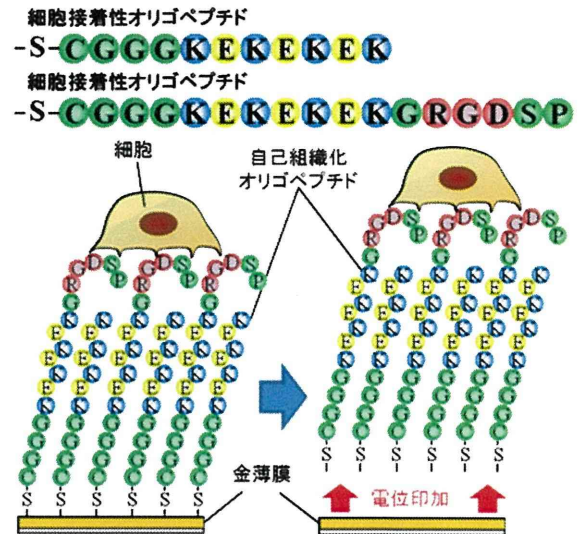


Fig. 1 自己組織化ペプチドの配列

1.1 実験装置と試薬・材料

【装置】

- Quartz Crystal Microbalance (QCM), AFFINIX QN, Initium 社
- スパッタデポジション装置、CFS-4ES-231、Shibaura Eletec
- 位相差顕微鏡、IX-71、Olympus
- 電気化学測定装置: AUTOLAB EN 55022 (Eco Chemie 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)
- Ag/AgCl参照電極: #2080A, HORIBA

【試薬・材料】

- カバーガラス
- 細胞非接着性オリゴペプチド、CGGGKKEKEKEK (Sigma-Aldrich Japan)
- 細胞接着性オリゴペプチド、

CGGGKEKEKEKGRGDSP (Sigma-Aldrich Japan)

- ブリッジ型オリゴペプチド : CCRRGDWLC, (Sigma-Aldrich Japan)
- フィブロネクチン Sigma-Aldrich Japan
- フィブリノーゲン Sigma-Aldrich Japan
- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), D5796, Sigma
- マウス線維芽細胞 Swiss 3T3(RCB1642), Riken Cell Bank

1.2 実験手順

1.2.1 QCMによるオリゴペプチド吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

1% SDS溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸：過酸化水素水=3：1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面にオリゴペプチド溶液(50 μ M細胞非接着性オリゴペプチド水溶液, 50 μ Mブリッジ型オリゴペプチド水溶液)を滴下し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

1.2.2 オリゴペプチド修飾表面へのタンパクの非特異吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

1% SDS溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、

濃硫酸：過酸化水素水=3：1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面にオリゴペプチド溶液(50 μ M細胞非接着性オリゴペプチド水溶液, 50 μ Mブリッジ型オリゴペプチド水溶液)をそれぞれ滴下し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

5) タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に1 mg/mlフィブリノーゲン、1 mg/mlフィブロネクチン溶液をそれぞれ滴下し、室温で30分間放置した。

6) タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

1.2.3 接着・非接着オリゴペプチド混合修飾表面における細胞接着挙動

1) 基板洗浄

カバーガラスを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分間浸漬し、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

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。

3) オリゴペプチドの修飾

細胞接着性オリゴペプチド：細胞非接着性オリゴペプチド = 100 : 0, 1 : 99, 0.1 : 99.9, 0.01 : 99.99, 0.001 : 99.999, 0 : 100 (Total conc. 50 μ M)のオリゴペプチド溶液に金基板をそれぞれ浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 基板の滅菌

オリゴペプチドを修飾した金基板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滅菌し、 ϕ 35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

5) 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ディッシュあたり 2 ml 量、つまり 1.0×10^6 cells/mlの密度で細胞を播種した。

6) 接着細胞数のカウント

三時間培養後、金基板に接着した細胞数をカウントした。

7) 統計処理

Dunnett's test により、100%細胞接着性オリゴペプチド修飾表面との有意差を検定した。

1.2.4 電気化学的な細胞脱離の評価

1) 基板洗浄

カバーガラスを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分間浸漬し、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

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。

3) 細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を50 μ M細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 基板の滅菌

細胞接着性オリゴペプチドを修飾した金基板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滅菌し、 ϕ 35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

5) 細胞の播種

マウス線維芽細胞3T3を10 %FBS添加培地に 2.5×10^5 cells/mlの密度で懸濁し、1ディッシュあたり 2 ml 量、つまり 5.0×10^5 cells/mlの密度で細胞を播種した。

6) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-Air)のもとで24時間培養した。

7) 電位の印加

細胞培養基板のパッドとなる部分の細胞および水滴を綿棒で除去し、これを作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金板を対極とし、三電極系を形成した(Fig. 2)。これらをポテンシostatに接続し、PBS 中で定電位-1.0 V を一定時間印加した。

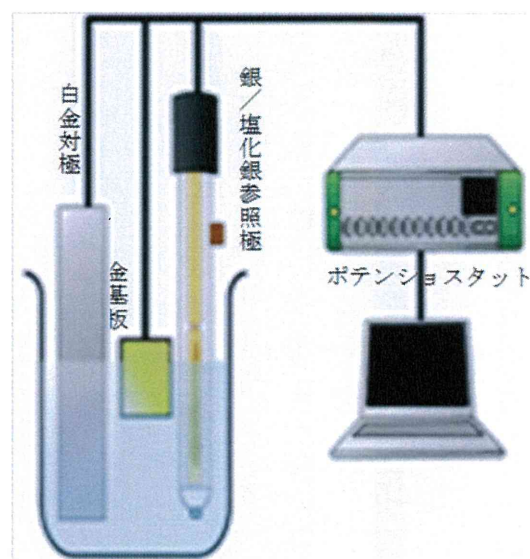


Fig. 2 三電極系および電気化学測定装置

8) 細胞数のカウント

電位印加後、基板を別のディッシュに移し、位相差顕微鏡画像をCCDカメラによって撮影した。撮影箇所は基板の中央付近を3箇所とした。撮影後、残存細胞数をカウン

トした。

2. 細胞シートの回収と評価

細胞接着性オリゴペプチド修飾基板上で細胞シートを形成し、本脱離技術によって細胞シートがそのシート構造を維持したまま脱離可能であるかを検討した。

2.1 実験装置と試薬・材料

【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 #2080A, HORIBA
- ・位相差顕微鏡 IX-71, Olympus
- ・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】

- ・カバーガラス
- ・細胞接着性オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP), Sigma-Aldrich Japan
- ・Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), D5796, Sigma
- ・ヒト間葉系幹細胞 hBMSC, Lonza, Switzerland
- ・コラーゲンタイプ1A, 新田ゼラチン

2.2 実験手順

2.2.1 細胞シートの電気化学的な脱離

1) 基板洗浄

カバーガラスを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分間浸漬し、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

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。

3) 細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を50 μ M細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 基板の滅菌

細胞接着性オリゴペプチドを修飾した金基板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滅菌し、 ϕ 35 mmの滅菌済ディッシュに入れた。

5) 細胞の播種

ヒト間葉系幹細胞hBMSCを10% FBS添加培地に 5.0×10^5 cells/mlの密度で懸濁し、1ディッシュあたり2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells/mlの密度で細胞を播種した。

6) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37°C, 5% CO₂-Air)のもとで72時間培養し、細胞シートを形成させた。

7) コラーゲンゲル層の形成

細胞シートを形成させた基板の周囲にPDMSの囲いを装着し、そこへコラーゲンゲル前駆体溶液(コラーゲンタイプ1A： $\times 10$ 培地：緩衝液 = 8:1:1)を300 μ l入れ、インキュベータ内で30分間静置し、ゲル化させた。

8) 電位の印加

PDMSの囲いの装着された基板を作用極、市販のAg/AgCl電極を参照極、白金板を対極として三電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続し、定電位-1.0 Vを5分間印加し、細胞シートを脱離させコラーゲンゲルへ転写した。

9) 細胞シートの生死染色

5 mg FDA/ml in DMSO溶液2 μ lと、40 μ g EB/ml in PBS溶液1 mlを混合し、これを回収した細胞シートの入ったディッシュに加え、37 $^{\circ}$ C下で5分間インキュベートした後、PBSで3回洗浄した。

10) 蛍光顕微鏡観察

FDA, EBを蛍光顕微鏡観察し、CCDカメラで画像を撮影した。

C. 研究結果と考察

3. オリゴペプチドの設計

3.1 QCMを用いたオリゴペプチド吸着量の評価

細胞非接着性オリゴペプチドの吸着量をFig. 3に示した。このオリゴペプチドが表面に四角配置で吸着していると仮定すると、ペプチド分子間の距離は約1.2 nmと見積もられる。この値は、アルカンチオール自己組織化単分子膜の分子間距離が約0.6 nmであること、およびアミノ酸のサイズがおおよそ0.5 nmであることを考慮すると十分に密に吸着していると判断できる。一般にタンパクは、直径10 nm~50 nm程度である。今回の吸着量からタンパクの非特異吸着を抑制できる可能性も示唆された。

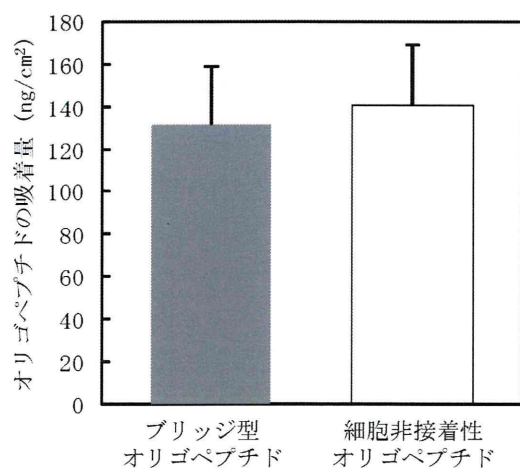


Fig. 3 金表面へのオリゴペプチド吸着量

また比較として、両末端にシステインを有するブリッジ型ペプチドの吸着量もFig. 3に示した。2つのオリゴペプチドの吸着量に大きな差は見られなかった。ただし、ブリッジ型オリゴペプチドは、両末端にチオール基を含むアミノ酸であるシステインを有するため、ジスルフィド結合によりペプチド分子同士が数珠つなぎとなっている可能性がある。そこで実際に次にタンパクの非特異吸着を評価した。

3.2 オリゴペプチド修飾表面へのタンパクの非特異吸着量の評価

Fig. 4に示すように、細胞非接着性オリゴペプチドおよびブリッジ型ペプチドを修飾した表面において、未修飾表面と比較してタンパク質の吸着は抑制された。ただし、減少割合には大きな差があり、フィブロネクチンの吸着において、ブリッジ型オリゴペプチドでは未修飾の55%、細胞非接着性オリゴペプチドでは6.8%、フィブリノーゲンの吸着では、ブリッジ型オリゴペプチドでは29%、細胞非接着性オリゴペプチドでは3.6%であった。フィブロネクチンは細胞外マトリックスの一種であり、他の細胞外マトリックスとの橋渡し役としての役割や、細胞表面のインテグリンレセプターとの相互作用を通して細胞接着に大きく関わる。また、フィブリノーゲンはフィブロネクチンと構造的に似ており、培養表面に素早く吸着する。したがって、この2つのタンパク質の吸着を抑制できる表面は、細胞接着抑制や、細胞のパターニングに有用である可能性が高い。

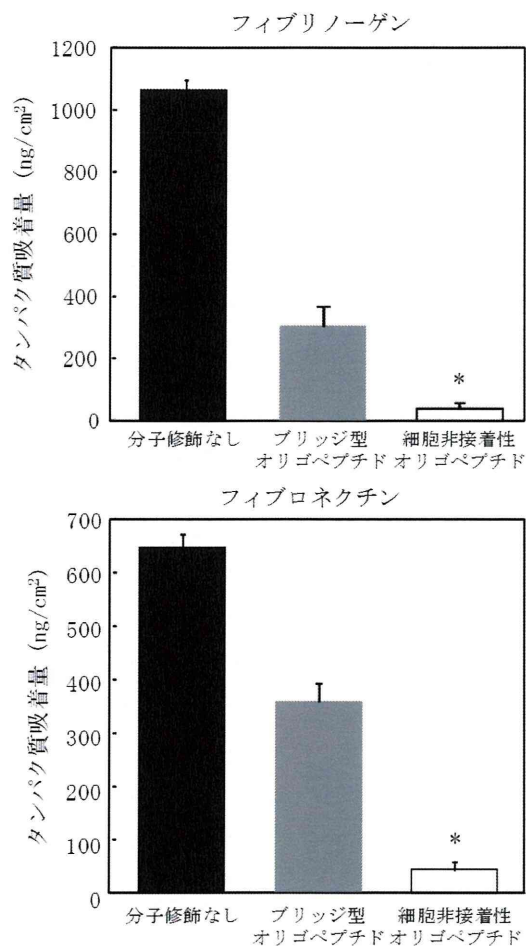


Fig. 4 オリゴペプチド修飾表面におけるタンパク吸着の抑制効果

3.3 接着・非接着オリゴペプチド混合修飾表面における細胞接着挙動

二種類のオリゴペプチドを特定の割合で混合し修飾した培養表面への細胞の初期接着数を評価した。その結果を、Fig. 5 に示す。細胞接着性オリゴペプチドの割合が100%～1%においては、接着細胞数に大きな違いはなかった。一方、0.1%以下では、細胞接着性オリゴペプチドの割合が減少するにつれ接着細胞数は減少した。また細胞形態についても、100%～1%では、細胞が強く伸展しているのに対し、0.1%以下では、より球形の形態を示した。以上より、予想通りオリゴペプチドの混合比が細胞接着に大きな影響を及ぼすことが示された。

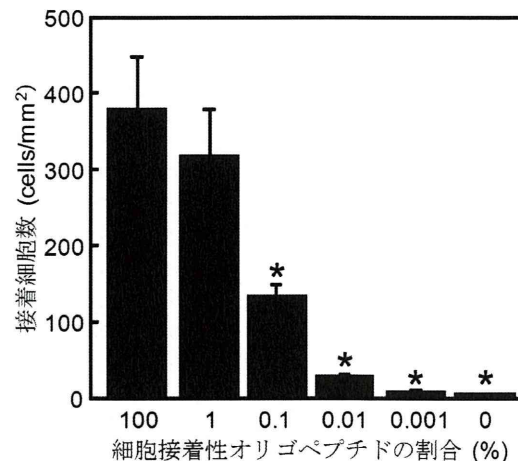


Fig. 5 細胞接着性オリゴペプチドの混合比と接着細胞数の関係

3.4 電気化学的な細胞脱離の評価

Fig. 6 に、電位を印加した際の細胞脱離の様子を示す。電位印加1分間で多くの細胞が脱離している。この変化を細胞数をカウントすることでより定量的に評価した結果をFig. 7 に示した。ここで、縦軸は電位印加前に基板に接着していた細胞数を100%としたときの残存細胞率 (%)を示しており、横軸は電位印加時間である。従来法であるブリッジ型オリゴペプチドを用いた場合は5分間の電位印加後にも10%ほどの細胞が残存している。また、アルカンチオール分子を用いた場合、5分間の電位印加で全ての細胞が脱離している。一方、細胞接着性オリゴペプチドを修飾した基板では、電位印加1分後には約70%の細胞が脱離し、2分後にはほぼ100%の細胞が脱離した。なお、コントロールとして分子を修飾していない基板上における細胞脱離も評価したが、この場合においても一部の細胞が脱離している。この原因として、細胞は吸着タンパクや細胞外マトリックスを介して金基板に接着しており、これらの一部が負電位の印加により除去されたことが考えら

れる。いずれにしても、新しく設計したオリゴペプチドを用いることで、より素早くかつ確実な細胞脱離が実現された。

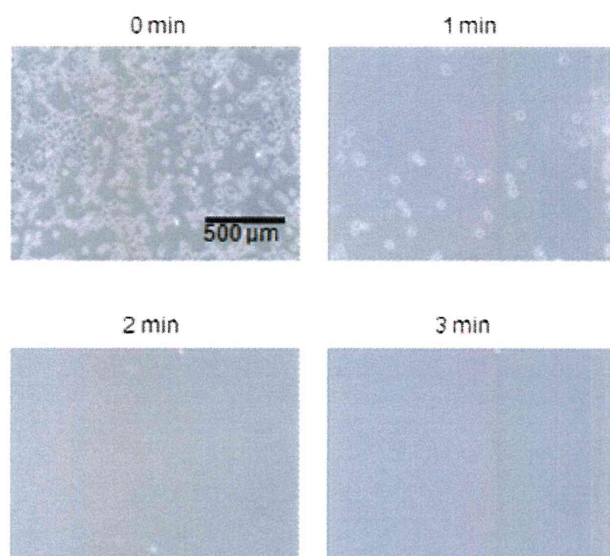


Fig. 6 電位印加時間と培養皿表面の細胞の様子

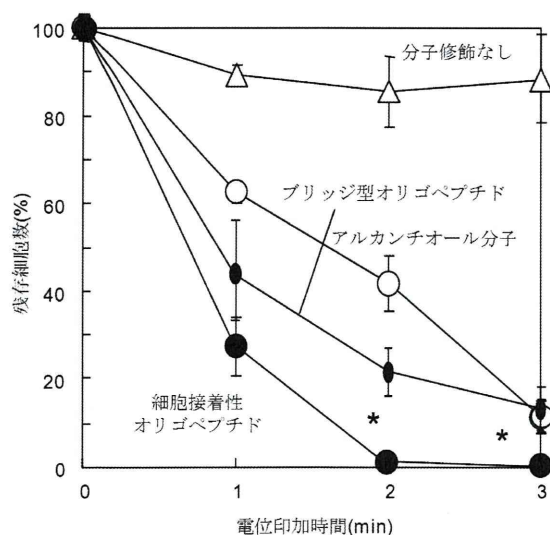


Fig.7 修飾分子による細胞脱離挙動の違い

4. 細胞シートの回収と評価

4.1 電気化学的な細胞脱離の評価

細胞接着性オリゴペプチド修飾基板上でヒト間葉系幹細胞 hBMSC を培養したとこ

ろ、3日間程度でコンフルエントとなり、細胞同士が互いに結合したシート状の組織が形成された。基板上に-1.0 Vの定電位を印加したところ、5分間の電位印加により細胞シートが回収された(Fig. 8 上)。脱離させた細胞シートは細胞間の結合を維持しており、本手法によりシート状の細胞組織の回収が可能であることが示された。これまで単離した状態で接着していた細胞は2分間でほぼ完全に脱離したが、細胞シートの脱離には5分間電位を印加した。これは、電極表面を細胞が覆うことによってイオンや物質移動が妨げられ、細胞自体が抵抗となり電位が均一にかからないのではないかと考えたためである。

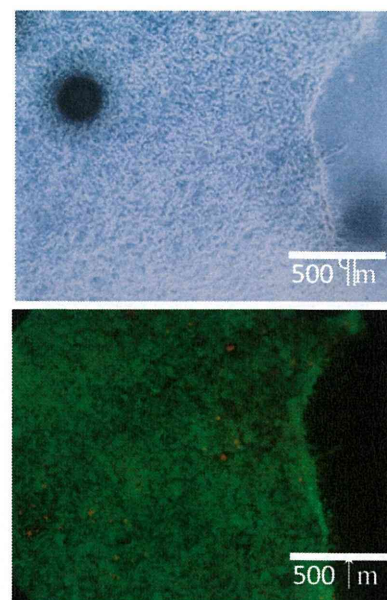


Fig. 8 電気化学的に脱離させた細胞シートの位相差顕微鏡写真(上)と生死蛍光染色写真(下)

電位印加により脱離させた細胞シートの生細胞/死細胞染色の結果を Fig. 8 下に示す。この画像より、死細胞は極わずかであり、ほとんどの細胞が良好な生存状態を維持していることが確認され、電位印加による細胞シートへの悪影響はほとんどないこ

とが示された。

D. 結論

本研究課題1年目にあたる平成23年度は、新しくオリゴペプチドを設計し、素早い細胞脱離が達成された。また、このペプチドを用いて、細胞シートを作製し、良好な生存状態を維持したまま回収可能であることを示した。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Mochizuki, T. Kakegawa, T. Osaki, N. Sadr, NN. Kachouie, H. Suzuki, J. Fukuda, Tissue Engineering Based on Electrochemical Desorption of an RGD-Containing Oligopeptide, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (IF=3.53)*, (2012) Doi: 10.1002/term.519
2. N. Sadr, M. Zhu, T. Osaki, T. Kakegawa, Y. Yang, M. Moretti, J. Fukuda, A. Khademhosseini, SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures, *Biomaterials (IF=7.88)*, 32(30), pp. 7479-90 (2011)
3. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, Spatio-temporal detachment of single cells using microarrayed transparent electrodes, *Biomaterials (IF=7.88)*, 32(28), pp. 6663-9 (2011)

2. 学会発表

国際学会

1. T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Surface Engineering for Rapid Cell Detachment by Using Electrochemical Desorption of a

Zwitterionic Oligopeptide Layer, MRS Fall Meeting & Exhibit 2011, 2011.12.1, Boston, USA

2. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, On-demand Detachment of Single Cells Using Microarrayed ITO Electrodes, Asian Biomaterials Congress, 2011.9.17, Busan, Korea
3. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, Electrical Detachment of cells for Engineering Capillary-Like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel, TERMIS-AP 2011, 2011.8.4, Singapore, Singapore

国内学会

1. 福田淳二、掛川貴弘、望月直人、大崎達哉、鈴木博章、両性イオンペプチド分子層の還元脱離を利用した細胞組織の構築、電気化学会第79回大会、2012.3.29、アクトシティ浜松（浜松市）
2. 福田淳二、望月直人、掛川貴弘、鈴木博章、自己組織化単分子膜の電気化学還元脱離を用いた細胞脱離技術、第33回日本バイオマテリアル学会大会、2011.11.2、京都府民総合交流プラザ（京都府）
3. 福田淳二、微細加工技術を利用した細胞培養チップ、第63回日本生物工学会大会（招待講演）、2011.9.28、東京農工大学（府中市）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

福田淳二、鈴木博章、稲葉里奈、岡村健太郎、出願人：筑波大学、培養方法及び培養装置、特許第4911516号、出願2007.5.31、登録2012.1.27

Inventors: J. Fukuda, H. Suzuki, N. Mochizuki, T. Kakegawa、Applicants: University of Tsukuba、Cell culture method and device、International Application No.:

PCT/JP2011/070533、International Filing
Date: 8.9.2011

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

細胞シートの作製および積層化
研究分担者 蛭沢 克己 名古屋大医学部

研究要旨

培養皿の材料として、ナノ孔を有する多孔質メンブレンを用いることで、細胞への酸素の供給を改善し、厚みのある組織を一括して構築し、回収・積層化した。まず、電気化学的な細胞脱離が多孔質メンブレン上でも有用であることを示した。そして、多孔質メンブレン上に細胞を高密度で播種し、2週間の培養によって通常の培養基板に比べて2倍以上の厚みのある細胞シートを構築した。また、電気化学的な細胞回収法に基づいて、多孔質メンブレン上に構築した細胞シート（厚さ 50 μm 、直径 2.5 cm）を支持体を用いることなく回収した。また、それらを重ね合わせることによって、厚さ 250 μm 程度の均質な多層化細胞シートを生体外で作製できることを示した。以上により、電気化学的な細胞回収法を多孔質メンブレンに応用することによって、生体外において厚みのある細胞シートを構築し、非侵襲的に回収および積層化する技術を確立した。

A. 研究目的

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、厚みを有する細胞シートの回収が求められる。サイズや厚みが大きくなれば、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、細胞へ酸素や栄養素が充分供給されないことなどが予想される。そこで、培養担体として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、細胞への酸素供給を改善し、なおかつ広範囲の細胞シートに均一に電圧が印加できる系を考案した。これらより、厚みのある細胞シートを形成させ、かつ回収・積層化する技術の確立を目的とした。

B. 研究方法

1. 多孔質メンブレン上からの細胞脱離

多孔質メンブレンとして、本研究ではセルカルチャーインサート(Cell Culture Insert)を用いた。このメンブレンは、ポリエチレンテレフタレート (PET) 製のフランジ部分とメンブレンから成る。メンブレンはエッチングによって数百ナノメートルの孔が空けられており、専用の培養プレートを用いることによって、液体培地に含まれる成分を細胞の管腔側と基底膜側の両方から供給でき、どちらかと言えばより生体内の環境に近い細胞培養を実現することができる。

この透過性メンブレンの孔サイズを変えることによって、細胞遊走・細胞浸潤アッセイや薬物透過アッセイ、2種類の細胞の共培養系を構築することもできる。とりわけ

本実験では、細胞がプレート側に通り抜けられないように、 $\phi 400$ nmのポアサイズのものを選択した。さらに、インサートとウェル間の物質の透過量を十分に確保するために、ポア密度の高いHDタイプのものを用いた(Fig. 1)。ここでFig. 1は、多孔質メンブレンにスパッタリング装置を用いてCrを1分間スパッタした後、Auを2分間スパッタしたものを、電子顕微鏡にて撮影したものである。スパッタ後も直径約400 nmの貫通孔を形成しており、この孔からの培地供給によって細胞への酸素供給の律速が改善されると考えられる。Fig. 2は金をスパッタしたメンブレン容器の外観であり、シリコンリングは容器を固定するために使用した。

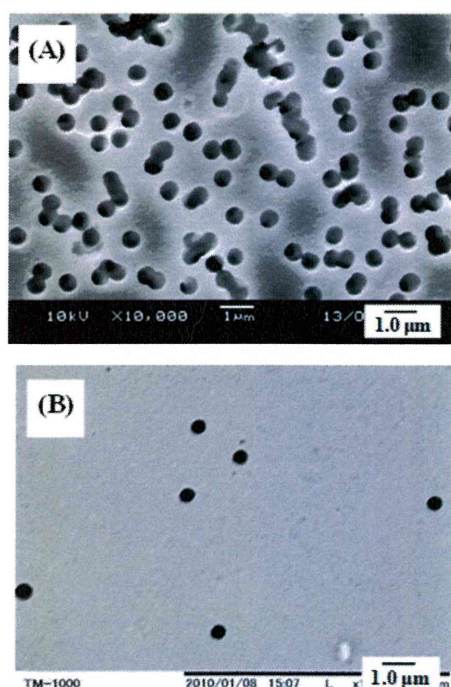


Fig. 1 多孔質メンブレンの電子顕微鏡写真
(A)高密度タイプ、(B)低密度タイプ

この多孔質メンブレンが細胞脱離に利用可能かどうかを評価するため、メンブレン上にオリゴペプチドを介して接着させたマウス線維芽細胞を、電気化学的に脱離させ、

定量的評価を行った。

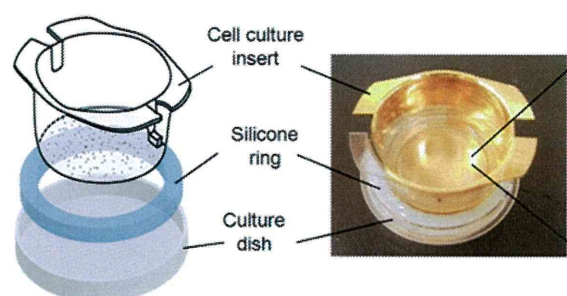


Fig. 2 金をコートした多孔質メンブレンの写真および培養システム

1.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD(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
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS-, GIBCO
- 2%パラホルムアルデヒド, Wako.
- 2.5%グルタルアルデヒド, Fluka.
- 1% 四酸化オスミウム(O_3O_4)PBS-溶液, CHIYODA JYUNYAKU Inc.

[装置]

- スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ポテンシostat/ガルバノスタット: 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
- ・電子顕微鏡ED-SEM, 日本電子
- ・Miniscope : 日立卓上顕微鏡TM-1000, 日立ハイテク

1.2 実験手順

1.2.1 シングル細胞の脱離

1) Au/Cr層のスパッタ

細胞培養用のCell Culture Insertをスパッタリング装置のチャンバーに装着し、出力100W、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。

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

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(vs Ag/AgCl)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続けた。

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

脱離した細胞の入った計7本の遠心管を、遠心分離機で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10 mLとして懸濁した。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。

1.2.2 電子顕微鏡による付着細胞の観察

1) 組織の固定

培養中のサンプルの培地を捨て、基盤をPBS-で洗浄し、2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒドPBS-溶液中に室温で1時間浸漬させた後、PBS-で洗浄した。

2) 細胞膜浸透化処理

1% 四酸化オスミウム(O₃O₄)PBS-溶液に基盤を浸漬させ、4°Cの冷蔵庫に1時間放置した後、PBS-で洗浄した。

3) エタノール脱水

30%、50%、70%、90%エタノールに、それぞれ室温で5分間ずつ基盤を浸水させることで徐々に脱水を行った。最後に100%エタノールを用いて、室温で5分間の脱水を

3回行った。

2. 細胞シートの脱離・積層化

多孔質メンブレン上で細胞シートを構築し、通常の培養ディッシュ上において形成させた細胞シートと組織学的な比較および機能評価を行った。また、構築した細胞シートを回収し、それらを重ね合わせることで多層化細胞シートを作製した。さらに回収・積層化した細胞シートを、免疫染色等により、形態や機能の組織学的評価を行った。

2.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, 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
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS-, GIBCO
- QIAmp DNA Mini Kit from QIAGEN, USA.
- FDA: fluorescent diacetate, Wako Pure Chemicals.
- EB: ethidium bromide, Wako Pure Chemicals.

[装置]

- 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・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.

2.2 実験手順

2.2.1 多孔質メンブレン上での細胞シートの形成

1) ガラス基板の洗浄

濃硫酸: 過酸化水素水= 3:1のピランハ溶液をガラス基板に滴下し、室温で20分間放置後、純水で洗浄した。これを2回繰り返した。

2) 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にてガラス基板と2種類の多孔質メンブレンに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。

3) オリゴペプチドの固定

0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成した多孔質メンブレン、ガラス基板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。

4) 基板の滅菌

オリゴペプチドを固定したガラス基板と多孔質メンブレンを、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。

5) 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。

6) 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3週間培養した。また、メンブレンφ400 nm HDのものは、3日間・1週間・2週間・3週間それぞれ培養した。

7) 組織の固定

培養した細胞シートを充分量の組織固定液である4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液に浸漬させ、4°Cで一晩以上置いた。

8) 切片の作製およびH.E.染色

固定された組織を4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液で満たし、液が漏れないように封をして、株式会社ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部 病理部に送付し、切片作製およびH.E.染色を委託した。

2.2.2 細胞シートの回収・積層化

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

0.5mM 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 5.0×10^5 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°C、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(vs Ag/AgCl)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、φ3 cm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。最後に、浮遊した細胞シートをピペットで回収した。

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30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。

9) 染色溶液の調製

・FDAストック溶液：5mg FDA/ml DMSO
・EBストック溶液：40μg EB/ml PBS
上記溶液を調製した後、EB ストック溶液1 ml、FDAストック溶液2：1を混合し、これをFDA / EB染色溶液とした。

10) 組織の生細胞/死細胞の染色

サンプルの培地を捨て、PBSで洗浄し

FDA/EB溶液に細胞シートを浸漬させ、CO₂インキュベータ内で5分間放置した後、PBS-溶液で洗浄した。蛍光顕微鏡により蛍光観察を行った。

C. 研究結果と考察

3. 多孔質メンブラン上からの細胞脱離

3.1 シングル細胞の脱離

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. 3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。

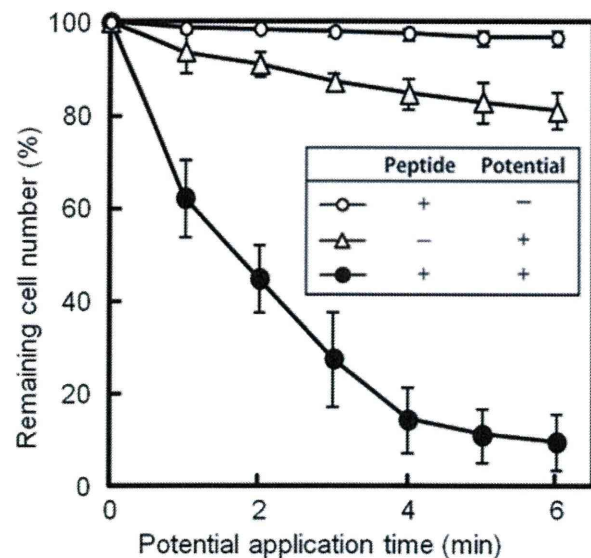


Fig. 3 多孔質メンブランからの細胞脱離挙動

オリゴペプチドを修飾した基板を使用し、-1.0 V(vs Ag/AgCl)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分後もほとんどの細胞は基板に接着した状態であった。したがって、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したものと考えられる。

一方、オリゴペプチドを修飾していない基板を使用し、-1.0 V(vs Ag/AgCl)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。

3.2 電子顕微鏡による付着細胞の観察

多孔質メンブラ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ラン表面を、電子顕微鏡にて観察した。Fig. 4(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ラン表面の電子顕微鏡画像である。これらにより、メンブラン上の細胞がオリゴペプチドの脱離によって、電

電気化学的に脱離されることが確認された。

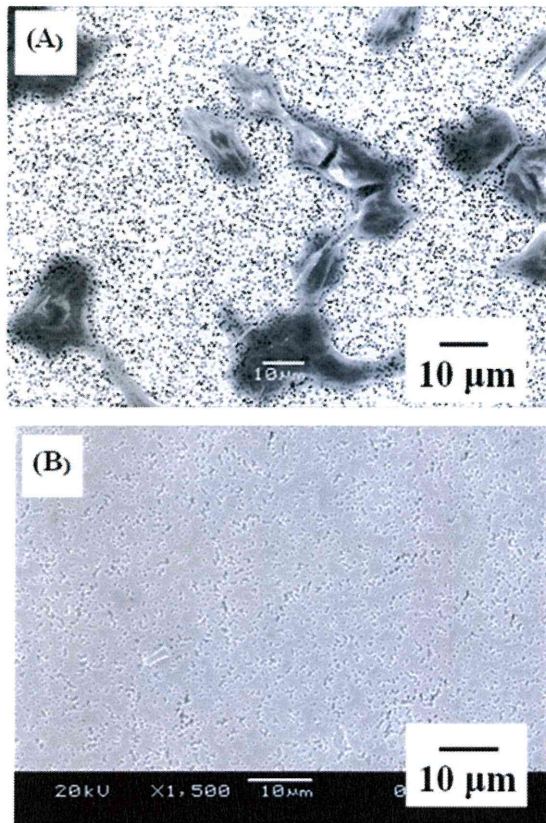


Fig. 4 多孔質メンブレン上に接着した細胞の電子顕微鏡写真。(A)電位印加前 (B)電位印加5分後

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、細胞数変化をカウントした。その結果、トリプシン処理によって回収した細胞と比較しても、増殖能は変わらないことが分かった。さらに、この結果から倍加時間を算出したところ、電位印加によって回収した細胞の倍加時間は 15 ± 1.6 hr、トリプシン処理によって回収した細胞の倍加時間は 16 ± 1.5 hrとなり、差がないことが示された。さらに文献値によると倍加時間は 16.6 hrであることから、文献値と比

較しても増殖能は変わらないことが確認できた。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。

以上より、多孔質メンブレン上で線維芽細胞の単細胞脱離を評価した結果、5分以内にはほぼ全ての細胞が脱離した。脱離させた細胞を再培養することによって、良好な生存状態と増殖能を確認できた。すなわち、メンブレン上においてもオリゴペプチドの電気化学的細胞脱離は有用であることが示された。

4. 細胞シートの脱離・積層化

4.1 多孔質メンブレン上での細胞シートの形成

3種類の基板、すなわち多孔質メンブレン $\phi 400$ nm(高密度)、多孔質メンブレン $\phi 400$ nm(低密度)、ガラス基板を用いて、マウス線維芽細胞を2週間培養することで、細胞シートを構築した。Fig. 5は、それぞれの細胞シートの組織切片をヘマトキシリン-エオジン(H.E.)染色したものである。この染色法では、細胞核はヘマトキシリンによって濃紫に、細胞質はエオジンによって淡紫に染められる。通常ガラス基板では単層にしか成長しない線維芽細胞が、多孔質メンブレンを用いることによって、より厚みのある細胞シートが構築された。これは、通常ガラス基板では培地は細胞の上面のみにしか接することができないが、多孔質メンブレンでは 400 nmの貫通孔を通して、細胞の上面・下面の両面から酸素が供給され、増殖が促進されたためであると考えられる。特に、多孔質メンブレン $\phi 400$ nm(高密度)上で培養した細胞シートは、厚さ 50 μm にも達しており、これは人間の角膜最外層である角膜上皮とほぼ同等の厚みである。

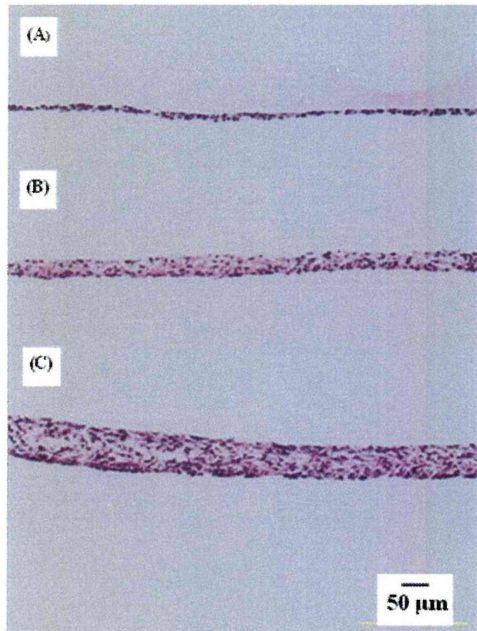


Fig. 5 マウス線維芽細胞シート切片のH.E染色。(A)ガラス基板上で培養 (B)メンブレンφ400nm上で培養 (C)メンブレンφ400nmHD上で3週間培養

次に、培養日数と細胞シート厚さの関係を評価するため、多孔質メンブレンφ400 nm(高密度)上で3日間・1週間・2週間・3週間それぞれ細胞を培養し、構築した細胞シートの組織切片をH.E.染色した(Fig. 6)。ここで、細胞はマウス線維芽細胞であり、播種密度は 1.0×10^6 cellsである。培養3~7日間で2層から3層の細胞シートが構築され、2週間で50 μm以上の厚みが形成された。2週間と3週間の培養を比較すると、組織切片の厚みという観点からは、大きな変化は観察できなかった。このことから、多孔質メンブレンφ400 nm(高密度)上で細胞シートを構築するには、2週間程度で十分であることが分かった。

さらに、メンブレン上と通常のポリスチレン上の培養にともなう細胞数の変化を、DNA抽出法によって測定した (Fig. 7)。メンブレン上の線維芽細胞は、最初の6日間で

非常に高い増殖能を示し、10日後には平衡状態に達した。一方で、通常のポリスチレン平面基板上的細胞は、3日目までは高い増殖能を示していたが、6日目以降は増殖は停止した。これらは、メンブレンを用いることによって、細胞への酸素供給の律速が改善されたことに起因すると考えられる。

以上より、多孔質メンブレンでは、約2週間の培養が、厚みのある細胞シートの構築に有用であることが示された。

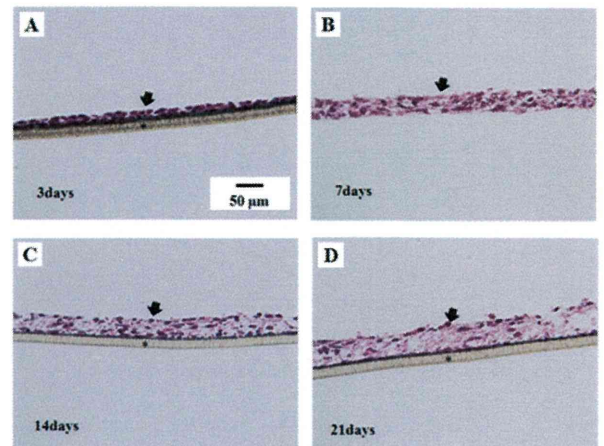


Fig. 6 メンブレンφ400 nmHD上で(A)3日間 (B)1週間 (C)2週間 (D)3週間培養したマウス線維芽細胞シート切片のH.E.染色

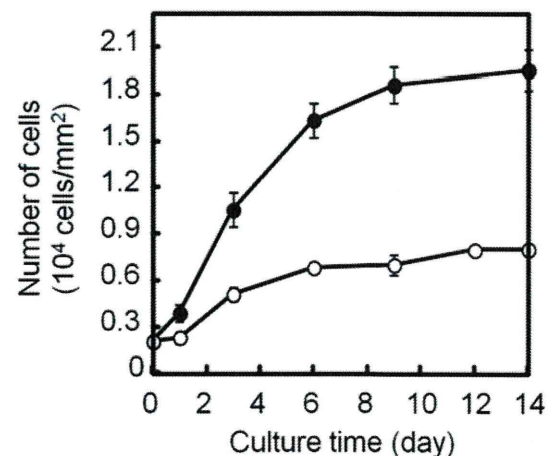


Fig. 7 細胞シートを構成する細胞の細胞数変化 (●メンブレン上、○通常のポリスチレン基板上)