

研究報告書

「膜マイクロマシニング技術を基盤とする共創的再生医療プラットフォームの構築」

研究タイプ: 大挑戦型(増額有)

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 池内 真志

1. 研究のねらい

生体外で組織・臓器を再生するために、細胞をスポンジ状やゲル状の生分解ポリマー内で培養し、3次元的な組織を構築する試みが多数なされてきた。しかし、mm オーダーの厚みを持つ3次元的な組織や、膵臓や肝臓のような複雑な構造を持った組織の生体外での再生は、未だ成功していない。一般に、組織の厚さが 0. 2mm 程度になると、組織内部に栄養や酸素を届けることができず、ネクロシスを起こす。これを防ぐには、再生させる組織内部に、生体の血管に相当する微細な流路網を張り巡らせる必要がある。そのために、世界中で多くの研究が行われているが、未だ十分な成功例はない。従来の研究は、ほぼ全て「ナノファイバーや、ゲルなどの足場材料の一部を除去して流路網を作る」というコンセプトに基づいている(Fig.1a)。しかし、高空隙率・高含水率で、強度の低い足場の内部に、微細な流路網を構築し、長期間維持することは、原理的に困難である。

それに対して、本研究では「予め用意した血管状の微細流路(人工毛細血管床)の周囲に、ナノファイバー構造を持つ足場を構築する」というコンセプトで研究を進めている(Fig.1b)。その主なメリットは以下の3点である。①予め流路が存在するので、初期から高密度な細胞培養が可能。②血管と実質部分との複合機能化が容易。③流路は生体内の血管と同様、膜で作られているため、移植時に生体側の血管との吻合が可能。

このコンセプトに基づき、新原理薄膜加工技術による 3 次元マイクロ流路「人工毛細血管床」と、静電力と相分離現象を利用した「生分解ナノファイバーカプセル」の、2つの膜マイクロマシニング技術を融合させ、幹細胞の分化、増殖をコントロールすると同時に、デバイスから細胞への一方通行のコントロールではなく、細胞・組織の成長過程に対応して、デバイス自らも内部構造、誘導因子放出機能等を更新してゆく、共創的組織再生プラットフォームを構築する。それにより、従来、不可能であった、1cm 以上の厚さを持つ組織の生体外での再生を目指す。

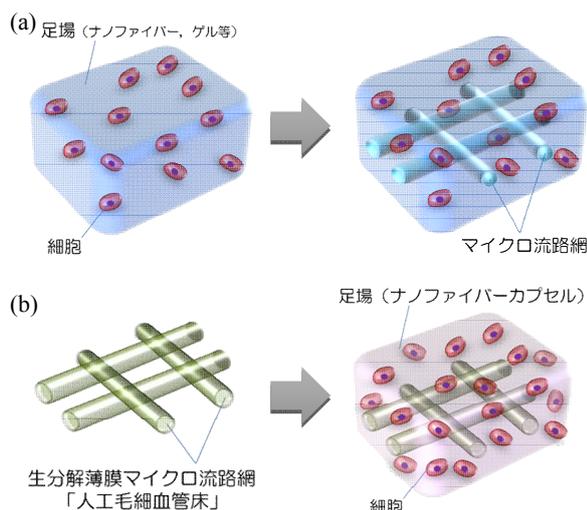


Fig.1 (a) 従来の流路構造を含む組織再生用足場の構築手法概念図 (b) 本研究で提案する、人工毛細血管床とナノファイバーカプセルに基づく足場構築手法概念図

2. 研究成果

(1) 概要

生体外で血管網を含む厚い組織や臓器の再生を目指し、生体高分子膜で作製された人工毛細血管床と、生分解性ポリマーで作製されたナノファイバーカプセルという、独自の膜マイクロマシニング技術を用いた新たな細胞培養足場の開発を進めてきた。幹細胞の分化、増殖をコントロールすると同時に、組織再生の段階に応じて、足場構造や誘導因子放出などの機能を更新できる、組織培養プラットフォームを構築することを目標とし、下記 A~C3つの研究テーマに取り組んだ。

(A) コラーゲンを用いた膜マイクロ流路の作製プロセス

(B) ナノファイバーカプセルのパターニング

(C) 胚様体大量生産デバイスの開発

細胞培養プラットフォーム作製の基盤技術(A, B)については概ね確立できた。特に、A の膜マイクロ流路の作製技術については、当初予定していた生分解性樹脂では問題が発生したため、これに替わるコラーゲンビトリゲルを用いた流路網の作製技術を世界で初めて開発した。また、研究過程で、幹細胞の分化誘導を効率化するための胚様体培養デバイスを独自に開発し(テーマ C)、外部の研究者の要請を受けて、機能組織の再生への応用を行うとともに、産学連携により実用化を進めている。

(2) 詳細

(A) コラーゲンを用いた膜マイクロ流路の作製プロセス

人工毛細血管床の流路壁の厚さは数 μm で、透水性を有し、細胞は流路壁面に保持されるが、ガスや培地成分は流路内外を透過する必要がある。人工毛細血管床の実現には、自立した膜構造のマイクロ流路網の加工技術が必要不可欠である。当初、材料として、多孔質ポリ乳酸膜を用いていたが、生体内で炎症により流路構造が破壊される問題が生じた。そこで、生体の血管壁の主成分であるコラーゲンをを用いることに方針変更した。コラーゲンは、従来の用途では、緩衝液を加えて、高含水率のゲルとして用いられる。しかし、ゲル状態では強度が低く、厚さ数 μm の膜構造の微細な流路を維持できない。一方、再構成したコラーゲンゲルを数週間静置して、自然乾燥させることで、高密度の繊維構造を有するコラーゲン薄膜(コラーゲンビトリゲル)を得る手法が、竹澤らにより報告されている[1]。しかし、この手法では、対象が平坦な膜や、糸、円筒などの単純な形状に限定され、複雑な微細流路網を作製することはできない。また、一般的な樹脂薄膜の微細成型手法としては、熱インプリントや、有機溶媒に溶解して注型する等の方法があるが、生体高分子はこれらのプロセス条件下では変性するため、適用できない。

そこで、我々はコラーゲンビトリゲルを用いて、3次元構造を作製する新たな手法「Centrifugal Imprinting during Vitrification (CIV) プロセス」を開発した(Fig.2)。本プロセスでは、まずコラーゲンの酸性溶液と緩衝液を微細鋳型内に注入して、ゲル化させる。この段階で、コラーゲンの細繊維構造が自発的に構築される。このゲルと鋳型を、チャンバー内に設置された回

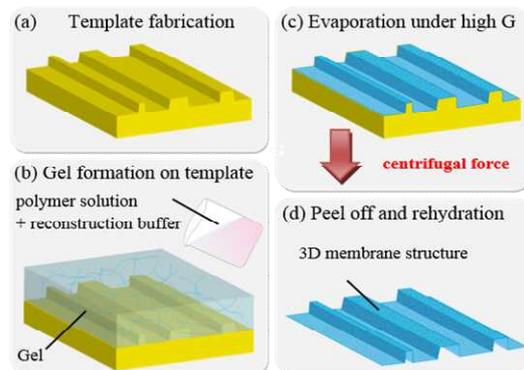


Fig. 2 減圧下遠心インプリント法によるコラーゲンビトリゲル薄膜を用いた膜マイクロ流路の作製

転バレルに固定して遠心力を加えるとともに、チャンバー内を徐々に減圧する。この過程で、コラーゲンゲル中の自由水と結合水が除去され、コラーゲン繊維は鋳型表面に堆積し、鋳型の表面形状に沿って乾燥したコラーゲン薄膜が得られる。別途用意しておいたコラーゲン薄膜で上面をシーリングし、最後に、薄膜を鋳型から取り外して膜構造の微細流路を得る。本プロセスの原理を実証するため、内径 100 μm 、一辺 200 μm のハニカム状の人工毛細血管床を作製した(Fig.3a)。薄膜の表面、裏面共に、流路網が正確に転写されていた(Fig.3b、c)。表面に見られる多数の長繊維構造は、再構成されたコラーゲン繊維と考えられる。着色した水溶液を流路網の入り口から注入した結果、全ての流路の導通を確認した(Fig.3d)。

成型した人工毛細血管床の細胞培養適性を検証するため、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を培養した。比較対象として、従来手法である、コラーゲンの酸性溶液に水溶性カルボジイミドを加えて化学的に架橋して乾燥させた薄膜を使用した。CIV プロセスにより作製した薄膜では、従来手法の 2 倍程度の細胞増殖率が得られた(Fig.4a)。また、細胞の生死を判別する蛍光試薬で染色した結果では、ほぼ全ての細胞が緑(生細胞)に染色され、いずれの薄膜でも赤く染色された死細胞はほとんど見られなかった(Fig.4b、c)。この結果から、CIV プロセスと従来の化学架橋プロセス、いずれの方法により作製された薄膜も、細胞毒性は有さないと考えられる。毒性に差がないにも関わらず、CIV プロセスによる薄膜上での増殖率が大きく上回った理由は、CIV プロセスで再構成されたコラーゲン繊維構造が細胞接着を促し、さらに、接着刺激により足場依存的増殖が亢進したためと考えられる。これにより、従来、培養には理想的でありながら微細加工が困難であった、コラーゲンをを用いたマイクロデバイスが実現可能となった[2]。

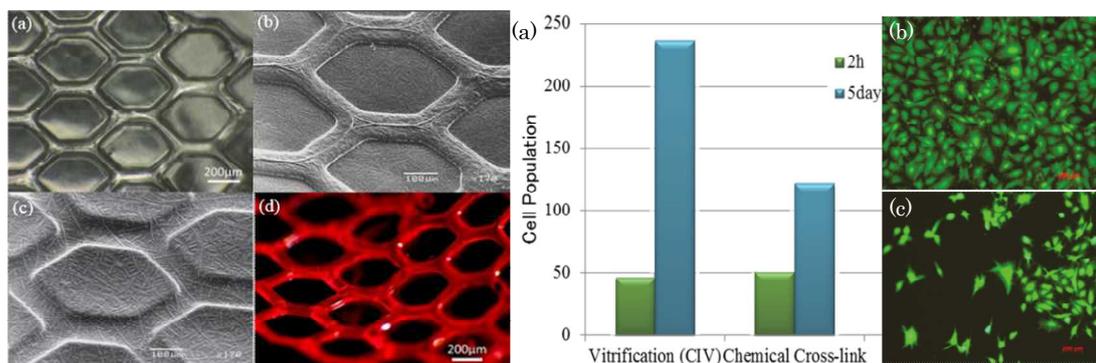


Fig.3 (a) 人工毛細血管床外観 (b) 表面 SEM 像 (c) 裏面 SEM 像 (d) 注水後の外観

Fig. 4 (a) HUVEC 培養試験 (b, c) 新手法 (b) と従来手法 (c) により作製したコラーゲン薄膜上での HUVEC 培養。正細胞のみ着色。

(B) ナノファイバーカプセルの2D・3D パターニング

人工毛細血管床の周囲に組織を構築する際の、細胞を支持する足場として、我々が開発してきた生分解性ナノファイバーカプセルを充填する(Fig.5)。ナノファイバー構造は、細胞接着や細胞増殖を積極的に促すことが知られているが、従来は、厚みのない不織布構造しか作製できず、立体的な構造作製は困難であった。それに対して、我々が開発してきたナノファイバーカプセルは、ナノファイバー同様の多孔質表面と、カプセル構造による高い比容積率、という2つの特長を持つ。よって、高い細胞接着性を維持しながら、厚みのある構造を作製することができる[3]。

生分解性ナノファイバーカプセルの生成は、独自に開発してきた相分離支援エレクトロスプレー法を用いる。一般に、エレクトロスプレーでは、高電圧を印加した金属ノズルから、材料とな

る高分子の溶液を噴霧することで、連続的に微粒子が生成される。この際に、特定の溶媒組成で、高湿度環境中で噴霧を行うことにより、飛行中の微小液滴表面で相分離が起こり、直径10-20 μm 程度のナノファイバーカプセルが生成される。本プロジェクトでは、足場内での細胞の分化誘導を実現するために、各種薬物を徐放化したナノファイバーカプセルを空間的にパターンニングすることを目指している。検証実験として、エレクトロスプレーに使用するポリ乳酸溶液に蛍光試薬を混合し、溶液組成を調整して、蛍光試薬を含有するナノファイバーカプセルの作製を行った。蛍光試薬は有機相であるファイバー骨格に取り込まれ、カプセルの殻が赤く蛍光していることが確認できる。2種類のカプセルのパターンニングは、第1のカプセルを堆積させた後、レーザ除去加工により所定パターンの溝を形成し、第2のカプセルを溝に充填することで行った。蛍光試薬を含有するカプセルの層と含有しないカプセルの層を任意の間隔で配置することに成功した(Fig.6)。パターン形状はレーザで自由に加工できるため、目的の細胞や組織に合わせた3次元パターンの設計が可能である。これにより、三次元的な足場内での局所的な分化誘導を行う基礎技術を確立した[4]。

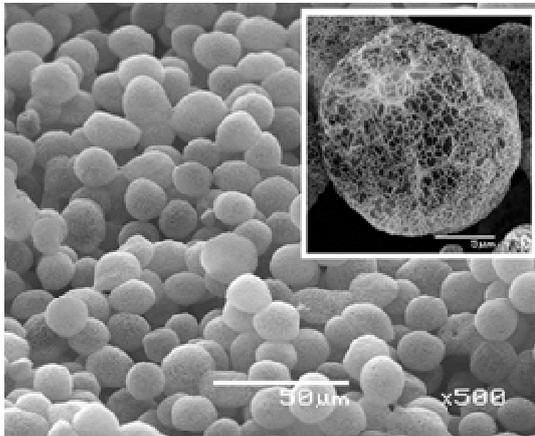


Fig.5 相分離支援エレクトロスプレーにより生成した生分解性ナノファイバーカプセル(枠内は拡大像)

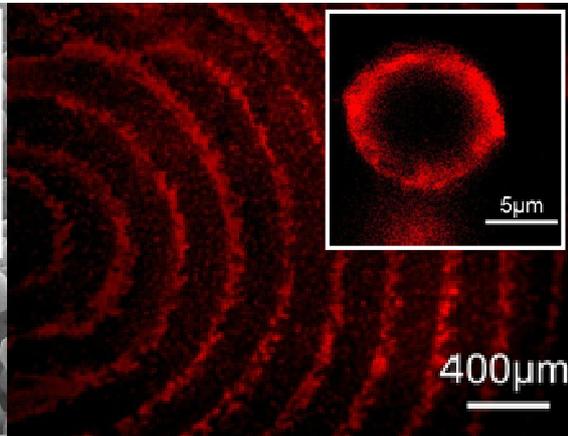


Fig.6 蛍光試薬をドーブしたナノファイバーカプセルをパターンニングした結果(枠内はカプセル断面の拡大像)

(C) 胚様体大量生産デバイスの開発

ES/iPS 細胞から各種細胞へ分化誘導するには、浮遊系で ES/iPS 細胞を培養して、胚様体と呼ばれる直径200~300 μm の球状の組織を形成させた後、接着系に展開して、さらに分化誘導を進めることが一般的である。胚様体の形成には、従来、ハンギングドロップ (Hanging Drop: HD) 法が用いられている。この手法では、培養皿の蓋の裏側に、細胞懸濁液を滴下し、蓋から懸垂された液滴の中で細胞を培養する。液滴内の細胞は、接着すべき足場が存在しないため、凝集塊を形成して成長する。しかし、HD 法の操作は極めて煩雑で、均一な胚様体を得るには熟練を要し、かつ、大量の胚様体形成を行うには適さない。そこで、3次元微細加工技術を応用して、新たな胚様体形成デバイス (Tapered Stencil for Cluster Culture: TASCL) を開発した。

TASCL は、Polydimethylsiloxane (PDMS) シートに、500 μm 四方の貫通孔を多数配置したもので、貫通孔の壁面は底部に向かって滑らかに傾斜している (Fig. 7)。PDMS は自着性を有するため、通常の培養皿や、温度応答性培養皿、多孔メンブレン、マトリゲルなどに接着剤を用いることなく貼付できる。TASCL 上に細胞を播種すると、細胞は斜面上を貫通孔の底面に向かって沈降する。TASCL の上面には平坦な部分が全く無いため、播種した細胞は均等に各孔に分配される (Fig. 8)。これにより、一回の播種操作で、1cm 四方あたり400個という、大量の均一な胚様体が形成できる仕組みである。TASCL の素材である PDMS は疎水的であるが、両親媒性高分子で表面を親水化し、細胞の接着を抑制している。そのため、沈降した細胞群は自ら凝集し始め、最終的に球状の組織体を形成する。マウス iPS 細胞を用いた実験では、播種後1日で明瞭な輪郭を持つ胚様体が形成され、単位面積当たりの生産性、形状均一性ともに、従来法と比べて極めて優れていることが示された[5]。また、宮本らとの共同で、肝細胞スフェロイドを用いた創薬スクリーニング用途への展開も図り、一度の操作で、複数条件の分布形状と密度下でのスフェロイド培養を実現した[6]。

これらのデバイスは、当初、手作業で注型加工していたが、共同研究先からの提供依頼が多くなったため、大量生産手法が必要不可欠となってきた。そこで、企業と共同で PDMS 系の素材をシート状に塗布して半硬化状態とした後に、超硬鋳型でインプリントとパンチングを行い、その後、鋳型内で加熱して完全に硬化させる成型手法を新たに開発した (Fig. 9)。鋳型の構造及び、インプリント条件を最適化することで、正確な転写を実現した。また、新素材細胞毒

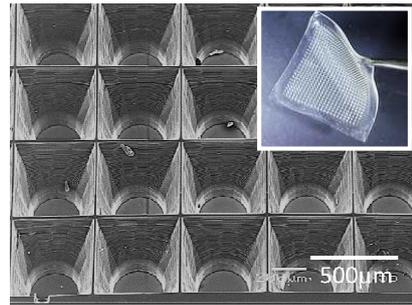


Fig. 7 TASCL のマイクロウェル部分の SEM 像 (枠内は全体像)

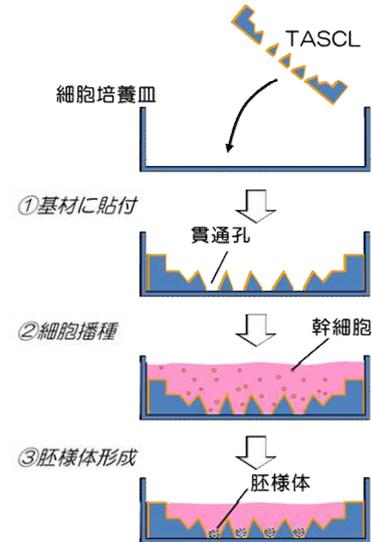


Fig. 8 TASCL 上での胚様体培養の流れ

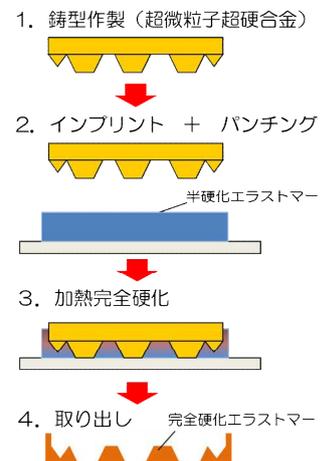


Fig. 9 TASCL の新規作製手法

性、細胞接着性の制御手法についても確立し、実用化の目処がついた。

- [1] T. Takezawa, K. Ozaki, A. Nitani, C. Takabayashi, T. Shimo-Oka, *Cell Trans.* 13, pp.463-73, 2004
- [2] M. Ikeuchi, K. Ikuta, *Proc. IEEE MEMS 2013*, pp.291-294, 2013
- [3] M. Ikeuchi, R. Tane, K. Ikuta, *Biomedical Microdevices* 14(1), pp.35-43, 2012
- [4] R. Tane, M. Ikeuchi, K. Ikuta, *Proc. IEEE MEMS 2011*, pp.1047-1050, 2011
- [5] H. Yukawa, M. Ikeuchi, H. Noguchi, K. Ikuta, S. Hayashi, *Biomaterials* 32(15), pp.3729-3738, 2011
- [6] Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, *Cell Medicine* 7(2), pp. 67-74, 2015

3. 今後の展開

本事業では、組織を生体外で構築するための組織再生プラットフォームを開発してきた。基盤技術として、各種生分解性ポリマー薄膜及び生体高分子膜の3次元微細成型技術や、相分離エレクトロスプレーによる多孔体のパターンニング技術を確立した。これらの技術を用いて作製した人工毛細血管床での長期培養も実現した。今後、人工毛細血管床と細胞との共培養系を1cm程度の厚さに積層し、長期の生存性や機能評価を行う。また、胚様体大量生産デバイスについては、胚様体経由の各種細胞への分化誘導の検証を進めるとともに、肝スフェロイドやニューロスフェア培養への適用も進める。さらに、本事業で確立した、ポリマー薄膜やナノファイバーを用いた3次元マイクロ・ナノ構造作製技術を応用し、異分野の研究者、企業とも積極的に共同研究を進める。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本事業では、生体外で血管網を含む厚い組織や臓器の再生を目指し、高分子膜で作製された人工毛細血管床と、生分解性ポリマーで作製されたナノファイバーカプセルを用いた新たな細胞培養プラットフォームの開発を進めてきた。人工毛細血管床の素材として、当初、生分解性樹脂を用いていたが問題が生じることが判明し、生体高分子に変更した。そのため、新たな加工プロセスを考案・開発する必要が生じたものの、プラットフォームの要素技術は期間内に確立できた。大挑戦型課題として、生体外で1センチ以上の厚みを有する組織の再生を目指したが、分化誘導手法や3次元培養下での均一性維持の課題があり、期間内での実現ができなかった点は私の力不足である。今後、実現に向けてさらに努力したい。また、5年という期間と、本領域の総括や参事の柔軟な運営方針のおかげで、当初計画以外の研究にも積極的に取り組むことができた。幹細胞の3次元培養下での新しい現象の発見や、独自開発した加工技術・デバイスを核とした異分野融合研究、企業と共同での実用化研究でも成果を挙げることができた。とりわけ、本事業を進める中で生まれた3次元大量培養デバイスは、均質な細胞や組織を低コストで生産することを可能とし、今後、創薬スクリーニングや再生医療の実用化に貢献できると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

「トップダウンで作製した血管状微細流路(人工毛細血管床)の周囲にナノファイバー構造のマトリックスを構築した立体細胞培養システムの構築」を目指して研究を進めた。それは、①高密度な細胞培養が可能、②血管と実質部分との複合機能化が容易、③移植時に生体側の血管との吻合が可能というメリットを有しているからである。初めの3年間で、独自のトップダウン膜微細加工技術を駆使して従来不可能とされていたコラーゲンの加工を行い、世界最先端に位置する三次元細胞培養組織体の構築に成功した。この手法をさらに発展させ、4年目以降は従来に比べ10倍以上の効率でiPS細胞の胚様体を作製できるアレイの開発に成功した。さらに、生体外で血管網を含む厚い組織や臓器の再生を目指し、独自の膜マイクロマシニング技術を用いて生分解性ポリマー製のナノファイバーカプセル型細胞培養足場を開発した。この装置は幹細胞の分化、増殖をコントロールするだけでなく、組織再生の段階に応じて足場構造や誘導因子放出などの機能を更新する能力を持つことを証明した。これらの研究は組織再生のブレークスルー技術になると高く評価されており、製品化を進めるなど実用化の成果も出ており、今後も引き続き飛躍的成果が得られると期待される。

本研究者は工学(微細加工)が専攻であり、医学・生物分野という異分野で研究を進めるには、時間的・精神的に余裕があることが必須であるが本研究の成果は5年継続されて初めて得られたものと判断される、また企業との共同研究が進展したのも4、5年目であるという。以上のように5年型研究に採択されてはじめて本研究のような、異分野融合研究、実用化研究が可能となったのは特記すべきことであろう。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. M.Ikeuchi, R. Tane, K. Ikuta, Electro spray deposition and direct patterning of polylactic acid nanofibrous microcapsules for tissue engineering, Biomedical Microdevices, Vol.14, No.1, 35-43, 2012 |
| 2. H. Yukawa, M.Ikeuchi, H. Noguchi, Y. Miyamoto, K. Ikuta, S. Hayashi, Embryonic body formation using the tapered soft stencil for cluster culture device, Biomaterials, 32(15), pp.3729-3738, 2011 |
| 3. M. Yasui, M.Ikeuchi, K. Ikuta, Density controllable photocurable polymer for 3D magnetic microstructures with neutral buoyancy, Appl. Phys. Lett. 103, 201901 2013 |
| 4. Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, "Three-Dimensional in vitro Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device", Cell Medicine 7(2), pp. 67-74, 2015 |
| 5. Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, "Spheroid Formation and Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device", Cell Medicine 8, pp.47-56, 2015 |

(2)特許出願

研究期間累積件数:4件

1. 「細胞培養装置および細胞培養方法」、池内真志、林衆治、豊田悠司、特願2014-232224



2. 「細胞培養装置およびこれを備える細胞培養試験観察システム」、池内 真志、生田 幸士、安川 あかね、東京大学、特願2014-151084
3. 「細胞培養用シートおよびその製造方法」、池内真志、林衆治、豊田悠司、日東電工、特願2014-123483
4. 「細胞集団を複数の集団へと分けるためのマスク材」、池内真志 他4名、日東電工、特願2013-037627

(3)その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

A.受賞

1. 科学技術団体連合主催 『第9回科学技術の「美」パネル展』優秀賞、「コーゲン膜で作られた人工毛細血管床」、池内真志、2015
2. 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会 会長賞「胚様体の均一・大量生産を実現する培養デバイス“TASCL”の量産化」、池内真志、豊田悠司、宮本義孝、生田幸士、林衆治、2014
3. 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門ROBOMECH賞「光駆動マイクロロボットを用いたリアルタイム3次元力計測システム」、嶋田直矢、浅野剛次、池内真志、生田幸士、2014
4. 新化学技術研究奨励賞「膜MEMS技術を用いた胚様体自動培養チップの開発」、池内真志、2013
5. 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門ROBOMECH賞「中空マイクロカプセルによる光硬化樹脂の軽量化」、安井真人、池内真志、生田幸士、2012

B.著作物

1. 池内真志、生田幸士、“新概念マイクロマシンから攻める再生医療三次元微細加工技術による胚様体培養アレイ”、バイオマテリアル、31(3)、165-170、2013
2. 池内真志、“膜マイクロ・ナノファブリケーション技術による組織再生デバイス”、月刊BIOINDUSTRY、31(1)、37-44、2014

C.新聞報道

1. 日経新聞 2011年12月5日朝刊 11面「細胞培養技術 再生医療後押し」
2. 日経新聞 2013年10月1日朝刊 17面「iPS細胞を自動培養」
3. 日刊工業新聞 2014年1月24日 27面「微小電気機械システム」