

# 博士(工学)論文概要

三次元細胞組織の構築のための  
次世代多目的バイオリアクターの研究開発  
および構築組織の構造的・機能的特性に関する研究

システム情報工学研究科 知能機能システム専攻

馬場 和那

2022年 3月

## 第1章 序論

生体組織や臓器に損傷あるいは機能低下が起き、既存の方法では治療が困難となった疾患に対して、治療を可能にする新しい技術が求められている。そこで、生きた細胞を工学材料として用いて生体組織を人工的に再現する組織工学的な手法が提案・研究されている。この技術により、従来の人工臓器（組織）の生体適合性や機能性などの問題を解決し、失われた組織の機能を再建・代替することが可能であると期待されている。また、構築された移植可能な生体組織は、将来的に臓器移植ドナーのニーズ削減や免疫拒絶反応の抑制などにつながる可能性も秘めている。

3次元組織構築の技術的手法は、大きく分けて「足場（scaffold）を用いた方法」と「ビルディングブロック（scaffold-free）を用いた方法」の2種類に分類できる。足場を用いた方法では、ハイドロゲルやポリマーなどの生体適合性／生分解性材料からなる3次元の足場に細胞を散布することで、3次元組織を構築していく。一方、ビルディングブロック法では、約数十～数百 $\mu\text{m}$ 程度の小さな原始組織（proto-tissue）を多数準備し、それをユニット（ビルディングブロック）として組み立てることで3次元組織を形成する。構築したい生体組織によっては、これらの2つの3次元組織構築手法をハイブリッドに組み合わせたり、他の組織構築手法と組み合わせたりすることがより好ましい場合もある。

多孔質足場への細胞播種は、細胞が足場に浸透する能力が限られているため、時間がかかり、また、足場内の細胞の分布が不均一になることが多い。また、複数の種類の細胞を複雑な配置を実現することも困難である。一方、ビルディングブロックを用いた組織構築の手法では、特徴の一つに、複数の種類の細胞が所望の方法で空間的に配置できることがあげられる。しかし、これらの技術は、組み立て技術と成熟技術が分離しているため、いずれもまだ実用化には遠い。マクロな3次元組織を人工的に構築する場合、組織の維持には酸素や栄養の供給、老廃物の除去が不可欠である。

従来のディッシュ上で細胞の代謝を維持する細胞培養においては、実験者が手作業で頻りに培地を交換する必要がある。しかし、細胞から分泌されるタンパク質の回収や、抗体などの高分子化合物の濃縮など、大量の細胞を必要とする用途では、手動によるスケールアップは困難である。そこで、大量の細胞を培養・維持するための装置として、*in vitro* で連続的に細胞を培養するバイオリアクターが開発されている。バイオリアクター内では、細胞は液体培地にさらされることで十分な栄養と酸素を供給され、老廃物は連続的に外部に排出される。これにより、静的な培養に比べて、物質移動速度が高く、細胞増殖速度が速く、組織内の細胞死が少なくなることが報告されている。バイオリアクターは基本的には培養時の環境条件を制御するように設計されている。さらに、化学的または機械的な刺激を与えることで、組織構造の形成や自己組織化を導くポテンシャルも有している。しかし、これまでのバイオリアクターは、培養のためのツールとしての側面が強く、組織の形状そのものや内部構造を形成するための知見や方法としては、まだ開拓の初期段階にあり、依然として実際の特性に近い生体組織を再現することは困難となっている。バイオリアクターの中でミリメートル以上のサイズの組織を作りながら内部に酸素や栄養を供給する方法は未だ不十分であり、また、細胞や組織の種類によって、求められる立体構造や好ましい生理的環境は異なるが、従来の細胞培養用のバイオリアクターは、組織を構築する機能に欠けるため、それぞれの組織にとって望ましい3次元形状を作り出すことができない。より大きなサイズで、より複雑な構造を持ち、最終的に機能する3次元組織を構築するためには、組織の組み立てと成熟を両立しバランスを取りながら、多種多様な組織を培養できる新たなバイオリアクターの研究開発が必要である。

そこで、本研究では、従来のバイオリアクターの問題を解決し、様々な生体組織を構築する手法を実現するために、以下の特性を備えた次世代型多目的バイオリアクターを提案・研究開発することを目的とする。

(1)異なる複数の細胞種の培養プロセスにおいても共通に必要な要素については、培養環境の自動制御管理、画像取得・画像処理、培養中データのモニタリングなどのロボット化技術を用いて自動化・標準化する。

(2) 目的とする 3 次元組織の構築と成熟に特化した交換可能な培養ユニット（バイオリアクターチャンバー）内で個々の組織を成長させる。

(3) 組織の種類や細胞の組成に応じてシステム内のユニットを再構成するモジュール設計により、多様な組織の構築に柔軟に対応する。

## 第 2 章 スフェロイドの大型組織化のための生体模倣灌流型バイオリアクターの研究開発

スフェロイドとは適度の数の細胞が集積した球状凝集塊で、スフェロイドを基本構造単位（ビルディングブロック）として組織や臓器を構築する可能性が期待されている。しかし、現状では、スフェロイドが成長し、大きさが約 500 $\mu\text{m}$  を超えると、中心部に酸素や栄養が届かなくなるため、内部の細胞が低酸素状態になり、ストレスを受け、最終的には壊死してしまう。この問題により、スフェロイドのみで 1 ミリ以上の厚さの組織を構築することは困難となっている。

ここで、中空糸を用いた灌流培養装置は、生体を模倣した環境を作り出すのに適していると考えられる。中空糸は、パイプ状の多孔質膜の一種であり、膜表面に設けられた 0.1~1 $\mu\text{m}$  程度の孔を介して栄養や酸素を供給し、老廃物を排出することが可能である。一方、細胞の大きさは中空糸の孔径よりも大きいため、培養中も細胞は中空糸の壁を通過することはできない。これらの特徴から、中空糸の利用は大量のスフェロイドの栄養・酸素の供給や老廃物の除去を支援するために有用であると考えた。その場合、広範な細胞へ栄養素の拡散の不均一な供給をなくすためには、中空糸はスフェロイドから等間隔になるよう配置する必要がある。これにより理論的には、実験可能な範囲内では大きさの制限がなくなり、大量のスフェロイドが融合した大型組織を構築することが可能となると考えられる。

そこで、本章では、単一あるいは複数の平行な中空糸の周りにスフェロイドを積層することで組織の内側から酸素と栄養を供給可能にする新しい大型組織構築手法を提案する。また、構築されたスフェロイド組織を *in vitro* で成長・維持するための、生体模倣灌流型バイオリアクターを研究開発し、その基本性能を確認した。

### スフェロイド組織のための 3D 培養ユニット

スフェロイドをビルディングブロックとして 3 次元組織を構築するための 3D 培養ユニットは、ハウジング、O リング、中空糸(直径 0.5mm, 孔径 0.1 $\mu\text{m}$ )、中空糸固定プレートから構成される。3D 培養ユニットは培地の出入口を有し、培地供給口を介してスフェロイドを投入することが可能である。O リングによってハウジング内部は密閉され、緩めれば中の組織をすぐに取り出すことが可能である。素材は透明なポリカーボネートの板を用いており、耐熱性と透明性が高く、オートクレーブによる滅菌と内部の観察が可能である。チャンバー内部には、栄養と酸素の拡散を考慮し中空糸とスフェロイドの最大距離が約 300 $\mu\text{m}$  以下になるよう中空糸がプレートに平行に固定され、スフェロイドがその中空子の周りに積層される。

### 培地灌流ユニット

培地灌流ユニットは、コントローラー、培地供給ポンプ、培地循環ポンプ、シリコンチューブ、新鮮培地容器、培地リザーバー、廃液容器、数個のバルブから構成される。

コントローラーを構成する全ての部品は、保護レベル IP67 の防水ボックスに入れて密閉され、

ボックスの外側の全面はアルコールで殺菌する。コントローラー以外の部品は、オートクレーブで滅菌可能である。また、コントローラーに関連するすべてのケーブルは、IP68 防水ケーブルコネクタを介してコントロールボックスの外側と内側で接続され、気密性を維持しながら電源の供給とアクチュエータの駆動を行うことが可能である。

細胞は代謝活動で酸素を消費するため、培地の酸素濃度を下げないようにすることが重要である。本ユニットでは、ガス透過性の高いシリコンチューブの中を培地が循環することでガス交換が行われる。ポンプの流量を可変的に制御するために、PWM (Pulse Width Modulation) 制御を行う。循環ポンプの流量の初期値は 8 ml/min に設定した。

### 基本性能検証試験

事前にバイオリアクター内で培地を 5 日間循環させ、コンタミネーションが起きず無菌環境を維持しており、細胞へ安全に運用できることを確認した。マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて 96 ウェルプレートでスフェロイドを作成した。約 300  $\mu\text{m}$  の大きさのスフェロイドを 3D 培養ユニット内に播種し、システムをインキュベーターに設置して培養を開始した。24 時間後の 3D 培養ユニットの内部空間を観察した結果、スフェロイドが中空糸の周りに積層されていることを確認した。さらに、スフェロイドが球状から広がって別のスフェロイドと融合している様子も見られ、本システムが無菌環境を維持しながら細胞の成長と融合を促進できる性能を有することを確認した。また、播種したスフェロイドの数を増やしても、中空糸とスフェロイドの距離はどの層でも均一であった。したがって、このシステムは、すべての細胞に栄養と酸素を均等に供給することが可能であり、中空糸の本数を増やすことで組織サイズを拡大することができると思われる。

## 第 3 章 管状組織の構築・成熟のための複合型ロボット化バイオリアクターの研究開発

前章では、スフェロイドベースの組織培養の可能性について、適切な生体模倣環境下では、スフェロイドを元として比較的大きな組織を構築することが可能であることを示した。一方で、バイオリアクターの実用的な機能を考慮すると、培養環境情報の取得などに関して研究開発の余地がまだある。前章で提案した生体模倣灌流型バイオリアクターは、培養中のスフェロイドを自動的に成熟させることを主な目的としていたため、培地流量制御機能の実装について述べた。しかし、今後の開発段階として、培養組織の代謝活性の自動維持だけでなく、適用できる組織形状の可変性の拡大や、システムの操作性の向上、リアルタイムでの形態モニタリングなどが改良点として考えられる。

培養対象となる組織について、生体組織の基本的形態のひとつとして、血管、気管、食道、リンパ管、消化管など大小さまざまな管状組織がある。ここでは、前章で紹介したスフェロイドを用いた組織構築手法を応用し、管状組織を広範囲に構築可能な手法を提案する。前述したバイオリアクター機能の要求を実現するために、複数のセンサによる組織形成のモニタリングと培養パラメータの取得が可能な複合機能を有するロボット化バイオリアクターを研究開発する。そして、開発したシステムの性能と管状組織の構築について、培養実験におけるシステムでの観察・解析、蛍光/組織染色によって評価する。

### 管状 PDMS チャンバー

スフェロイドを用いて管状組織を構築するための管状モールド PDMS チャンバーは、PDMS (ポリジメチルシロキサン) 製のハウジング、半透膜作用を持つ PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) 多孔質チューブ(直径 2mm, 気孔率 60~80%), チューブ固定ブロック, および数個のルーアーコネ

クタから構成される。チャンバーを構成する全ての材料はオートクレーブ滅菌可能である。円筒形の PDMS ハウジング内面と中心に固定された多孔質チューブで、内径 2mm、外径 3mm、長さ 1cm の管状のモールドが構成され、モールド内に積層したスフェロイドに対して多孔質チューブが中空糸と同様の濾過作用を提供する。ハウジング素材の PDMS は、透明かつ自家蛍光が低いいため容器から組織を取り出すことなく、外側からの継時的な形態観察、および、染色による蛍光観察が可能である。PDMS を一体成形化することで強力な密閉性を提供しながら、柔らかいシリコン特性を活かして、容器を切断し形成された組織を取り出すディスポーザブル利用が可能である。また、PTFE とシリコンはどちらも細胞にとって難接着性であるため、密接して接着しあうスフェロイド同士の結合を促し、組織取り出し操作による細胞破壊を予防する。

## 複合型ロボット化バイオリアクター

開発したバイオリアクターは、管状 PDMS チャンバー（管状組織用培養ユニット）と、細胞培養プロセスの自動化のためのロボット化培養モジュールで構成される。

ロボット化培養モジュールは、培地を連続的に交換する培地灌流機能に加え、形成される組織の形態や培養パラメータをモニターし記録する、培養環境情報のモニタリング機能として、小型デジタル顕微鏡、光酸素センサ、グルコース/乳酸センサなどが追加された。

コントロールユニットは前章と同様に PWM (Pulse Width Modulation) 制御により、培地の流量を可変的に変更することを可能とする。コントロールユニットに Wi-Fi 通信機能を追加し、同一ネットワーク上のどこからでも流量の操作・監視ができるように改良を行なった。

小型デジタル顕微鏡はチャンバー内のスフェロイドの積層を撮影し、得られた画像を外部の PC でリアルタイムにモニターすることが可能である。本章における実験では、10 分ごとに画像を撮影し、タイムラプス動画として結合することで、スフェロイドの自己組織化や融合度の経時変化を確認・解析する機能を実装した。

循環培養液中の酸素濃度を測定するために、循環経路内に直接配置することが可能なフロースルー型の光酸素センサを使用した。酸素センサと酸素濃度計は光ファイバーで接続し、PC とのシリアル通信により、取得したデータが記録され、リアルタイムに値を確認することができる。

グルコース・乳酸センサは、細胞の代謝中に消費・生成され得る循環培地中のグルコースと乳酸の濃度を測定するために用いる。取得したデータは同様に PC に記録、リアルタイムに監視することができる。これらの値は、細胞や組織の代謝活性をチェックし、培地を新鮮なものと交換するタイミングを決定するために使用することができる。

## 管状組織構築実験

線維芽細胞のスフェロイドを 96 ウェルプレートで培養後、チャンバーの管状培養空間に充填した。スフェロイドがチャンバーの底に積層したことを確認し、インキュベーションを 6 日間行った。本システムの小型デジタル顕微鏡により、時間の経過に伴い、スフェロイドの融合が徐々に進行し、6 日後までに個々のスフェロイドが肉眼では認識できなくなったことが確認できた。

実験の終了時に、チャンバーを解体し、多孔質チューブを抜くことで管状組織を取り出した。組織学的解析では、HE 染色により、細胞増殖およびスフェロイドの融合が進み、組織表層だけでなく内部でもスフェロイド間で識別可能な境界線が見えないことを確認した。また、TUNEL 染色により組織中の細胞の生存率を算出したところ、平均生存率は 92.7%と良好な結果を示した。

以上より、本システムを用いることで、スフェロイドベースの管状組織構築および成熟が可能であり、細胞に良好な生存環境を維持できる培養性能を有することが組織学的レベルで確認できた。

## 第4章 三層血管組織の構築

血管は物質輸送の基盤を担う重要組織であり、狭窄や閉塞が生じると虚血により様々な臓器や組織に悪影響を及ぼす。直径 6mm 以下の血管は抗血栓性などの問題から人工血管による代替が難しく、バルーンカテーテルやステントにより血管を拡張するか、患者自身の血管を他部位から切り取りバイパスする治療が施される。しかし、老化による動脈硬化などは体全体で進行している場合が多く、移植に適した血管がない場合もある。そのため、もし細胞を用いて抗血栓性などの機能を発現した組織工学的人工血管 (Tissue-Engineered Vascular Grafts, TEVG) が実現できれば、代替血管として移植治療の選択肢の一つとなる。TEVG の臨床応用には、3 層構造の組織に基づく血管機能の再現に加えて、サイズの拡張性、血流の拍動や手術の縫合に耐えうる強度が求められるが、自己組織化アプローチだけでこれらの要件をすべて満たすことは難しい。

そこで、本章では、まず生体適合性のある多孔性ガラス繊維を用いて生理的に近い血管層構造を *in vitro* で形成する方法を提案する。また、これまで開発したバイオリアクターは一つの組織の培養を対象としていたが、複数の組織を一度に培養することで、異なる条件での培養も可能になるため、当該分野の探索的研究の効率化につながることを期待される。そこで、細胞層の形成後に、組み立てた血管組織に対し、様々な灌流による機械的訓練刺激を複数同時に与えながら層構造の成熟を可能にするバイオリアクターを研究開発する。そして、構築された組織の力学的・生物学的特性、構成された層の特性とバイオリアクターの灌流パラメータとの関係を明らかにする。

### 血管構造の再現手法

血管は、内皮細胞による内膜、平滑筋細胞と弾性繊維による中膜、線維芽細胞と結合組織による外膜からなる三層構造を持つ組織であり、抗血栓性や血管コンプライアンスなどの各種血管機能の再現のためには、上記の三層組織構造を再現する必要がある。本研究では、細胞は通さず培地は通過可能な多孔性ガラス繊維フィルターを長方形の足場にして、その上に線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞の順で各細胞ごとに 1 週間の成熟期間を設けて播種する段階的培養を行なった。細胞が重なって層を形成していることを蛍光観察により確認した後に、足場と組織をロッドに巻き付け手術用縫合糸で形状固定を行い、三層構造を持つ管状血管組織の構築を試みた。

### 複数同時培養機能の開発

これまでに開発したバイオリアクターは一つの組織の構築を目的としていたため、循環用のポンプは一つであり、またアクチュエータが DC モーターであったため低流量の制御は駆動に必要な電圧の関係上困難であった。血管と流量の関係について 0.01~1 ml/min 程度の低流量域を含むより広い範囲で検証できるように培地灌流機能を改良した。

主な改良点は、灌流ポンプユニットの流量を 0~48ml/min の間で制御可能となったことと、4 つのステップモーターがデジーチェーン接続されており、個別流量制御や一括同期制御が可能となったことである。各培地循環経路は機械的に独立しているため、個別の異なる流量条件での培養の実行や解析が可能になった。流量および目標値までの変化手順は、ユーザーが任意に設定することができる。

4 チャンネル血管訓練ユニットは、シリコン製チューブハウジング (直径 8mm) 、複数のルーアコネクター、および支持台で構成される。ポンプから搬送された培養液は、主にシリコンハウジング内に収納されたチューブ状組織の内側を通過する。培地の流れによりせん断応力が細胞に与えられ、細胞のメカニカルストレス応答を利用した訓練により、組織を成熟させ、細胞間の接着や細胞外マトリックスの適応が促進される。

## 血管組織共培養実験

層構造の観察を培養中に行うために、内皮細胞と平滑筋細胞はそれぞれ蛍光タンパク質を発現するように遺伝子改良された GFP-HUVEC, RFP-SMC を用いた。提案した手法に基づき三種類の細胞をガラス繊維足場上で培養したところ、蛍光観察により、足場内への細胞の侵入と播種順番に従った細胞層形成が確認できた。

シートからチューブへと組織を丸めるために開発した補助装置を用いて、細胞層が形成されたガラス繊維足場を筒形状に変形させた。この状態で、チューブを巻いたガラス繊維足場を外科用縫合糸で3箇所以上縛って固定する。この補助装置により、組織の乾燥を避けながら、特別な技術を必要とすることなく、1つの組織あたり5~10分で操作を終えることができた。

本実験ではバイオリアクターで3つの組織を同時培養し、1つの組織を静置ディッシュ上で培養した。管内部を流れる流体による機械的影響が条件を変えた時にどのように作用するかを検証するために、ポンプから供給する流量を1.0, 2.0, 5.0 ml/min の三種類の流量となるように複数制御した。せん断応力の急激な上昇による細胞剥離を避けるために、個々の流量は72時間かけて設定値に到達するように制御し、その後2週間、定常流量でバイオリアクター内を循環し、120時間ごとに50%の培地を新鮮なものに交換した。

バイオリアクター培養後の生存率は  $90.5 \pm 5.2\%$  で、流量の違いによる有意差は確認されなかった。培養後の組織の機械的特性を調べるために、ANSI および ISO の規定に基づく引張試験および耐圧性試験を行った。引張張力は  $2.83 \pm 0.76\text{ N}$  となり縫合糸の使用など外科的操作に耐えられる値であった。また、丸めて管状にするために使用していた固定用縫合糸を切って取り除いた後も、細胞同士が結合しており管状の状態を保持できることが確認された。耐圧性試験ではコントロールとして静置培養していた組織は15 kPa で水漏れがあったのに対し、バイオリアクターで培養した組織は全て計測可能な最大値の18 kPa となり、耐圧性の向上が確認できた。

組織学的染色では、三層構造が意図していた順番で形成されていることが確認できた。また、血管内腔の構造が真円ではなく凹凸のある構造であり、また細胞の層のジオメトリーがバイオリアクターの流量によって異なっていた。そこで、HE 染色の結果に基づき、三種類の各細胞層の厚さを計算し、管内部の壁面せん断応力との関係を調べたところ、1 ml/min と 2ml/min の組織ではせん断応力が増加すると層の厚さが減少する傾向が見られた。5ml/min の組織では、一定のせん断応力を超えた箇所では、層の厚さが比較的一定となりばらつきが低下していた。また流量がある程度早くせん断応力が細胞剥離をおこさない程度の値の時に自然の血管に近い層構造となる傾向が確認できた。

以上より、本提案手法により実用に耐えうる強度かつ三層構造を有する血管組織を作ることが可能であり、バイオリアクターの機械刺激による血流模倣環境で培養することにより耐圧性が向上し、また灌流パラメータを調整することで層構造を調整できる可能性を明らかにした。

## 第5章 神経組織の構築

神経系は多細胞生物における情報伝達の根幹を担う重要組織であり、また損傷した場合に自ら再生することが難しい組織でもある。機能的な神経組織を構築することは、神経の代替移植組織を提供できる可能性や、実験動物の代わりに *in vitro* 実験の神経モデルとして活用される可能性が期待できる。神経細胞の機能的活動を記録するためには、電極が配置されているディッシュの表面で培養する必要がある。しかし、細胞剥離を利用した細胞培養方法では、機能を確認した細胞をそのまま移植に使用することはできない。したがって、神経細胞の接着と生存、計測場所への神経細胞の移動の両方を可能にする足場が必要である。

本章では、同種動物の末梢神経または脊髄に移植することが可能な形状の3次元神経組織を作るため、動物の生体内を天然のバイオリアクターとして活用するインプラント型組織構築チャン

バーによる神経細胞用 ECM(Extracellular matrix)足場の構築手法を提案・研究開発し、染色や組織学的評価によりその構造や接着特性等を検証する。また継続的な培養による神経組織の成熟に関して、従来の研究には、移植可能な 3 次元足場に初代神経細胞を播種して、バイオリアクターを用いて長期間の培養を行なうような研究は見受けられない。そこで、これまでに開発したバイオリアクターで足場ごと神経細胞を培養するための新たなユニットとしてガラス-PDMS 複合チャンバーを開発し、初代神経細胞を培養し、電気生理学的評価をおこなうことで、開発したバイオリアクターによる機能的神経組織の成熟が可能であるかどうかを確認する。

## 足場構築用インプラント

脊髄や抹消神経は脳からの信号を伝達するための導線となるべく多数の神経軸索が並行しており、その周りをグリア細胞や毛細血管などが囲んでいる。損傷した神経軸索が再生するには接着しながら軸索を伸ばすためのガイドとなる細いチャンネル構造が必要となる。これまでに腹腔や皮下ポケットなどの特定の *in vivo* 環境を天然のバイオリアクターとして使用して、ロッドやシートなどのテンプレートを埋植すると周囲に ECM と細胞からなる線維性カプセルが生成されることが報告されている。この作用を利用して、3 次元的に並列された数百の細孔をもつ複雑な構造の足場を作るための新たなインプラント型組織構築チャンバー (以下インプラント) を開発した。

## シリンダーインプラント

シリンダーインプラントはマルチチャンネル形成のためのチタンワイヤーと、その束を平行に配列させるためのチタンメッシュおよびチタンリング、ECM 外形形成のためのチタンハウジング、ワイヤーを固定するためのガラスアイオノマー系セメントで構成される。インプラント内部には、マルチチャンネルを作るため、中央に数百本のチタンワイヤーが均一な隙間を保ってワイヤー両端のメッシュで固定され並列に配置されている。埋植して組織が形成された後に、インプラントを解体し、ワイヤーを引き抜くことで、元々ワイヤーがあった部分の空洞が神経細胞の接着と軸索の伸展のためのガイドチャンネルになると考えられる。

## フラットインプラント

シリンダーインプラントは将来的な抹消神経・脊髄への移植を考慮した形状になっているが、一方で、*in vitro* で電気生理学的解析をすることには不向きな形状でもある。この理由として、既存の外部電極を用いた神経細胞の電気信号の検出は全て電極が設置された平面上に神経細胞が播種されていることを想定していることがあげられる。そこで、*in vitro* において神経の機能を検証できる足場を構築するために、シリンダー型と同様のカプセル化原理により、ECM で平坦な面の足場を形成するフラット形状のインプラントを開発した。フラットインプラントは *in vitro* 細胞外電位計測用 MEA システムの電極が配置されたウェル内部に丁度収まる寸法に設計した。

## ガラス-PDMS 複合型チャンバー

神経細胞は表面接着性がこれまで取り扱った細胞よりも弱いため、培養の際には余計な外力や刺激の少ない状態を維持する必要がある。そこで、細胞を播種した ECM 足場付きインプラントごと培養・維持するための、バイオリアクターチャンバーを開発した。

培地の流速を調整することで、細胞に加わるせん断応力を最小限に抑えるため、設計したチャンバーに対し流体解析をおこなった。シミュレーション結果では、フラットインプラントの細胞播種表面におけるせん断応力は平均  $1.51E-06$  Pa となった。この値は 4 章で血管組織を培養した環境下の値の 1000 分の 1 未満であったため、細胞播種表面におけるせん断応力は十分小さく、バイオリアクターの灌流による細胞剥離が起きる可能性は低いと判断した。



## インプラントの埋植実験

作成したインプラントをミニブタの皮下に埋植する外科手術を行った。1 ヶ月以上の回復期間において皮下からインプラントを取り出した。動物用 CT によるスキャンを行い、解析ソフトウェアにより CT 断層画像から 3D モデルを作成したところ、インプラントは設計・開発時の形状を保ち、内部のワイヤーも保持されていることが確認できた。組織摘出後、天然の架橋剤で細胞毒性の低いゲニピンにより組織の架橋処理を行なった。その後、アルコールの中で保管することで滅菌と脱細胞化処理をおこなった。インプラントを解体し、摘出した足場組織を顕微鏡で確認したところ、多数のチャンネルが内部に形成されていることが確認できた。また、インプラントを解体し摘出した組織に対し、造影剤を用いて CT スキャンを実施したところ、組織内部も含む全体に造影剤が拡散していたことから、流体拡散が可能な 3 次元的多孔質構造が構築されていることが示唆された。さらに、組織学的解析により、足場組織のワイヤーを抜いた箇所チャンネルが形成されており、足場組織内部に多くの毛細血管と思しき管腔構造があることが確認された。

## シリンダーECM 足場の予備試験

細胞を足場に播種し、チャンネルの構造に対する細胞の挙動を調べた。シリンダーECM 足場のチャンネルを垂直に横断するようにメスで切断し、得られた切片に対して、シュワン細胞および GFP-HUVEC を播種し、別々に 10 日間培養した。培養終了時に蛍光観察を行なったところ、シュワン細胞がチャンネルの中でクラスターを作り接着・生存しており、GFP-HUVEC は一部の細胞がチャンネルの円周に沿って接着していた。これらの結果から、構築された足場は細胞の接着・生存において好ましい特性を有していると考えられる。

## 神経細胞培養実験

ラットの脊髄を摘出し、アイソレーション処理の後に解体した 4 つのフラットインプラントの架橋済み ECM 足場組織表面に細胞を播種した。フラットインプラントのうち二つは静置されたディッシュ内、残り二つはバイオリアクター内で培養された。2 週間後にインプラントを MED マルチウェルプレートに移して一晩かけて神経発火に伴う電気信号の計測を実施したところ、静置培養とバイオリアクター培養のインプラント両方で神経細胞のスパイクが検出された。また、翌日に Calcein-AM により細胞の染色をおこなったところ、軸索を伸ばした神経細胞がクラスターを形成して接着・生存している様子が確認できた。これにより、本研究で開発したバイオリアクターは神経細胞の生存維持・軸索伸長の補助を可能とする性能を有することが示唆された。

## 第 6 章 考察

提案・研究開発したバイオリアクターは、対象とする 3 次元組織の構築に特化した培養ユニットと、生体組織に共通して必要となる酸素・栄養の供給、老廃物の除去、培養環境情報の取得などを行う機能を有するロボット化培養モジュールを統合することにより、3 次元組織の構築のための機能を実現した。また、スフェロイドをビルディングブロックとして組み立てた大型組織・管状組織、足場と複数細胞を組み合わせた血管組織、ECM による構造形成を組み合わせた神経組織に対して、それぞれの培養に特化した培養ユニット開発し、細胞に応じてシステム内のユニットを組み替えてシステムを再構成することにより、異なる組織に柔軟に対応することができた。

第 2 章、第 3 章では、中空糸や多孔質チューブからの栄養と酸素の拡散が可能な距離に細胞が存在する環境を提供する生体模倣チャンバーを用いて、自動培養のモジュールで細胞ストレスのかからない流量範囲で制御することにより、96 ウェルプレートによる静置培養や従来の攪拌型バイオリアクターでは困難だったサイズのスフェロイド組織を培養することが可能であることが確

認できた。また、ロボット化培養モジュールの自動観察・解析機能によって得られた培養過程の組織形成の変化を追跡し、細胞にとって好ましい生理的環境を維持できる培養性能を有していることを確認した。これにより、3次元組織の構築機能を備えた次世代のバイオリアクターとして基本システム構成が実現できたと考えられる。このようなフレームワークにより、異なる組織の構築や、異なる研究目的に対し、必要なユニットを適宜追加する、あるいは必要のないユニットを構成から除外することで、組織・目的に応じたシステムをユーザがカスタマイズできるようになると考えられる。

第4章では、多孔質ガラス繊維を足場とした実用に耐えうる強度の三層構造の血管の再現が可能であることを確認した。さらに、バイオリアクターにより、栄養・酸素の供給だけでなく、機械的訓練刺激を与えて生体の血流環境を模倣することで、構築した血管組織の耐圧性が向上することが確認できた。従来の研究では一つの細胞から管状の組織を構築することはできても、複数のレイヤーを自在に作り出すことは実現できなかったが、提案手法は三層形成時の細胞使用量を調整することで層の厚さを変えることを可能である。この章では、バイオリアクターの灌流パラメータを個別に制御した際に、構築した組織が生理学的環境の違いにどのように応答するか、という疑問を明らかにするため、バイオリアクターのポンプユニット部分のアクチュエータの種類と数を変更した。これにより、単独の組織構築だけでなく、複数組織の同時培養や一つのシステムのみでの比較培養が可能になった。培養結果から、バイオリアクターによる流量およびせん断応力などの灌流パラメータが三層血管の層構造や自己組織化、足場への細胞浸潤に影響を与えることが確認された。このようなシステム構成の改良により、本システムが組織構築に加え、培養条件検討のような探索的研究などの目的のためのツールとしても活用できるのではないかと考えられる。

第5章では、生体内バイオリアクターの活用に基づくインプラント型培養チャンバーによって神経細胞の接着・生存と任意の場所への移動のためのECM足場を形成することが可能であることを確認した。従来のECMを利用した神経足場については、中央に穴の空いた管状ECM組織などは報告されていたが、内部まで多数のチャンネルが存在する組織は実現できていなかった。提案・研究開発したシリンダーインプラント型チャンバーの直径は1cm、長さは3cmと、実際の人の脊髄の直径とほぼ同じサイズでありながら、チャンバー内部まで組織で埋まり、ワイヤーの除去により多数のマルチチャンネルが形成できることが確認できた。また、シリンダーECMの予備実験で足場の生体適合性も確認できた。開発したバイオリアクターには、神経細胞用に作成したガラス-PDMS複合チャンバーを個別循環経路でふたつ接続するように構成した。実験では、ECM足場上で神経細胞の軸索伸展と生存の維持が可能であり、培養後に神経細胞独自の機能の一つである自己発火によるスパイクを生じることが電気生理学的に確認できたことから、本システムにより、移植可能な足場上で初代神経細胞の機能的成熟が可能であると考えられる。

数種類の組織の培養実験を通して、開発したバイオリアクターが様々な組織に多目的に使用できることを確認してきたが、さらに将来的なことを想定した場合、追加するとより便利な機能として、気温・CO<sub>2</sub>濃度の制御機能が挙げられる。ラボ施設内では据え置き型のCO<sub>2</sub>インキュベーターがあるため必要ないが、輸送や病院での一時保管を考える場合必要な機能になる。組織工学的に作られた生体組織の場合、一度作って冷凍し輸送先で解凍することは、組織の構造や細胞同士の結合にもダメージを与え、機能性低下につながる可能性がある。また、実際の病院環境でそのような培養操作をすることは設備的にも難しいと考えられる。そのため、細胞培養を行う専用施設から無菌状態の培養プロセスを継続しながら輸送が行え、患者の入院している病院内で移植直前まで組織を培養した状態で無菌的に保管できるシステムが望ましいと考えられる。本研究で開発したバイオリアクターは閉鎖系になっているため無菌的に組織を成熟することが可能であり、また、ネットワーク経由で培養環境情報をユーザが確認できるため、輸送・保管の際中もそれら

のパラメータをトラッキングできるシステムとして活用できると考えられる。気温・CO<sub>2</sub>濃度の制御機能はバイオリアクター本体に実装するか、またはその機能専用の輸送用スーツケースのような形で実装し、同様にデータサーバに計測データを送ることで、社会での使用時の利便性がより向上することが期待される。

## 第7章 結論

体内組織の機能低下・喪失により困難に直面している人の治療において、細胞から生体組織を構築する組織工学技術が期待されている中、従来のバイオリアクターは細胞の培養・維持は可能だが、組織の構築機能に欠け、望ましい組織構造を有する3次元組織の形成とその組織に合わせた成熟を両立することが困難であった。

本研究では、従来のバイオリアクターの問題を解決し、様々な生体組織を構築する手法を実現するために、以下の特性を備えた次世代型多目的バイオリアクターを提案・研究開発することを目的とした。(1)異なる複数の細胞種の培養プロセスにおいても共通に必要な要素については、培養環境の自動制御管理、画像取得・画像処理、培養中データのモニタリングなどのロボット化技術を用いて自動化・標準化する。(2)目的とする3次元組織の構築と成熟に特化した交換可能な培養ユニット内で個々の組織を成長させる。(3)組織の種類や細胞の組成に応じてシステム内のユニットを再構成するモジュール設計により、多様な組織の構築に柔軟に対応する。

対象としたスフェロイドベースの組織、血管組織、神経組織に対して、その組織に特化した培養ユニットをそれぞれシステム内で再構成したバイオリアクターで培養実験を実施し、対象とした細胞組織がそれぞれに適した生理的環境で培養できることを確認した。スフェロイドベースの組織については、これまで実現できなかったミリメートルを超えるサイズの3次元組織の構築ができることを示した。また同様の組織構築手法を応用することで細胞のみで構成される管状組織を構築できることを示した。血管組織については、生理的構造に近い三層構造を有する3次元組織の構築ができ、灌流パラメータを変えることにより層構造を調整できることを明らかにした。神経組織については、多数の並列マルチチャネルが組織中心まで形成されたECM足場を構築し、ECM断面を模倣したフラット足場上に接着した初代神経細胞が神経機能の一つである自己発火を起こすことが確認できた。

これらの組織構築手法の提案、組織成熟の自動化や並列化、対象組織の特性に合わせたシステムのモジュール化など、各組織のために必要な培養機能の研究開発と培養実験を通じて、異なる種類の生体組織の形成と成熟に対応可能な3次元細胞組織の構築のための次世代多目的バイオリアクターの実現可能性を示すことができた。

本研究は、ロボット化、AI化されたバイオリアクターというバイオ系、ロボット系、医学系の異分野が融合した新たな研究開発領域として位置づけられ、この領域の研究開発が推進されることによって学術的発展や社会的貢献に寄与することが期待される。