

バイオプリント技術を応用した 医療・創薬研究

松崎 典 弥*

1. はじめに

京都大学の山中教授らによるヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立が報告され、再生医療だけでなく、医薬品の毒性・評価試験への応用が期待されている。しかし、生体組織は複数種類の細胞で構成され、種々の細胞が互いに相互作用することで組織としての機能を発現しているため、細胞単体で生体組織と同じ薬剤応答を得ることは困難であり、iPS細胞を用いてもこの課題は解決できない。つまり、iPS細胞の分化誘導技術とは別に、生体組織に類似の3次元構造と機能を併せ持つヒト組織モデルの構築技術の確立が重要である。また、生体外での組織構築は、動物実験代替法の観点からも大変重要である。EUでは、2013年より化粧品・化成品開発への動物実験の使用を原則禁止する法律が既に施行されているが、実験動物に代わる具体的な評価方法は確立しておらず、早急の解決が求められている。生体組織を構成する様々な細胞とタンパク質を3次元で統合し、組織類似の機能を有する3次元組織モデルを構築できれば、医薬品評価試験や動物実験の代替への応用が可能となり、ライフ・イノベーションへの貢献が期待される。

2. 3D細胞プリントによる三次元構造体構築の現状

最近、光または熱硬化性の樹脂を用いた連続積層により、高速かつ高精度に3次元構造体を造形する「3Dプリンター」が注目を集めている。インクジェットプリンターは、ピコリットルオーダーで液滴を精密に吐出できるため、吐出点で溶液を固化できれば、連続積層により三次元構造体を自在に構築可能である。そこで、細胞にダメージを与えることなく、細胞を吐出溶液ごと瞬間的に固化できれば、生体臓器の複雑な3次元構造を構築できると期待されている。以下、いくつかの研究例を紹介する。最近、総説も報告されているため、そちらもご参照頂きたい⁽¹⁾⁽²⁾。

(1) 細胞プリント

これまで、インクジェットプリンターによる細胞の吐出制御や二次元的な細胞の配置制御などが報告されてきた⁽³⁾⁻⁽⁵⁾。バブルジェットタイプのインクジェットは吐出時に発熱が起るため、細胞への影響が懸念される。従って、ピエゾタイプのインクジェットを用いた研究が主流である。吐出された細胞の生存率は高く、条件によるが70~90%以上に保つことが可能である。しかし、吐出時のシアストレスにより細胞膜が緩むことも報告されており、吐出条件によっては検証が必要である。吐出細胞数の制御に関してはあまり報告例が無いが、細胞溶液の濃度を調節する手法⁽⁶⁾やセルソーターの原理を応用する手法⁽⁷⁾により、1個レベルで細胞をプリントする試みも報告されている。

(2) 組織構築の取り組み

Boseらは、リン酸三カルシウム(TCP)やSiO₂とZnOを混合した粉末を用いた3Dプリントの積層造形により、マテリアル内部に連通孔を有する骨再生用の足場材料を報告した⁽⁸⁾。骨誘導能を有し、骨再生を促進することを明らかにした。また、Butcherらは、アルギン酸とゼラチンの溶液に平滑筋細胞と大動脈弁間質細胞を内包させ、3Dプリントにより2種類の細胞を連続的にプリントすることで、大動脈弁類似の構造体を構築した(図1(a))⁽⁹⁾。細胞生存率は80%以上と高いが、機能の再現には至っていない。

McAlpineらは、軟骨細胞を含むアルギン酸とシリコン、銀ナノ粒子を3Dプリントすることで人工耳介を構築した(図1(b))⁽¹⁰⁾。細胞生存率は90%以上と高く、無機の銀ナノ粒子も脱離することなく無線電波の受信が可能であった。また、Atalaらは、I型コラーゲン溶液にフィブリノーゲンを混合してプリントし、そこへトロンビン溶液をプリントすることで、フィブリノーゲンとトロンビンの反応を利用してゲルを形成する手法を考案し、皮膚⁽¹¹⁾や腎臓(図1(c))⁽¹²⁾類似の構造体の構築を試みた。

* 大阪大学大学院工学研究科；准教授(〒565-0871 吹田市山田丘2-1)
Biomedical and Pharmaceutical Researches Using Bioprinting Technology; Michiya Matsusaki(Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita)
Keywords: *Bioprinting, tissue engineering, cell accumulation technique, layer-by-layer assembly, nanofilms*
2017年11月29日受理[doi:10.2320/materia.57.164]

(3) まとめと課題

最近報告されている3D細胞プリントによる三次元組織構築を紹介した。しかし、構築された3次元構造体の機能は不十分であり、生体臓器にはとても及ばないのが現状である。この原因は、主に「細胞の配置制御」、「細胞間接着の誘起」、「細胞外マトリックス(ECM)」の3つにあると考えられる。

生体臓器では、上皮・内皮系の細胞は、カドヘリンを介した接着結合により密接に接着し、物質の交換を行っているため、細胞間距離は非常に狭い。上皮細胞層の下部には、ラミニンやIV型コラーゲンを主成分とする基底膜がECMとして存在し、結合組織との界面を形成している。上皮細胞層は、その緻密な接着結合により外部からの物質や細胞の侵入を制限するバリア層としての機能も有している。一方、細胞成分よりI型コラーゲンやフィブロネクチン、エラスチンなどのECM成分が多く、強度や弾性など物理的な機能を担っている結合組織は、細胞間距離が広く、細胞同士も接着結合などを形成していない。ECM成分も基底膜とは異なっている。また、骨格筋や平滑筋、心筋組織は、複数の細胞が融合して筋線維を形成し、基底膜で覆われている。細胞間距離は、上皮系細胞と同様に非常に狭い。このように、生体の組織や臓器は、複数の構成単位が集合して形成されており、細胞の種類や細胞間距離、細胞間結合、ECM成分など、組織・臓器によって様々である。これら種々の構成因子を制御して構築しない限り、生体に類似の機能と構造を有する3D人工臓器を作製することは不可能である。また、これらの主要因子を制御するためには、プリント技術だけでは困難である。細胞プリントは細胞の配置を制御する技術であるため、それ以上の機能性、例えば、細胞間接着の誘起や血管・リンパ管網の形成などには、別途技術開発が重要である。

我々は、「細胞間接着を誘起した三次元組織体の構築」と「毛細血管・リンパ管網を有する三次元組織体の構築」の技術開発が重要と考え、これまで研究に取り組んできた。また、それらの技術を細胞プリント技術と融合することで、生

体組織に類似の機能を有する三次元組織体チップの開発にチャレンジしてきた。その概要を紹介する。

3. 細胞積層法による三次元組織体の構築

細胞は、外部との情報交換や機能発現を細胞膜界面で制御している。生体内において、細胞の界面構造と機能の制御に重要な役割を果たしているのが、細胞周辺に存在するECMタンパク質(コラーゲンやフィブロネクチン等のタンパク質や多糖類)である。例えば、細胞接着とは細胞膜のインテグリン分子とECMとの相互作用であり、また、ECM成分であるフィブロネクチンやビトロネクチンと細胞膜分子の相互作用が細胞の生存や増殖、シグナル伝達、分化誘導に強く影響することが明らかにされている。そこで、筆者らはこのECMの働きに着目し、ECMのように細胞の界面構造を制御できれば細胞の組織化や機能を操作できると考え、人工的にECM成分のナノ薄膜を細胞表面に形成し、細胞を一層ずつ積層する「細胞積層法」を考案した(図2)⁽¹³⁾。つまり、細胞の表面にECMの“ナノレベルののりづけ”をつくることで細胞を1層ずつ積み上げる手法である。細胞表面へECM薄膜を形成する手法として、著者らは、ナノメートルオーダーで高分子薄膜を調製できる交互積層(layer-by-layer:LbL)法を用いた(図2)。接着タンパク質として知られるフィブロネクチン(FN)とコラーゲンの変性体であるゼラチン(G)の交互積層薄膜(FN-G薄膜)をおよそ6nmの膜厚で細胞表面に形成すると、二層目の細胞が接着した。FNは細胞表面の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンやコラーゲン、ゼラチンとの相互作用ドメインを有しているため、わずか6nmという膜厚でも細胞接着足場として機能したと考えられる。一方、対照実験として薄膜を形成しない場合や膜厚が薄い場合、均一な二層構造は得られなかった。また、10nm以上の薄膜でも同様の効果が確認されたため、少なくとも6nm以上のFN-G薄膜が次層の細胞接着の足場として重要であることが明らかとなった。本手法を繰り返すことで、望みの細胞を望みの層に配置した3次元構造が構築可能となる。著者らはこれま

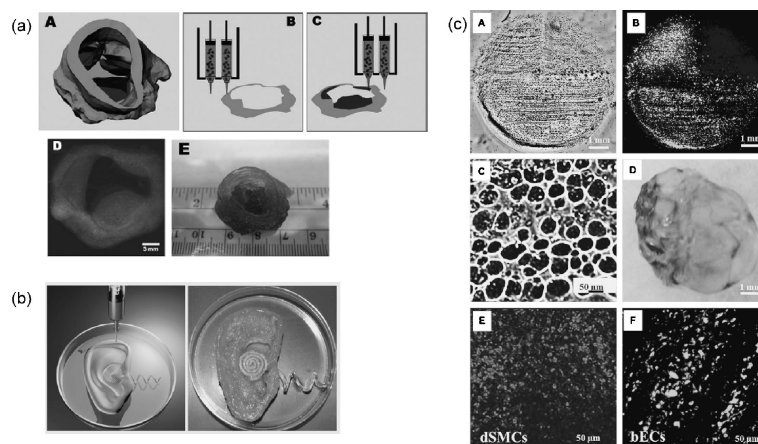


図1 3D細胞プリントで構築された(a)心臓弁組織⁽⁹⁾、(b)耳介組織⁽¹⁰⁾、(c)腎臓組織⁽¹²⁾。

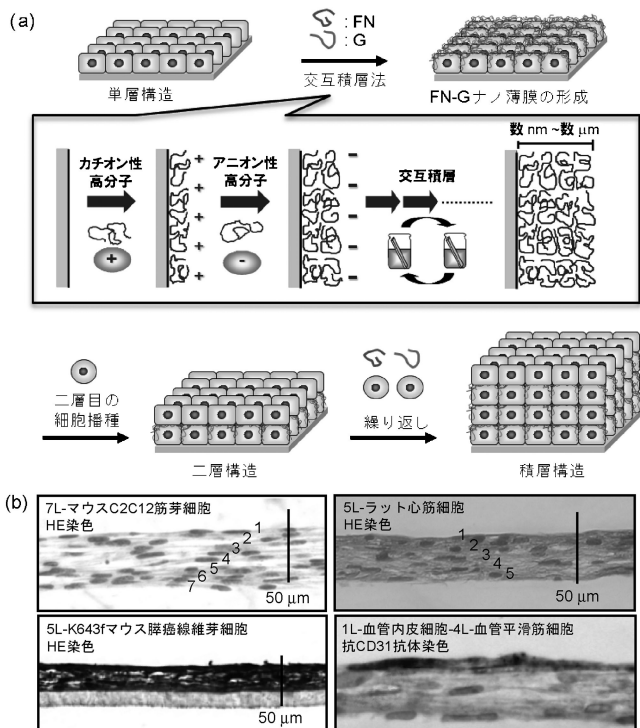


図2 (a) LbL法を用いた細胞積層法のイメージ. (b) 細胞積層法で構築した様々な積層組織体の組織切片写真. ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による組織染色及び抗CD31抗体を用いた血管内皮細胞の染色.

で、血管内皮細胞と平滑筋細胞を組み合わせた“血管壁モデル”や筋芽細胞による“骨格筋モデル”，腫瘍間質線維芽細胞による“腫瘍間質モデル”などを構築しており，生体組織により近い応答が得られることも明らかとなった⁽¹⁴⁾.

4. 細胞集積法による組織構築

以上のように，細胞積層法は細胞の配置を一層ずつ制御して多層構造を構築できる画期的な手法であるが，各層の細胞が安定に接着するまで半日ほど培養する必要があり，一日二層の作製が限度であった．例えば，20層の構造を作製するためには約10日以上もの日数が必要であるため，産業化するにあたって非常に大きな課題であった．そこで，従来の接着した細胞表面でなく，分散状態の個々の細胞表面にFN-G薄膜を形成し，1段階で積層組織を構築する「細胞集積法」を考案した(図3)⁽¹⁵⁾．LbL法は薄膜を形成する基材に制限はないため，分散状態，つまり粒子状の細胞表面に対してもFN-G薄膜の形成が可能であり，形成されたFN-G薄膜は細胞間相互作用を誘起可能であると期待した．FN-G薄膜を形成したヒト皮膚由来線維芽細胞(NHDF)を，コンフルエント時の細胞数を1層分とし，望みの層数分の細胞数を一度にカルチャーインサートに播種したところ，わずか1日の培養にも関わらず，層数を制御した三次元積層組織が構築可能であった．また培地量を増やすことで，細胞の種類に依

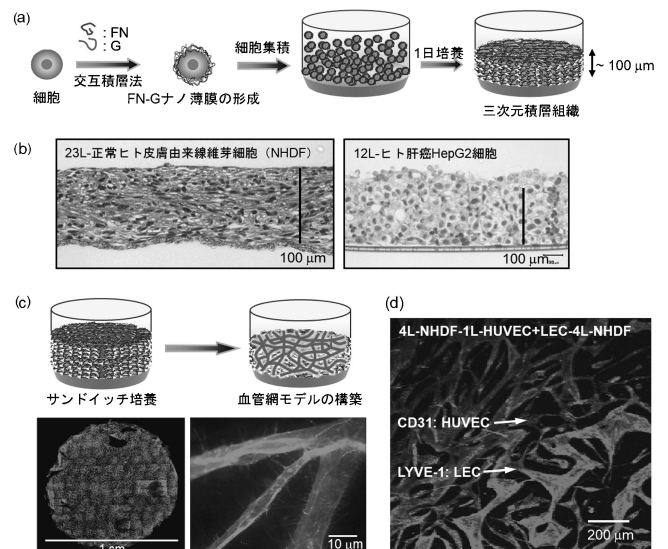


図3 (a) 細胞集積法のイメージ. (b) 細胞集積法で構築したNHDF組織およびHepG2組織のHE染色画像. (c) サンドイッチ培養による血管網モデル構築のイメージと蛍光免疫染色による構造観察. (d) HUVEC及びLECのサンドイッチ培養組織の蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡イメージ(右). HUVECとLECがそれぞれ独立したネットワーク構造を形成.

存せず最大およそ100 μm，組織体(NHDF組織およびヒト肝癌HepG2細胞組織)が得られた(図3(b)).

また，本細胞集積法を用いることで，血管網およびリンパ管網モデルの構築にも成功している．生体内には，およそ100~200 μmに一本の毛細血管が存在することで栄養を供給している．そのため，100 μm以上の組織体において内部細胞の壊死を防ぐためには，毛細血管網を構築する必要がある．岡野らは，血管内皮細胞を筋芽細胞および線維芽細胞のシートでサンドイッチ培養することで毛細血管様の形態変化が起こり，さらに生体への移植時に血管網構造が有効であることを報告している．本手法においても，層数を制御したNHDF組織によってヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)のサンドイッチ培養を行ったところ，組織内に血管網様のチューブ構造が構築されることを見出した(図3(c))．得られた血管網は高密度(面積で約50%)かつ均一(約100 μm毎に形成)であり，生体の血管新生時に類似の形態が観察された．このように血管新生を強く誘導した理由としては，HUVECの三次元培養および周囲のNHDF組織からの血管新生因子の供給が主に考えられる．さらに驚くべきことに，HUVECとヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞(LEC)を同時にサンドイッチ培養したところ，血管とリンパ管が独立してチューブ構造を形成し並走した，生体に非常に類似した脈管構造を形成している様子が観察された(図3(d))⁽¹⁶⁾．以上より，細胞集積法を用いることで，より厚く，かつ脈管構造を有する三次元組織体の短期構築を実現することができた．

5. 細胞プリントによる肝組織チップの開発と毒性試験への応用

著者らは、FN-G 薄膜形成を用いた細胞積層技術とインクジェットプリント法を融合することで、マイクロメートルサイズの様々な組織モデルを集約した「組織チップ」の構築に取り組んだ(図4(a))⁽⁶⁾。細胞とFN溶液、G溶液をインクジェットプリントで吐出することで、細胞の定点配置とFN-G 薄膜形成が自動化され、創薬評価に応用可能な組織チップが構築できると考えた。発熱の影響の少ないピエゾ式インクジェットを用いて、タンパク質溶液の吐出および細胞の吐出実験を行った。図4(b)に示すように、蛍光ラベル化したローダミンラベル化フィブロネクチン(Rh-FN)およびフルオレセインイソチオシアネートラベル化ゼラチン(FITC-G)を各層数で交互に吐出したところ、マイクロメートルオーダーで配置が制御されたFN-G 薄膜の形成が確認された。また、プリンターヘッドの口径と吐出液滴数を変えることで、細胞の吐出数を1個から10000個まで精密に制御可能であった(図4(c))。また、NHDF、マウス C2C12 筋芽細胞、HUVEC など細胞の種類を変えても生存率は95%以上であることが確認された。組織チップの基板として、直径500 μm 、高さ200 μm のウェルを440個有するウェル基板を用いた(図4(d)-(f))。このウェル基板へマウス C2C12 筋芽細胞

を吐出して接着させ、FN溶液とG溶液を交互に吐出することで細胞表面にナノ薄膜を形成した。その後、再び筋芽細胞を吐出することで、筋芽細胞の2層構造を作製することができた(図4(g))。

チップを作製するためには、各スポットに細胞数を制御して精密に吐出することが重要となる。そこで、50ヶ所に100個の細胞を吐出し、プリントされた細胞数を評価した(図5)。最初の3ヶ所の吐出細胞数は60~80個と少なかったが、それ以降はおおよそ100個の細胞を再現よく吐出することが確認された。初期の吐出不良に関しては、捨て打ちなどにより対応できると考えられる。

組織チップとして薬剤評価へ応用することを目的として、次に肝組織チップの作製を試みた。肝臓は薬物や化合物を分解する重要な臓器であり、薬物毒性の7割は肝臓で発現するため医薬品開発では最も重要な臓器である。著者らは、肝

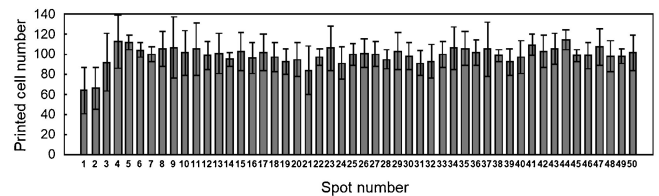


図5 50ヶ所に100個の細胞をプリントした時の各スポットにおける吐出細胞数。

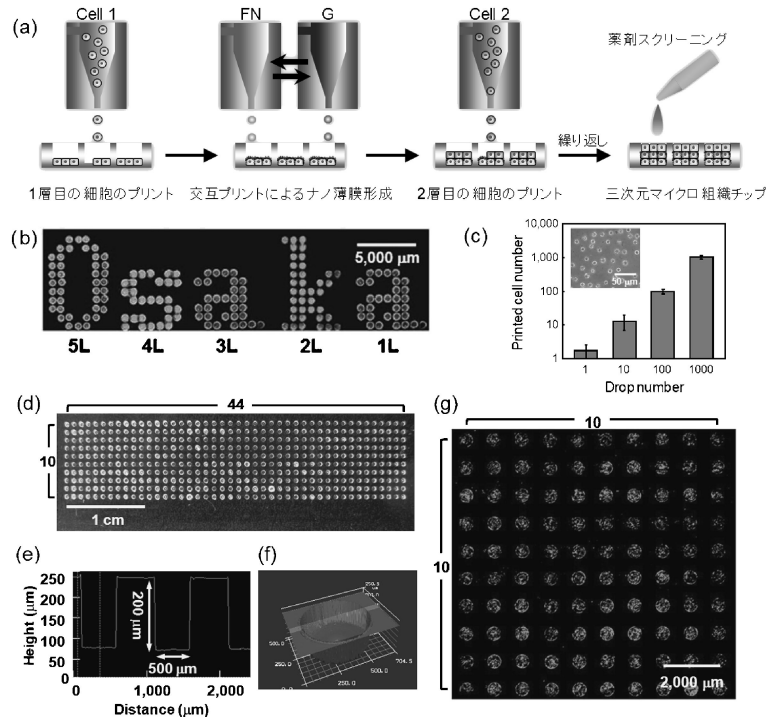


図4 (a) インクジェットプリントによる三次元組織チップの構築イメージ。(b) インクジェットプリントによるFN-G 薄膜の形成。Rh-FN および FITC-G を使用し、薄膜の層数と配置を制御。(c) 細胞の吐出条件の評価(濃度: 1×10^7 cells/mL)。(d) 使用した440マイクロウェル基板。(e), (f) レーザー顕微鏡によるウェルの構造解析。(g) C2C12 筋芽細胞の2層構造を作製したチップの蛍光顕微鏡写真。細胞はセルトラッカーグリーンで蛍光染色した。

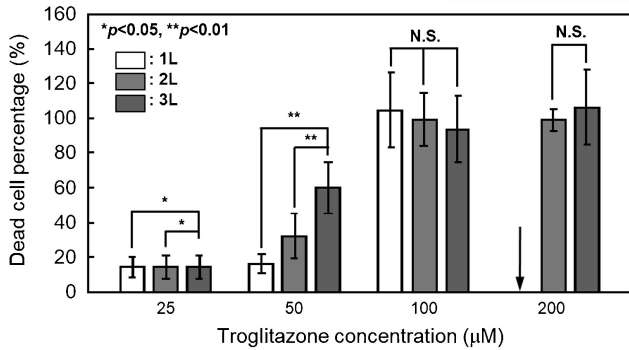
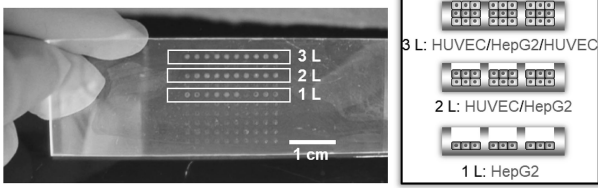


図6 ヒト肝癌細胞(HepG2)とヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)で作製した1~3層構造の肝組織チップの写真(上). トログリタゾン濃度に依って死細胞の割合と層構造の関係(下). LIVE/DEAD アッセイにより死細胞を蛍光強度で評価した. 矢印は死細胞が剥離して定量できなかったことを示す.

組織の構造に着目し、ヒト肝がん細胞(HepG2)をHUVECで挟んだ積層構造を構築することで肝組織としての機能の向上を試みた。

まずは、HepG2とHUVECの1-3層構造を一枚のチップの中に作製して種々の活性を評価した(図6)。基礎的な細胞機能の評価するために、蛍光免疫染色によって各層数の肝組織におけるアルブミン産生量を定量した。その結果、7日間培養後において、アルブミンを産生する肝細胞の細胞数は一定であるにも関わらず、HUVECでサンドイッチした3層構造が1層構造と比較して4倍以上多く産生していることが明らかとなった。

また、薬物代謝酵素の一種であるシトクロムP450 3A4(CYP3A4)の活性を評価した結果、やはり3層構造が最も高い産生量と代謝活性を有していることが確認された。そこで、実際に毒性がある薬物を用いて評価を行った。トログリタゾン(TGZ)は、インスリン抵抗性を軽減する糖尿病治療薬として市販されたが、肝障害が明らかとなり2000年に自主回収された薬剤である。その後の分析で、CYP3A4で代謝された反応性代謝物が毒性を示すことが明らかとなった。つまり、CYP3A4代謝活性が高いほど低濃度のTGZで毒性が発現して死細胞数が増加するため、肝組織モデルとしての機能がTGZで評価可能である。図6下に、TGZ濃度に対する1-3層構造の死細胞数変化のグラフを示した。3層構造においてより低濃度でも死細胞が顕著に観察され、特にTGZが50 µMの場合、1層構造では16%の死細胞割合であったのに対して3層構造では60%(約4倍)まで増加し、HUVECで挟んだ3層構造にすることでHepG2の薬物代謝

活性が向上することが明らかとなった。これらの結果より、本インクジェットプリント法によって作製した組織チップにおいて、他の細胞と共培養した三次元モデルが従来の単層モデルよりも薬剤評価モデルとして有用であることが示された。

6. おわりに

細胞積層法および細胞集積法、細胞プリントに基づく新しいヒト三次元生体組織モデルの構築と薬剤効果判定・毒性評価への応用について紹介した。本手法によって、皮膚や血管、リンパ管、肝組織、心筋組織など様々な臓器モデル、さらには臓器チップの開発が進められている。細胞プリントに関しては、高粘度による吐出不良や乾燥による細胞へのダメージなど技術的な課題が多いのは事実であるが、実現された時の社会貢献度は非常に大きいと期待されている。研究を加速したい。

文献

- (1) S. V. Murphy and A. Atala: Nat. Biotech. **32**(2014), 773-785.
- (2) B. Derby: Science, **338**(2012), 921-926.
- (3) V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs and R. R. Markwald: Trends Biotechnol., **21**(2003), 157-161.
- (4) T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J. J. Hickman and T. Boland: Biomaterials, **26**(2005), 93-99.
- (5) R. E. Saunders, J. E. Gough and B. Derby: Biomaterials, **29**(2008), 193-203.
- (6) M. Matsusaki K. Sakaue, K. Kadowaki and M. Akashi: Adv. Healthcare Mater., **2**(2013), 534-539.
- (7) A. Yusof, H. Keegan, C. D. Spillane, O. M. Sheils, C. M. Martin, J. J. O'Leary, R. Zengerle and P. Koltay: Lab Chip, **11**(2011), 2447-2454.
- (8) G. Fielding and S. Bose: Acta Biomater., **9**(2013), 9137-9148.
- (9) B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang and J. T. Butcher: J. Biomed. Mater. Res. Part A, **101A**(2013), 1255-1264.
- (10) M. S. Mannoor, Z. Jiang, T. James, Y. L. Kong, K. A. Malatesta, W. O. Soboyejo, N. Verma, D. H. Gracias and M. C. McAlpine: Nano Lett., **13**(2013), 2634-2639.
- (11) A. Skardal, D. Mack, E. Kapetanovic, A. Atala, J. D. Jackson, J. Yoo and S. Soker: Stem Cell Transl. Med. **1**(2012), 792-802.
- (12) T. Xu, W. Zhao, J.-M. Zhu, M. Z. Albanna, J. J. Yoo and A. Atala: Biomaterials, **34**(2013), 130-139.
- (13) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara and M. Akashi: Angew. Chem. Int. Ed., **46**(2007), 4689-4692.
- (14) M. Matsusaki: Bull. Chem. Soc. Jpn., **85**(2012), 401-414.
- (15) A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki and M. Akashi: Adv. Mater., **23**(2011), 3506-3510.
- (16) M. Matsusaki, C. P. Case and M. Akashi: Adv. Drug Deliv. Rev., **74**(2014), 95-103.



松崎典弥

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★
 2003年 鹿児島大学大学院理工学研究科博士課程短期修了
 2006年8月 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 助教
 2008年10月-2011年3月および2015年10月-現在, JST-さきがけ研究者(兼任)
 2015年10月-現職
 専門分野: 生体材料, 機能性高分子, 組織工学
 ◎高分子化学に基づいた細胞制御技術の研究に従事。
 Scientific Reports誌(Nature Publishing group)や PLoS ONE誌(PLoS group)のAcademic Editor.
 ★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★