

3 次元肝組織デバイスの構築及び機能評価の為の基礎研究

富山大学大学院 生命融合科学教育部 生体情報システム科学専攻

31181101 荒井健一

1. 背景

工学的に生体組織やそれに準ずるものを作製し、疾病の治療や医薬品のスクリーニング等に用いることは、再生医療や組織工学における最大のテーマである。しかし、心臓や肝臓のような構造が複雑かつ 3 次元構造を有している臓器に関しては、生体内外いずれにおいても作製は非常に困難である。心臓は収縮機能障害が生じる心筋症という病気があり、現在までに補助型人工心臓、細胞から心筋シートを形成し、心臓の収縮を補助する治療法がある。それに対して肝臓はウイルス性の劇症肝炎や、肝硬変といった病気があり、肝臓の働きが 30%以下になると有効な治療法がなく、肝臓の機能を有する人工的なシステムが必要不可欠となる。

肝臓は、上皮性の組織であり、成人男性で約 1500g、女で 1300g を占める臓器である (**Figure1A**)。生体内の肝臓では、アルブミンや補体成分などの血漿成分であるタンパク質の産生やアンモニアの代謝、薬物代謝や解毒作用など様々な機能を肝実質細胞が有している。肝臓の組織は、いくつもの肝小葉から構成され、肝特異的な機能を有している (**Figure1B**)。肝小葉は、肝実質細胞の配列により、小葉構造を有しており、肝実質細胞間では細胞膜が変形し毛細胆管を形成している (**Figure1C**)。更に、肝小葉は全体に血液が供給する為に、肝小葉間動脈と肝小葉間静脈が全体に張り巡らされており、類洞内皮細胞から構成されている毛細血管を介して肝実質細胞へ栄養素などを供給している。肝臓の肝小葉は、肝特異的な機能を担う肝実質細胞や、血液を肝臓の細部まで供給する為の毛細血管を構成している類洞内皮細胞、類洞に存在し、マクロファージと同様の機能を有するクッパー細胞などから構成されている。従って、肝臓は肝小葉から構成されており、肝小葉は 3 次元かつ微小環境を有しており、多種の細胞から構成されている。

肝臓の再生医療、組織工学では、主に肝特異的な機能を有する肝実質細胞を用いた方法が報告されている。一般的な手法としてコラーゲングルを用いて肝実質細胞をサンドイッチするコラーゲンサンドイッチ法と細胞の凝集体であるスフェロイドを形成する方法がある。JAMES C.Y.DUNN らは、コラーゲングルを培養皿上に作製し、その後肝実質細胞を播種し、コラーゲングルを再び上から被せ、3 次元培養環境下で細胞が接着できる方法を報告している [1]。この手法と 2 次元の培養皿での培養方法と比較した際に、コラーゲンサンドイッチ法の方が二次元の培養方法よりも肝特異的な機能を維持できることを報告している。更に Koide らは、肝臓由来のプロテオグリカン培養皿表面にコートし、肝実質細胞を播種することで細胞の凝集体であるスフェロイドを形成し、3 次元培養環境を模倣することで肝特異的な機能の一つであるアルブミン産の生能を維持できることが報告されている

[2-3]。近年では、肝臓由来の細胞外マトリックスのみを溶解し、培養皿上で細胞外マトリックスとして用いることで肝実質細胞の肝特異的な機能を維持する方法や、肝臓の組織から細胞外マトリックスの骨格を残し細胞のみを除去し(脱細胞化技術)、肝実質細胞を播種することで血管のようなかん流構造を有する培養法が報告されている[4-5]。

以上のことより、肝臓の再生医療、組織工学では細胞だけでなく、周辺環境である細胞外マトリックスの成分や組織特有の微小環境も重要な因子だと考えられる。

肝臓の組織を人工的に作製する為には本研究では、生きた細胞を自在に配置して3次元構造を構築することが必要と考え、それを実現可能な技術として、インクジェット技術に着目した。インクジェット技術は多種のインクを適材適所配置しながら打ち出して、高精細な印刷を実現している。この技術を応用し、インクの代わりに細胞や生体材料を打ち出す3Dバイオプリンターを開発した。この3Dバイオプリンターでは、細胞を含むインクジェット液滴をゲル化させることによって、多種の細胞を配置しながら、3次元の構造物を作製する。我々は今まで、このシステムを用いてチューブやシートの作製に成功してきた。

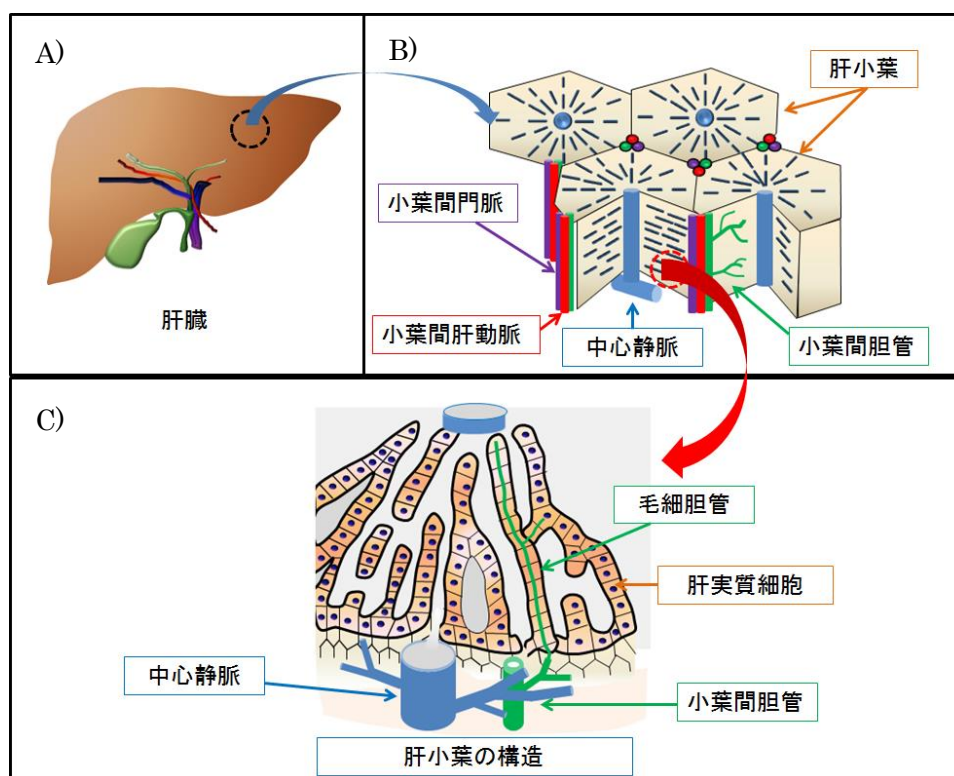


Figure1 肝臓の構造

肝臓組織の全体図(A)、肝臓組織を構成している肝小葉構造の拡大図(B)、肝小葉の構造(C)

2. 目的

上記のようにチューブやシートのような比較的単純な構造体の作製には成功しているが、肝組織のような複雑な構造体に関しては作製まで至っていない。そこで、本研究では、インクジェットを用いた 3 次元積層造形による生体組織構築法をさらに発展させていくことを本研究の第一の目的とする。

本目的を遂行する為に、装置の改良に取り組んできた。従来の装置では、作製可能な 3 次元構造はまだシートの積層やチューブ構造に限られている。理由としては、従来の 3D バイオプリンターの作製方法は、画像を線の集合体と考え XY 軸の座標を画像のドットで指定するベクター方式を用いて、3 次元の積層断面のデータを認識する為である。しかし、生体内の臓器、組織の断面画像をベクター方式で再現するのは困難を極める(**Figure2**)。そこで、本研究では、画像のそれぞれ 1 ドットに色情報を持たせた画像表示の方法であり、画像を点の集合体として認識させるラスター方式に変更し、複雑なゲル構造物が作製できるか検討した。

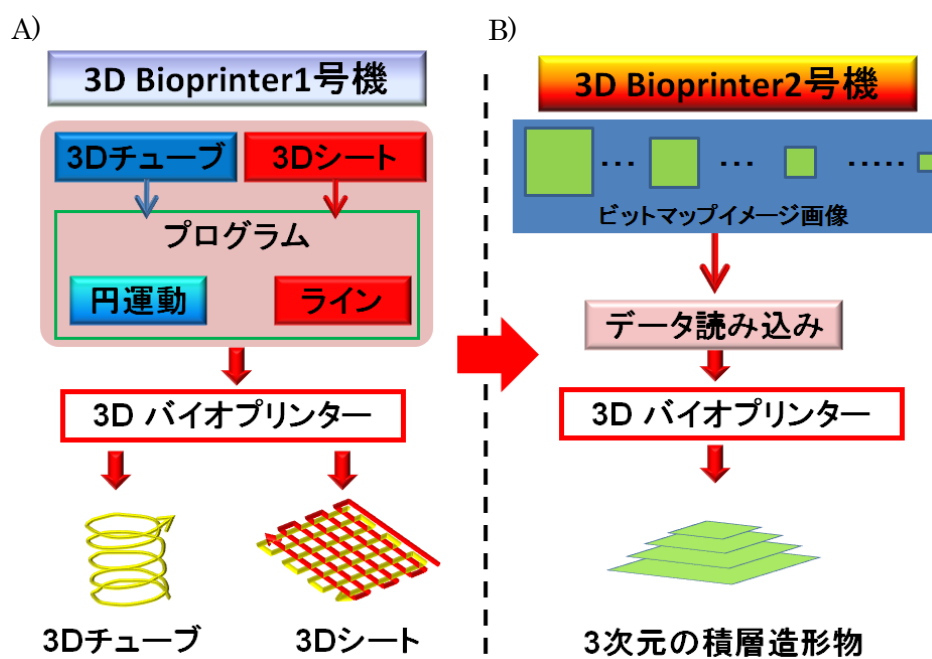


Figure2 開発された 3D バイオプリンターの吐出システムの改良

チューブやシート構造物を作製できるベクター方式(A)、より複雑なゲル構造物の作製の為のラスター方式(B)

3. 実験方法

3D バイオプリンターを用いた複雑なゲル構造物の作製

- 3D バイオプリンターの装置の概略

3D バイオプリンターは以下のような構成になっている(**Figure3**)。 **Figure3A** はバイオプリンター本体であり、細胞を扱う為、クリーンベンチの中に装置が収まるサイズで開発された。 **Figure3B** はバイオプリンターのモーター制御装置、インクジェットのヘッドのノズルコントロール装置となっている。 **Figure3C** が本装置で用いたインクジェットの富士電機社のノズル部分であり、本装置とノズルを用いることで、今までに直径 50-80um のゲルビーズの作製に成功している。更に、ヘッドには4個のノズルがある為、4種類の細胞、ゲル化材料を吐出することも可能である。吐出する方法は、細胞に影響を与えることが少ないと考えられるピエゾ式のヘッドを使用している。 **Figure3D** が実際に細胞とゲル前駆体溶液を吐出するノズル部分となっている。この部分がモーター制御装置とノズルコントロールと連動しており、マイクロレベルでノズルの移動が可能になっている。

本装置はより複雑なゲル構造物を作製する為にラスタ方式を用いることを試みた(**Figure2B**)。 **Figure2B** のように画像データに基づき、ゲル構造物を作製することで、簡易に複雑なゲル構造物を作製できると考えられる。

本装置を用いてゲル構造物を作製する際には、他にも条件を設定する必要がある。その一つが、画像データのドットとドットの間隔の設定である。使用するノズルの種類によって、1滴の液滴量が異なる為、1滴から形成されるゲルビーズの大きさも異なってくる。この大きさにより、打ち出す点と点の間隔が異なっており、その距離が正確である程、正確な線や、複雑なゲル構造物を作製できる。本研究では、直径が 50-80um のゲルビーズが常に作製できると想定し、ドット間隔を設定した。

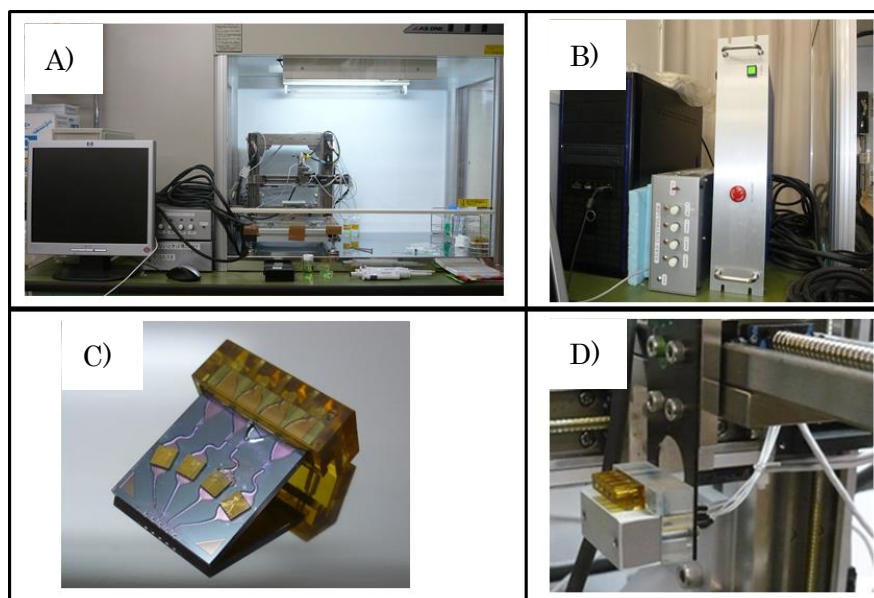


Figure3 開発された 3D バイオプリンター

3D Bioprinter 2 号機は、クリーンベンチに収まるサイズで作成された(A) バイオプリンターのモーター制御装置、インクジェットのヘッドのノズルコントロール装置、(B)使用した富

士電機のノズル、(C)ノズルの装着部分(D)

- ・ 試薬の調整

- ・ 8mg/ml アルギン酸ナトリウム溶液

アルギン酸ナトリウムは既に医薬品として使用されているアルロイド G(Alroid-G; Kyosei Pharmaceutical Co Ltd Hokkaido, Japan)を使用した。アルギン酸ナトリウム溶液は、3D バイオプリンターで吐出できる最適濃度である 8mg/ml の濃度に生食水を用いて希釈した[3]。その後、可視化観察を可能にする為に、蛍光色素を懸濁し、0.2 μ m のフィルターを用いてフィルトレーションし使用した。

- ・ 100mg/ml 塩化カルシウム溶液

塩化カルシウム溶液(NACALAI TESQUE , Inc, Kyoto, Japan)は 100mg/ml の濃度に超純水(以下 MQ)を用いて溶解し、0.2 μ m のフィルターを用いてフィルトレーションし保存した。

- ・ 2% 塩化カルシウム/粘度調整剤溶液

アルギン酸ナトリウム溶液と反応することによりゲル化する下地材料として、粘度調整剤としてキトサンナノファイバーを使用した。上記の保存してある 100mg/ml の塩化カルシウム溶液を使用し、最終濃度が 20mg/ml 塩化カルシウム、20mg/ml キトサンナノファイバー混合溶液になるように、調整し 4 $^{\circ}$ C条件下で保存した。

- ・ 複雑な 3 次元ゲル構造物の作製

方法

開発された 3D バイオプリンターを用いたゲル構造物の作製方法の概略図は Figure4A に示す。図のようにゲル前駆体であるアルギン酸ナトリウム溶液をインクジェットのノズル部分(富士電機)で打ち出す。打ち出した先にはゲル化させる為に図のように粘度調整した 2%塩化カルシウム溶液を設置した。ゲル構造物を作製する際には、ビットマップファイルを装置に読み込ませ、ゲル構造物を作製した。装置作成の際に用いたビットマップファイルは、富山大学のロゴ、ピラミッド構造体となっている (Figure4B-D)。これらの画像データをコンピューターに読み込ませ、ゲル構造物の作製条件を設定し、ゲル構造物を作製した。

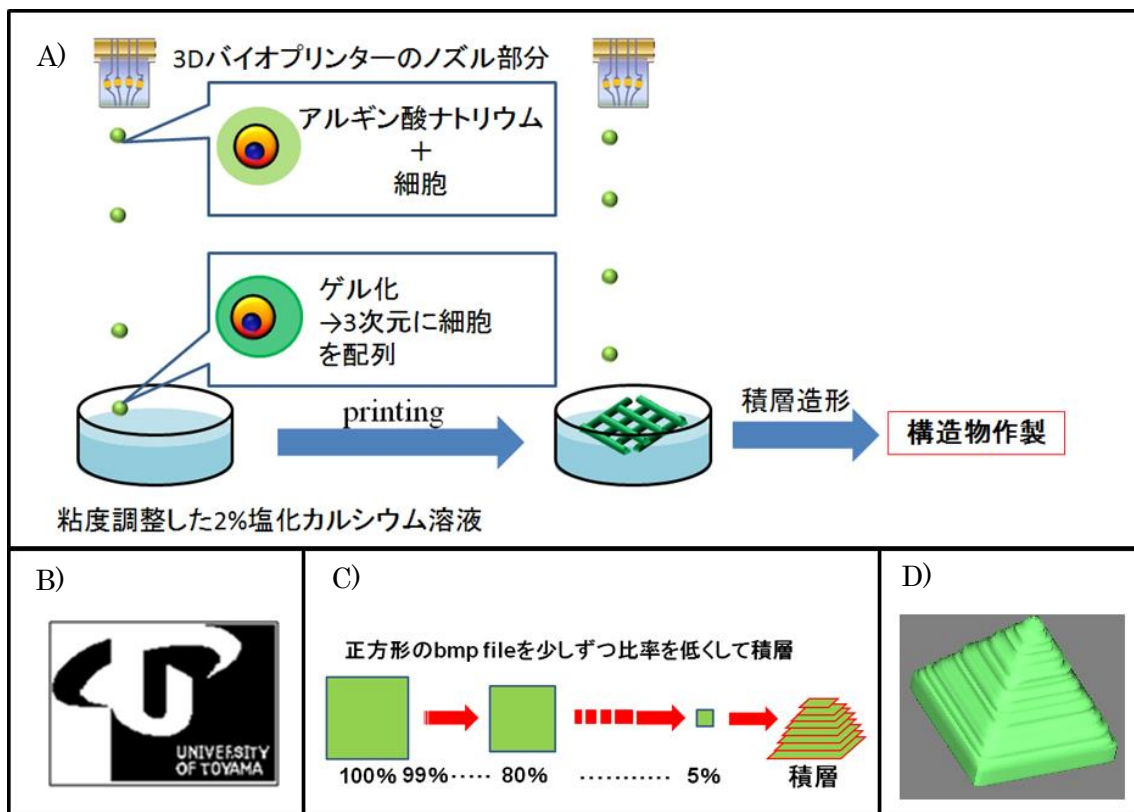


Figure4 3D バイオプリンターを用いたゲル構造物作製の概要

3D バイオプリンターが吐出されたアルギン酸ナトリウム溶液の液滴は、粘度調整した塩化カルシウム溶液内で瞬時にゲル化する。それを繰り返すことで最終的にゲル構造物が作製できる(A)、実際に用いた富山大学のロゴ画像モデル(B)ピラミッドゲル構造物の作製方法(C)、画像データを元にして作製されたピラミッド 3D モデル(D)

細胞入りの 3 次元積層構造物の作製

- ・細胞培養

試薬調整

- ・培地の調整

培地は、DMEM 培地に Fetal Bovine Serum (FBS, JRH Biosciences. Inc, KS, USA)を 10%、ペニシリン/ストレプトマイシン(Sigma, MO, USA)を 1%になるように調整し、冷蔵庫内で保存し、使用する直前に恒温槽内で 37°Cにインキュベーションし、使用した。

- ・0.25%トリプシン/1mM EDTA 溶液

0.25%トリプシン/1mM EDTA 溶液を使用する直前に常温まで戻し、使用した。

・リン酸緩衝生理食塩水(PBS)

塩化ナトリウム 8g、塩化カリウム 0.2g、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 3.63g、リン酸二水素カリウム 0.24g を 900ml の超純水内に入れ攪拌し、塩酸又は、水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 7.4 に調整した。その後、1000ml までメスアップし、オートクレーブ後、冷蔵庫内に保存し、使用する直前に恒温槽内で 37°C にインキュベーションし、使用した。

マウス線維芽細胞の培養

マウス線維芽細胞は、培養皿表面を約 70%コンフルエントになった時点で PBS 溶液を用いて洗浄し、0.25%トリプシン/1mM EDTA 溶液を加え 5 分間インキュベートされた。その後、培地を加え、高速遠心機で 800rpm、5 分遠心し、沈殿した細胞を培地に希釈し新しい培養皿に播種した。

・細胞入りの 3 次元積層構造物の作製

細胞入りの 3 次元積層構造物を作製する為に、8mg/ml アルギン酸ナトリウム溶液、30mg/ml フィブリノーゲン溶液を調整し、 1×10^6 cells/ml の濃度になるように各溶液にマウス線維芽細胞を懸濁した。懸濁した溶液をアルギン酸ナトリウム溶液の場合は、粘度調整した 2%塩化カルシウム溶液、フィブリノーゲンの場合は粘度調整した 500U/ml トロンビン内に吐出し、作製したゲル構造物を血清入りの DMEM 培地に置換し、6 日間培養した。細胞の観察は、1 日目、3 日目、6 日目に顕微鏡を用いて伸展しているか観察した。

Live/ Dead assay

方法

細胞がゲル構造物内で生存することを確認する為に蛍光染色 Calcein-AM、PI (Invitrogen, CA, USA) を用いた。細胞入りのゲル構造物を作製後、培地で洗浄し、Calcein-AM、PI を無血清培地に 1000 倍希釈して、細胞入りのゲル構造物は 1 時間、37°C でインキュベートされた。インキュベーション後、無血清培地を用いて 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡 BioZERO (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。観察の際には、Z スタック機能を用いて 3 次元のゲル構造物の頂点、真ん中、底を観察し、撮影した。

4. 実験結果

2 次元の富山大学のロゴをモノクロビットマップ画像に編集し、3 層のゲル構造物を作製した(Figure5A)。その結果、富山大学のロゴのゲル構造物の文字部分「UNIVERSITY OF TOYAMA」より約 1mm レベルでの文字の作製に成功した (Figure5B)。これは、実際に 2 次元ゲル構造物では 1mm レベルまで形及び生きた細胞の配列を制御することが可能であることを示している。次に、細胞を含んだ 3D ゲル構造物の作製を検討した。作製後、

Live/Dead assay により、ゲル内部の細胞が生存しているか、細胞が均一にゲル内で配列されているか確認した。その結果、作製したゲル構造物の内部で、ほとんどの細胞が生存していることを確認した (Figure5C)。このことから、開発された本装置を用いることにより、細胞にダメージを与えずにゲル構造物を作製できることが示唆される。更に「UNIVERSITY OF TOYAMA」の「S」の部分に着目すると、細胞とゲルを打ち出していない部分(S字部分)と、打ち出した部分で細胞の配列の制御に成功している (Figure5C)。

次により重層かつ複雑なゲル構造物を作製する為に、ピラミッド型のゲル構造物の作製を検討した。画像データは、正方形の画像データを徐々に縮小し、それらの画像データをコンピューターソフト「Z-view」を用いて3次元化することにより、ピラミッドの3Dモデルを得た (Figure6A)。この3Dモデルを参考にし、積層断面の大きな層からゲル構造物を作製したが、3Dモデルのようなピラミッドゲル構造物を作製することはできなかった (not shown data)。そこで、作製できなかった原因としてゲル構造物自身の浮力が影響を及ぼしているのではないかと考え、積層断面の小さな構造物から徐々に積層することを検討した。その結果、95層のピラミッドゲル構造物が作製できた (Figure6C)。このことから、本装置では、ゲル構造物自体の浮力の影響が強く、作製できるゲル構造体の形態に制限があることが考えられる。次に、3次元のゲル構造体内で細胞を配列することが可能かを検討する為に細胞を懸濁したアルギン酸ナトリウム溶液を使用し、13層のピラミッドゲル構造物を作製した (Figure6D-F)。Live/Dead assay により、ゲル内の細胞の生存率を確認した。その結果、ほとんどの細胞が生存していることが確認できる。しかしながら、撮影した蛍光顕微鏡画像を用いて3次元のピラミッド画像を得ることはできなかった。

以上の内容は、2011年、Biofabrication Sep;3(3):034113にて「Inkjet three-dimensional biofabrication based on layered printing of bitmap images」というタイトルで報告した。

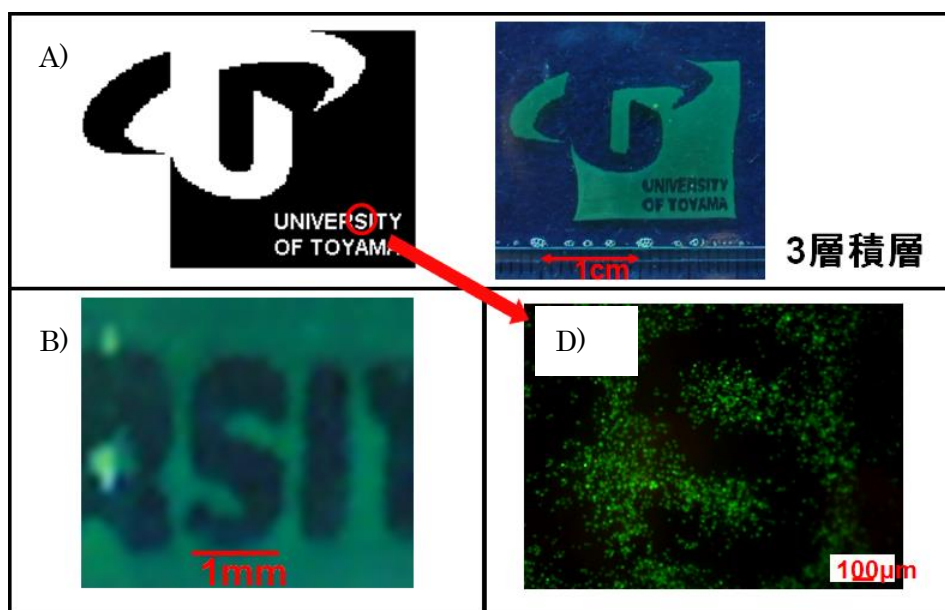


Figure5 二次元の複雑なゲル構造物の作製

実際に作製に使用した画像データ(左)と実際に作製したゲル構造物(右)の作製結果(A)、作製したゲル構造物のアルファベット部分の拡大図(B)、細胞を含んだゲル構造物の Live/Dead assay の結果(C)

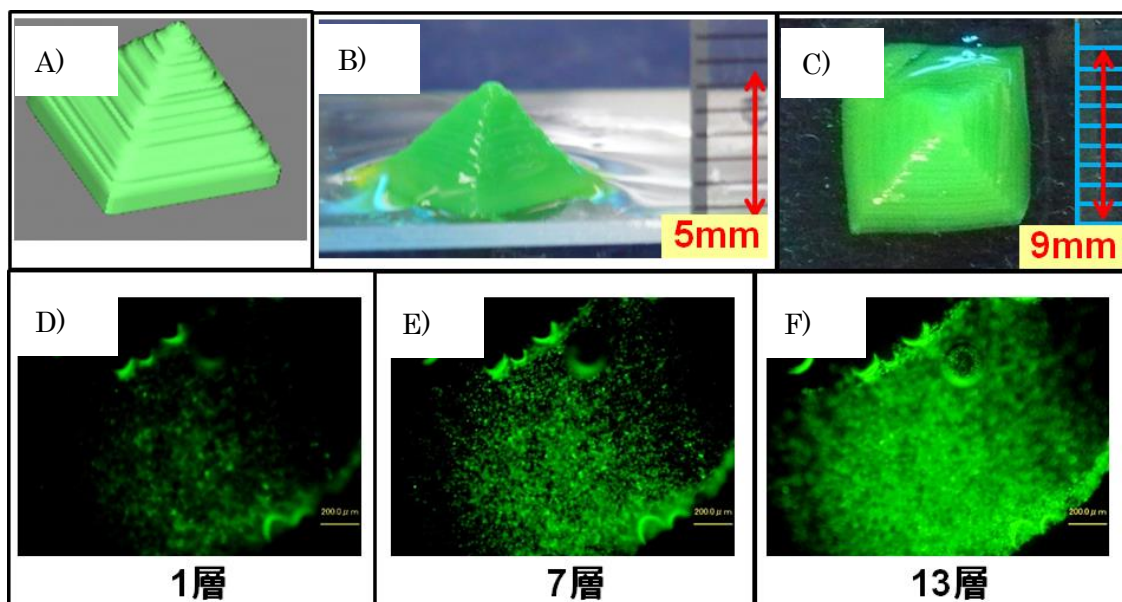


Figure6 三次元の複雑なゲル構造物の作製結果

画像データからソフトを用いて再構築した 3D モデル(A)、実際に作製されたピラミッドゲル構造物(B)、(C)、細胞入りのピラミッドゲル構造物の 1 層目(D)、7 層目(E)、13 層目(F)

5. 考察

本研究ではビットマップ画像を用いた複雑なゲル構造物の作製を検討した。作製を検討したゲル構造体は2次元構造体として富山大学のロゴ、3次元構造体としてピラミッド構造体を検討した。その結果、3D バイオプリンターを用いることにより、1mm レベルの細かなゲル構造物の作製に成功した。本装置で使用している富士電気のノズルは、1滴の吐出量で直径 50-80 μm のゲルビーズの作製に成功している。このことから、本装置を用いることにより、50-80 μm までゲル構造物の形態を制御できることが示唆される。更に本装置を用いて作製したゲル内に細胞を懸濁した結果、2次元、3次元のゲル構造体内でほとんどの細胞が生存していた。従来のプログラムによる作製方法では、ゲル構造物を作製するのに長期間、塩化カルシウム溶液に浸さずに作製し回収できるが、本装置では、ビットマップ画像のドットを読み込み 1 滴ずつ吐出する為、長期間、作製した細胞入りのゲル構造物を塩化カルシウム溶液内に浸す必要がある。本研究で、作製したゲル構造物は、3層の富山大学のロゴマークや、13層のピラミッド構造物の為、作製に長い時間を必要としなかった。その結果、ほとんどの細胞が生存していた。加えて、マウス線維芽細胞や、HeLa 細胞では生存率に問題なかったが組織から細胞を採取するような初代培養では長期間、浮遊状態を維持することが困難な細胞であり、3D バイオプリンターを用いて細胞入りのアルギン酸ゲルを作製し、内部で細胞が生存するのは困難であることが想定される。

他の研究グループでも 3D バイオプリンターの研究が数多く報告されている。Kim Ragaert らは、ポリ乳酸 (PLA) 溶液を 152 $^{\circ}\text{C}$ の高温状態で溶かしその溶液を打ち出す方法で構造物を作製している[6]。この方法は足場材料を作製後に細胞を播種し培養する為、細胞を適材適所に配列することは困難である。他には、Fabien Guillemot ら研究グループがレーザープリンターの技術を利用し既に多種類の細胞の吐出に成功している[7]。しかし、この研究グループは我々が作製できるゲルの大きさである直径 50-80 μm よりも大きく、かつ3次元での複雑なゲル構造物の作製には成功していない。興味深いことに 2012 年に打ち出したゲル構造物とナノファイバーのシートを交互に積層することで、細胞がゲル内で増殖する条件を模索している[8]。ナノファイバーは、細胞の接着だけではなく細胞の配向性を制御すること、細胞に対して 3次元の培養環境を模倣させることができると既に報告されている[9]。本研究でも、今後はアルギン酸ゲルのようなハイドロゲルだけでなく、様々な足場材料を混合させることを検討してみるのも必要かもしれない。

アルギン酸ゲル内で細胞を培養する報告は数多くある。アルギン酸ゲル内でヒト肝癌細胞である HepG2 cells を包埋した際に、肝細胞の薬物代謝酵素であるチトクロム P450 の代謝が上昇していることを報告している[10]。これは、アルギン酸ゲルという細胞が接着しない足場材料である為、細胞が球形を維持していた為だと考えられる。以上の結果より、アルギン酸ゲルは、細胞に対して 3次元のマイクロ微小環境を提供できるが、細胞が接着出来る為にアルギン酸ナトリウムに細胞外マトリックスを加える又は、修飾する必要があるのではないかと考えられる。更に近年の研究結果として Yamada らは、アルギン酸ゲル内で初

代培養であるラット肝実質細胞を包埋し、長期培養に成功している[11]。直径 200 μm 以下のアルギン酸ゲルファイバーを作製し、 3000×10^4 cells/ml の高密度条件で、細胞を包埋する為、細胞間の接着、相互作用が生じ高機能を維持している。現在、本装置で作製できるゲル構造物の中に包埋できる最大濃度は 600×10^4 cells/ml となっている為、低い濃度となっており、細胞間の接着は期待できない。今後、細胞の濃度を濃くする又は、ゲル内で細胞を増殖させることで、細胞間の接着、相互作用が上手く生じる条件で打ち出しできれば、高機能を維持できる可能性がある。

更に細胞は、コラーゲンや、ラミニンのような組織由来の様々な細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) を用いることで機能が異なることが知られている。今後、3次元の構造体を作製する際には、アルギン酸ゲルだけでなく、様々なゲルを 3D バイオプリンターで試みる必要があると思われる。

6. 結論

本研究により、3D バイオプリンターを用いたゲル構造物の作製方法を改良することで、チューブやシート構造よりも複雑なピラミッドの形態をしたゲル構造物の作製に成功した。更に、作製したゲル構造物の内部で細胞がほとんど生きていることも確認できた。

今後、細胞が組織特有の特徴を有する為に、最適なゲル材料を用いること、ゲル構造物の形態を考慮することが望まれる。

7. 参考文献

- [1] Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. 1989 FASEB J. Feb;3(2):174-7.
- [2] Koide N, Shinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M, Tsuji T. Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. Biochem Biophys Res Commun. 1989 May 30;161(1):385-91.
- [3] Shinji T, Koide N, Tsuji T. Glycosaminoglycans partially substitute for proteoglycans in spheroid formation of adult rat hepatocytes in primary culture. Cell Struct Funct. 1988 Apr;13(2):179-88.
- [4] Nakamura S, Ijima H. Solubilized matrix derived from decellularized liver as a growth factor-immobilizable scaffold for hepatocyte culture. J Biosci Bioeng. 2013 Dec;116(6):746-53.
- [5] Shirakigawa N, Takei T, Ijima H. Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering. J Biosci Bioeng. 2013 Dec;116(6):740-5.
- [6] Kim Ragaert, Ludwig Cardon, Arne Dekeyser and Joris Degrieck 2010 Machine design and processing considerations for the 3D plotting of thermoplastic scaffolds. *Biofabrication* 2 014107(8pp)
- [7] Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, Bareille R, Rémy M,

- Bordenave L, Amédée J, Guillemot F. 2010 Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization *Biomaterials*. Oct;31(28):7250-6.
- [8] Catros S, Guillemot F, Nandakumar A, Ziane S, Moroni L, Habibovic P, van Blitterswijk C, Rousseau B, Chassande O, Amédée J, Fricain JC. 2012 Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo. *Tissue Eng Part C Methods*. Jan;18(1):62-70.
- [9] Feng ZQ, Chu X, Huang NP, Wang T, Wang Y, Shi X, Ding Y, Gu ZZ. 2009 The effect of nanofibrous galactosylated chitosan scaffolds on the formation of rat primary hepatocyte aggregates and the maintenance of liver function. *Biomaterials*. May;30(14):2753-63.
- [10] Lan SF, Safiejko-Mroccka B, Starly B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: a study of cell viability, morphology and drug metabolism. 2010 *Toxicol In Vitro*. Jun;24(4):1314-23.
- [11] Yamada M, Utoh R, Ohashi K, Tatsumi K, Yamato M, Okano T, Seki M. Controlled formation of heterotypic hepatic micro-organoids in anisotropic hydrogel microfibers for long-term preservation of liver-specific functions. 2012 *Biomaterials*. Nov;33(33):8304-15.