

論文の内容の要旨

論文題目 Study on tissue engineering in microspace toward construction of small-caliber vasculature
(微細血管構築のためのマイクロ空間内組織工学に関する研究)

氏名 山下 忠 紘

1. 緒言

近年組織工学では臓器を体外で構築する研究が進められているが、数百 μm を超える組織への拡散のみによる酸素・栄養の供給は困難であり、管径数百 μm スケールの微細血管組織の体外構築と埋め込みが必要とされている。しかし、従来実現されてきた血管組織構築法の適用範囲は、操作が容易な管径数 mm 以上のもの、あるいは細胞の自己組織化が可能な管径数十 μm 以下の組織に限られており、臓器構築に重要な管径数百 μm スケールの微細血管組織の体外構築は困難であった。一方近年このような微小スケールで、微細加工技術を用いてガラス基板内部に微小流路や反応容器を作製し、様々な化学操作を μm スケールに集積化するマイクロ化学チップが盛んに研究されてきた。この技術は様々な細胞の培養に応用され、血管組織においても内皮細胞の単層培養が実現された。しかし、従来のマイクロ流路は導入口を除いて完全に密閉された空間であり、内部で培養した組織をチップ外部へ回収することは不可能であった。そこで本研究は、マイクロ化学チップ細胞培養法を発展させ、多層血管組織の培養及び回収を可能にする新しい細胞培養法を創成できれば、血管構築に課題を持つ組織工学においてブレイクスルーになると着想した。

以上を踏まえ、本研究はマイクロ化学チップによる細胞培養技術を用い、数十～数百 μm の管径を持ち、平滑筋細胞と内皮細胞の多層構造からなる血管組織の培養法を創成することを目的とした。具体的に(1) 組織回収のための分離型マイクロ化学チップシステムの開発 (2) マイクロ空間における多層血管組織構築法の設計 (3) 多層血管組織の構築と回収に取り組んだ。

2. 組織回収のための分離型マイクロ化学チップシステムの開発

第2章では、マイクロ空間で培養した組織を回収可能な新しい分離型マイクロ化学チップシステムを開発し、マイクロ化学チップによる新しい組織工学手法の原理を実証した。

2-1 表面化学修飾による分離型マイクロ化学チップの提案

組織の回収を実現するため、上下基板を圧力で固定し、細胞培養後にマイクロ流路を開放できる分離型マイクロ化学チップ細胞培養システムを着想した(図1a)。この際、(1)液漏れの無い組織培養、(2)非侵襲的な組織の着脱を実現するため、基板間隙からの液漏れを毛管力により防止する疎水性表面と、温度操作により細胞の着脱を制御する温度応答性高分子ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)からなるパターンニング表面修飾を施すことを考えた(図1b)。

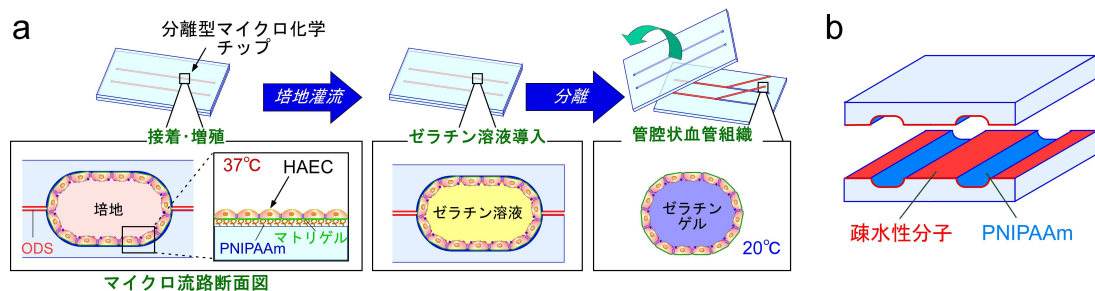


図1 (a) 分離型マイクロ化学チップによる血管組織の構築と回収 (b) 基板の表面修飾

2-2 表面修飾プロセスの確立

パターンニング表面修飾を実現するため、光重合法による疎水性表面上へのNIPAAmの部分重合プロセスを考案した(図 2a)。重合反応の足場として疎水性分子オクタデシルシラン(ODS)を選択し、ガラス表面に気相反応を用いて修飾した。まず、通常的光重合法で可塑剤として通常モノマー溶液に加えられているベンジルアルコール(BA)が、重合後に表面に残存して細胞毒性を示す可能性を検討した。重合時のBA添加量が異なる基板上でヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を培養したところ、残存BAが細胞の密度を抑制していることが分かり(図 2b)、BAを用いない重合反応条件を用いることとした。次に、表面修飾を施した基板を組み合わせ、内部でHAECを培養した。HAECはコンフルエント状態まで増殖し、温度低下により流路壁面から自発的に脱離した(図 3)。この結果から、ODSによる液漏れのない組織培養と、PNIPAAmによる組織の非侵襲的な着脱を達成し、表面化学修飾による分離型マイクロ化学チップの機能を確認した。

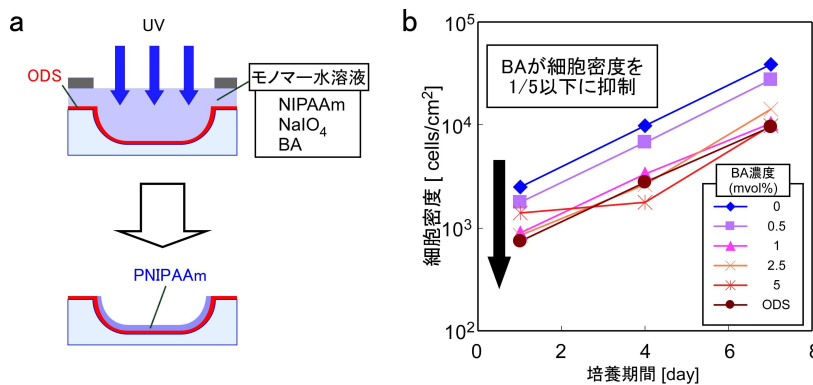


図 2 (a) 光による部分修飾 (b) BA が細胞密度に与える影響

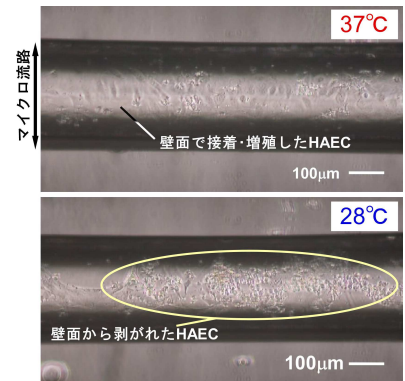


図 3 HAEC の脱離制御

2-3 組織回収の実証

回収時の培養組織支持のため、HAEC を培養したマイクロ流路内に固液相転移が可能なゼラチン溶液を導入した。次に温度低下により溶液を固化させ、基板を分割してマイクロ流路と同形状のゼラチンを回収した。生死判定試薬を用いて表面を観察したところ、改修後の細胞が生きのまま付着している様子が確認できた(図 4)。この結果より、マイクロ流路で培養した組織の回収に初めて成功し、マイクロ化学チップによる微細組織構築法の原理を実証できたと言える。

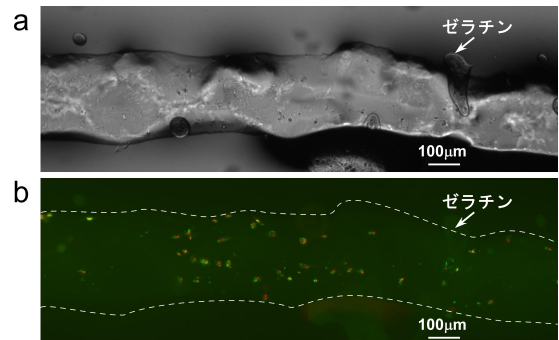


図 4 回収されたひも状のゼラチン構造体(a) 透過光観察 (b) 蛍光観察

3. マイクロ空間における多層血管組織構築法の設計

第 3 章では、従来マイクロ空間での培養が困難であった血管平滑筋細胞の培養条件を検討し、多層血管組織の構築を可能とするマイクロ化学チップを設計した。

3-1 平滑筋細胞培養条件の検討

血管平滑筋細胞は強い伸縮性を持つ運動性の筋肉細胞であり、従来の細胞培養ディッシュ上では容易に増殖するものの、マイクロ空間での培養は困難であった。運動性の細胞をマイクロ空間で培養する際、酸素・栄養の供給量、周囲の物理形状が細胞の接着期・増殖期に影響を与える可能性があると考え、それぞれ検討実験を行った。

まず、接着期の酸素・栄養の存在量が適切であるかを検討するため、ガラス製マイクロ流路と PDMS 製流路を用意してヒト大動脈血管平滑筋細胞(HASMC)を導入し、2 時間後の接着率を比較した(図 6)。

PDMS 製流路でほぼ全ての HASMC が接着したのに対し、ガラス製流路では接着率は 60% に低下した。この結果から、接着期においては栄養が十分に存在するものの、酸素が不足していることが明らかになった。次に、増殖期における栄養供給量を検討するため、細胞培養ディッシュ上で培養面積・時間当たりの培地供給量を変えて (30~270 nL/cm²·s) HASMC を培養し、増殖速度を比較した (図 6)。その結果増殖速度に差は見られず、従来のマイクロ流路内培養における培地供給量 (4000 nL/cm²·s) で十分に栄養が供給できていたことが分かった。一方、細胞の酸素消費量を十分に賄うことが可能な培地供給量を文献値に基づいて試算したところ、7500 nL/cm²·s と見積もられ、増殖期における酸素不足が示された。最後に、流路断面の形状の影響を検討するため、半円形、矩形の溝を持つガラス基板を作製し、HASMC を播種した。播種から 120 時間後、平面上の HASMC がコンフルエント状態まで増殖したのに対し、曲面上で HASMC の被覆率が有為に低下しており、曲面形状が細胞の増殖を抑制することが分かった。

以上の結果から、HASMC をマイクロ空間で培養するために、十分な酸素の供給と平坦な培養表面が必要であると結論づけた。

3-2 曲面における平滑筋細胞の挙動解明

筋肉細胞の培養環境を代謝要求の観点から精査した結果、曲面による増殖抑制という生物学分野においても未知の現象が発見された。次に本章はこの仕組みの解明に取り組んだ。HASMC が持つ強い張力が細胞自身を曲面上から剥がすと仮説を立て、細胞の脱離確率 P を、細胞張力 γ (N/m)、曲率 κ (mm)、接着力 σ_A (N/m²) を用いて

$$P = \frac{\gamma\kappa}{\sigma_A} \quad (\text{式 1})$$

と表す細胞脱離モデルを考案した。次にモデルの検証のため、曲率を様々に変えた石英ガラス基板を用意し、張力を増減する TGF- β ・プレビスタチンの存在下で HASMC を培養し、共焦点レーザー顕微鏡観察 (CLSM) による観察画像を解

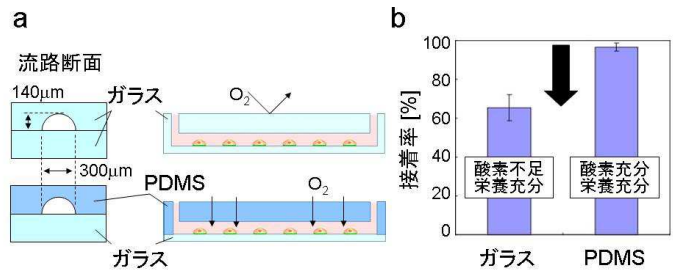


図 5 接着期の検討 (a) 実験 (b) 接着率の比較

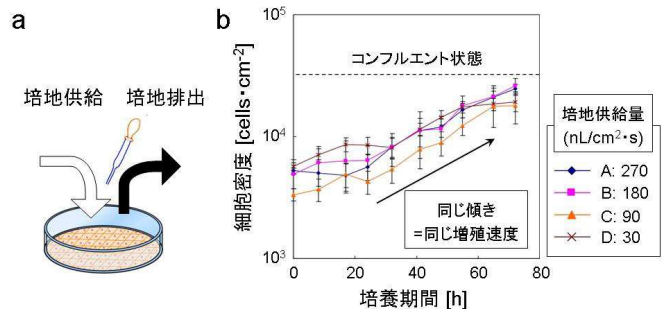


図 6 増殖期の検討 (a) 実験 (b) 増殖速度の比較

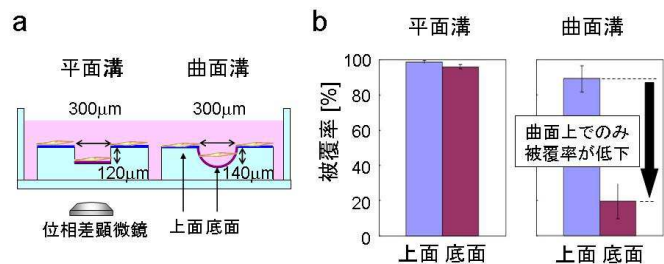


図 7 断面形状の検討 (a) 実験 (b) 被覆率の比較

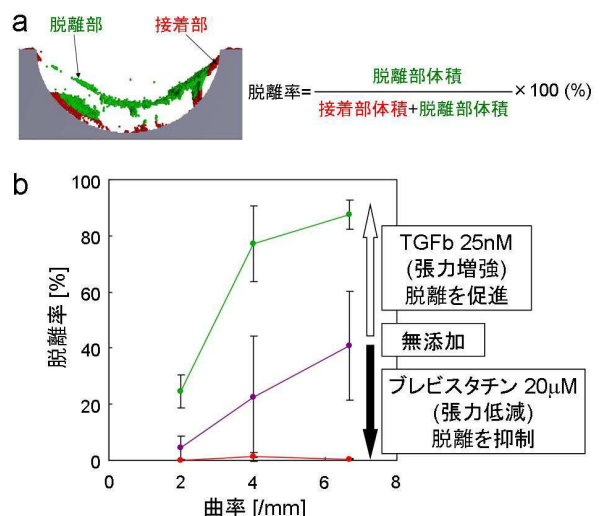


図 8 細胞脱離の解析 (a) 脱離率の評価 (b) 細胞張力と曲面が脱離率に及ぼす影響

析し、曲面上での脱離率を評価した(図 8a)。曲面上に播種された HASMC の脱離率は曲率・張力が増加するほど増大した(図 8b)。これは細胞脱離モデルを支持するものであり、曲面が細胞の張力に作用し、脱離を促すことが明らかになった。

4. 多層血管組織の構築と回収

第 4 章では、第 2 章と第 3 章で得られた知見に基づき、多層血管組織の構築と回収が可能なマイクロ化学システムを開発した。

4-1 分離型マイクロ化学チップの製作

酸素と栄養の供給が十分であり、かつ曲面を用いない矩形形状のマイクロ流路を有する分離型マイクロ化学チップを設計した(図 9)。多孔質 PC 膜と貫通溝を持つガラス基板を接合し、光重合により ODS と PNIPAAm からなるパターンニング表面修飾を施した。

4-2 マイクロ流路内での多層血管組織の構築

多層血管組織の構築を確認するため、分離型マイクロ化学チップと同形状のマイクロ流路を持つマイクロ化学チップを作製した(図 11)。流路内部に HASMC と HAEC を逐次導入して 2 日間培養した。培養後、底面の PC 膜を剥がしてマイクロ流路内部を CLSM で観察したところ、流路内部で培養された HASMC と HAEC からなる多層血管組織が確認された。

4-2 血管組織のマイクロ流路からの回収

分離型マイクロ化学チップを用い、4-2 と同様の手順で HASMC と HAEC を培養した。培養後に温度を低下し、基板を分割したところ、50 μm 程の厚い平滑筋細胞層を持ち、ハンドリングに十分な強度を有する微細血管組織を回収することが出来た(図 12)。回収時の破断により管腔形状が破断しているが、これは基板貼り合わせ時に生じたわずかなずれが血管組織の脱離を妨げ、基板分割時の組織断裂を引き起こしたものと考えられる。今後基板のアラインメント精度向上などの技術的な改善により、管腔状の微細血管組織を回収できると期待できる。以上の結果より、多層血管組織の構築と回収を実証し、分離型マイクロ化学チップによる組織工学の基礎的技術を確認できたと言える。

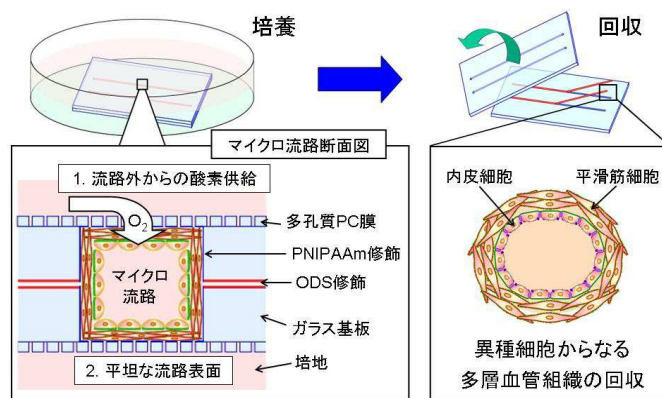


図 9 多層血管組織のためのマイクロ化学チップ

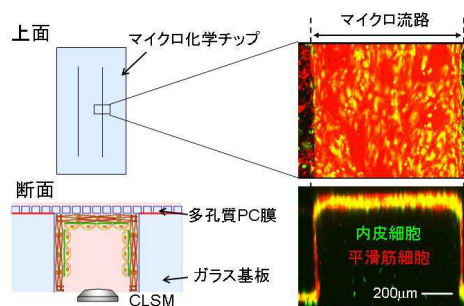


図 10 流路内で構築された多層血管組織の観察

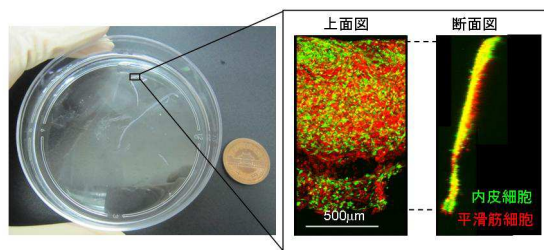


図 11 回収された血管組織

5. 結言

本研究は数十～数百 μm スケールにおける、血管組織の構築の原理を初めて実証した。この研究を通じて得られた手法は組織工学に新しい方法論を提供し、移植材料としての微細血管組織のみならず体外血管モデルの構築や複層組織の構築など、再生医療に貢献することが期待される。また、本研究によって副次的に明らかになったマイクロ曲面上での細胞の挙動に関する知見は、今後組織工学における培養技術の設計指針を提供すると期待できる。