

課題番号	Q20P-03
課題名（和文）	水溶性二相系（Aqueous Two phase System）を用いた細胞組織の部品化と組み立てによる臓器構築法の基礎技術開発に関する研究
課題名（英文）	Fundamental study of a tissue construction method using aqueous two phase system.
研究代表者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部電子工学系 准教授 氏名 矢口俊之
共同研究者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部電子工学系 教授 氏名 本間章彦
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部電子工学系 教授 氏名 荒船龍彦
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部電子工学系 准教授 氏名 大越康晴
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名

研究成果の概要（和文）

本研究では ATPS 液中で浮遊培養を行うことによって球状の細胞塊を形成し、それをブロックのように組合せ、繊維性 Scaffold で構築した臓器形状の“鋳型”を用いて毛細血管網を含んだ臓器構築のための基板技術開発を目指した。本年度は、浮遊培養を行うためのポンプの流量制御について、実際の細胞を用いる前段階として樹脂製のビーズを用いて浮遊条件に関する基礎検討を行い、理論値との比較を行った。そして本技術をデモンストレーションするためのモックアップの製作をした。

研究成果の概要（英文）

The purpose of this study is to develop a culturing system of droplets of mammalian cell suspensions using an aqueous two-phase system (ATPS) comprised of dextran and polyethylene glycol. Droplets of cell suspension to include different types of mammalian cells are suspended and maintained in a culture medium composed by ATPS in a developed flow chamber system. The usefulness of these capabilities is a generating a small pieces of tissue containing different type of cells. A demonstrative prototype system was developed.

1. 研究開始当初の背景

再生医療は急速に発展しつつあり、社会的にも実用化の期待が高まっている。細胞を組織構築する技術は三次元的にプリントする技術、細胞シートを積層する技術等、数多く報告されているが、一般にイメージする心臓や肺などの大きな臓器の再生構築には決定的な方法は未だ開発されていない。そこで本研究では、複数種類の細胞をそれぞれに適したサイズの部品として構築し、その部品をブロックのように組み立てることにより、これまで以上に大きな質量の細胞組織構築を目指す技術開発を提案する。このコンセプト自体は目新しいものではないが、その基盤技術としてこれまでに我々が提案してきた水性二相系溶液（Aqueous Two Phase System, ATPS）法と細胞足場である高分子繊維性 Scaffold の構築技術を複合的に応用し、実現可能性を検討する。

ATPS 法はどのバイオ系研究室にもあるピペットで簡便に実施できる細胞や細菌の新たなパターンニング法（Yaguchi, Takayama et al., PLOS ONE, 2013 他）であり、培養液等の水性溶媒に、ある特定の組み合わせで溶質（例、ポリエチレングリコール（PEG）とデキストラン（DEX））を溶解させると、水と油が分離するように二つの相（層）に分離した液体が得られる（図 1）。

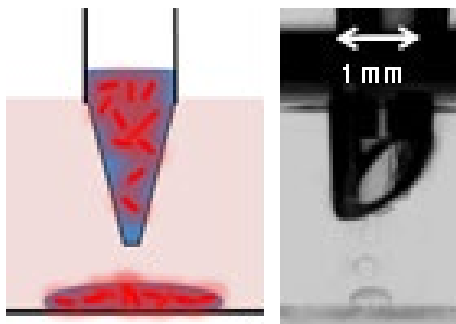


図 1 ピペットによる ATPS パターンニングの模式図（左）と実際（右）

これまででは平面に対する 2 次元パターンニングに用いられてきた ATPS を、その特性を活かした 3 次元浮遊培養へ応用し、細胞凝集塊の作成とその実用化を検討した（特願 2019-191368）。

2. 研究の目的

本発明は、様々な種類の接着性細胞を、より短時間で、大きなサイズにすることを可能とする技術である。以下、課題ごとに説明する。

(1) 高速化：一般的に細胞培養は日単位で時間を要する。類似技術でも数日を要している。一方で本発明では数時間で同程度以上のサイズの細胞凝集塊形成の可能性がある。これにより、創薬分野や再生医療分野での研究サイクルの高速化が期待できる。

(2) 大型化：微小な臓器モデルであるオルガノイドが創薬や再生医療分野で重要な働きをすると期待されている。本発明により、大きなサイズの細胞凝集塊を組み合わせ、大型のオルガノイドの形成が可能となれば、さらに生体の臓器に近い機能を備えたものが形成可能となることが期待される。

(3) 汎用化：本発明の対象とする細胞は、接着性細胞のほとんどに適用可能であると考えられ、従来法以上に広い細胞種での細胞凝集塊と、さらなる長期培養によってオルガノイドの形成が期待できる。

3. 研究の方法

本申請では、高い再現性で、より短時間で、より大きなサイズに広範な細胞種類での細胞凝集塊を自動形成するシステムを試作し、二層培養液の調整条件や細胞懸濁濃度等の最適化を検討し、最終的なシステムの製品化を目指す。また、本発明を展示会などでアピールするためのモックアップを制作し、企業との提携を模索する。

本発明の出願から現在に至るまで、液滴を浮遊させるための循環流量の調節は手動でのポンプ操作で行っており、それによって培養時間は数時間程度が限界となっている。また、装置全体のセットアップも熟練を要する部分が多数あるため、製品化のためには誰もが簡便に扱えるシステム化が必要であり、本申請期間にはそのためのプロトタイプを試作する。また、同時に各種条件、特

に二相培養液を構成する PEG, DEX の分子量や、液滴浮遊部分のチューブ形状なども検討し、再現性向上、時間効率化などを検討し、システムとあわせての製品化を目指す。

また、技術説明の際に、試作機による見える化は説得力があり、非常に有効であるため、展示会などへの可搬性を考慮したモックアップを製作する（下図）。モックアップは、「液体の力で液滴を浮遊させる」という点のみをデモンストレーションすればよいと考えるので、その部分だけ抜粋し、スケールアップしたものとする。

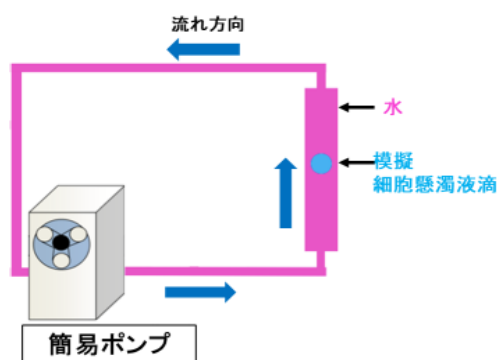


図2 ATPS 浮遊培養の原理

これらによって、企業との連携を早期に実現し、本支援制度の終了後には企業と共同での実用化を検証し、まずは理化学機器としての製品化を目指してゆくことを目指す。

4. 研究成果

流体力学的な理論値計算に基づき、展示用のデモンストレーション機を試作した（図3）。流体回路内を水で満たし、ローラーポンプを中央部分に備え、内径 4mm の浮遊培養パイプに対して反重力方向に流れを与え、パイプ内部に直径 3.18mm



図3 デモンストレーション機

のナイロン球（比重 1.14 g/cm³）を浮遊させた。今後はこのデモ機をベースに改良を施し、パイプ内に浮遊する細胞懸濁液滴を模したナイロン球をデジタルカメラで撮影し、その画像解析によってポンプ流量を自動制御するシステムを開発する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会等発表〕（計3件）

- ① 矢口俊之, 水溶性二相系を用いた接着細胞の浮遊培養による細胞組織生成装置, 第20回日本再生医療学会総会第3回再生医療産学連携テクノオークション, オンライン開催, 2021年3月12日
- ② 矢口俊之, 水性二相系を用いた細胞凝集塊の形成システム, BioJapan2020, パシフィコ横浜, 2020年10月14~16日
- ③ 矢口俊之, 水溶性二相系を用いた細胞組織生成装置, Medtech Japan, 東京ビッグサイト, 2021年4月14~16日

〔図書〕（計1件）

- ① 矢口俊之, 井上聡, 水性二相系培養液を用いた細胞組織構築法, 月刊バイオインダストリー, 37巻7号, PP. 41-49, 2020.