
iPS細胞由来細胞を用いた3次元組織体構築—自動コーティング技術と評価技術

Construction of iPS-Derived 3D Tissues with Automatic Coating and Evaluation Technology

高木 大輔*
Daisuke TAKAGI

瀬尾 学*
Manabu SEO

宮岡 敦史*
Atsushi MIYAOKA

安部 美樹子**
Mikiko ABE

鴨野 俊平***
Shunpei KAMONO

要 旨

iPS細胞技術は再生医療の技術開発を加速させることが期待されている。しかし、人体外での細胞の平面培養では、ヒト組織としての機能が十分に再現できないことが多い。したがって、iPS細胞由来の細胞を用いた3次元組織体の作製は、化粧品 safety 評価、医薬品の毒性試験、再生医療等には非常に重要である。本報告で、細胞表面への接着たんぱく質 (ECM) のコーティングにおいて、iPS細胞由来細胞への物理ダメージを低減できるミクロンサイズのフィルターによる分離手法 (Filter-Layer by Layer) の従来の遠心法 (C-LbL) に対する優位性を、工程の大部分を自動化した自動コーティング装置で検証した。次に、iPS細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) を用いた3次元組織体を構築し、3次元組織体の拍動状態について、画像解析を用いて可視化できることを示した。

ABSTRACT

Induced pluripotent stem (iPS) cell technology is expected to accelerate the development of regenerative medicine. However, it is difficult to evaluate real tissue functions by *ex vivo* monolayer culture. Therefore, the construction of three dimensional (3D) tissue models using iPS cells is crucial for many applications, including the manufacturing of grafts to be used in the medical field, for activity and toxicity testing in the drug discovery and cosmetic fields, and so on. In this study, we have developed a novel method of coating the cell surface with extra cellular matrix (ECM) proteins, named filter layer by layer (F-LbL) coating. A micron-size pore filter is used for separating the cells from the ECM solution, which facilitates tissue construction with lower cell damage than the conventional centrifugation layer by layer method (C-LbL). Then, we have also developed an automatic system of F-LbL for industrialization. Furthermore, to evaluate the beating dynamics of 3D tissues constructed with iPS-derived cardiomyocytes (iPS-CM), we have performed microscopic video imaging analysis by calculating the motion vectors of individual small areas from the correlation of two consecutive images. This method will allow us to understand the relationship between the functionality of 3D iPS-CM tissues and their constituents.

* リコー未来技術研究所 先端技術研究センター
Advanced Technology Research & Development Center, Ricoh Institute of Future Technology

** リコー未来技術研究所 基盤技術研究センター
Core Technology Research & Development Center, Ricoh Institute of Future Technology

*** 画像エンジン開発本部 IIエンジン開発センター
Inkjet Engine Development Center, Imaging Engine Development Division

1. はじめに

1-1 iPS細胞を用いた医療技術開発の意義

2007年の山中教授らによるiPS細胞の樹立により、再生医療の加速化が世界的に期待されている。特にiPS細胞から誘導した様々なヒト細胞を3次元的に組織化し臓器を構築することは、創薬分野の薬剤の効果、毒性判定、化粧品分野の評価試験、医療分野の移植片活用など、多岐にわたるニーズがあり大変重要である。(Fig. 1)

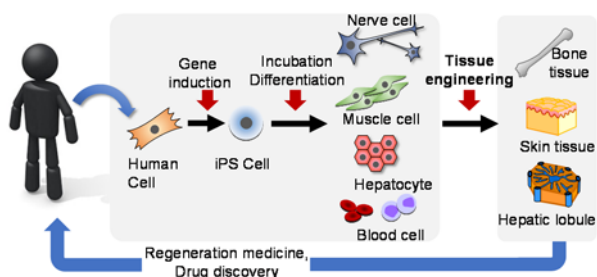


Fig. 1 Schematic of flow of iPS cell and 3D tissue for regenerative medicine and drug test¹⁾.

1-2 3次元組織体の構築技術について

そのため、組織の3次元構築技術に関して、世界中の研究者がしのぎを削っている。例えば、東京女子医大/セルシード社の「細胞シート法²⁾」、佐賀大学/サイフューズ社のスフェロイド積層方式「レジェノバ³⁾」、富山大学の「バイオプリンティング⁴⁾」、米 Organovo 社のゲル押し出し方式「NovoGen Bioprinting⁵⁾」、ハーバード大学の「Organ on a chip⁶⁾」、プリンストン大学の「Bionic Ears⁷⁾」などが挙げられるが、「1細胞レベルでの立体配置制御（高い空間解像度）」と「高い生産率」を併せ持つ産業応用可能な技術には至っていない。

1-3 薄膜コーティング技術 Layer by Layer法 (LbL法)

一方、大阪大学の明石特認教授らは、フィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) を交互に積層した Layer by Layer法 (LbL法) による薄膜を人工の細

胞間物質 (ECM) として、細胞同士の接着を誘起し、複数種類の細胞で構成される3次元組織体の構築を初めて実現した（「細胞積層法⁸⁾」）。また、この手法を改良し、剥離させた細胞の表面にこの人工ECM薄膜を形成して、細胞間接着を3次元的に誘導することで、わずか1日で20層以上の3次元組織構築を達成し、毛細血管・リンパ管構造の構築にも成功している（「細胞集積法⁹⁾」）(Fig. 2)。今回、選定したFNとGはFNのコラーゲン結合ドメインを介した相互作用を駆動力とする特徴がある。

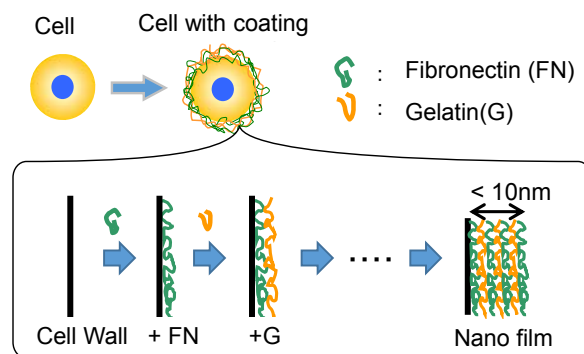


Fig. 2 Schematic illustration of coating process, FN-G nano film was formed on the Cell wall by LbL technique.

しかし、この技術も1細胞レベルでの立体配置制御には至っておらず、立体形成用の鋳型と血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞の自己組織化を用いたものになっている。また、3次元組織体の構築作業には人の手技によるばらつきが存在しており、作業員間差があるため、安定したサンプル作製技術の開発が望まれている。

1-4 薄膜コーティングの必要性

細胞を3次元積層する際に、インクジェットを用いて細胞積層を行う場合、細胞を分散させた液の吐出、着弾時の圧力変化によるダメージが細胞に加わることが懸念される。松澤らは、LbL法による薄膜コーティングが細胞に加わる物理ダメージを低減するのではと考え、検証を行った¹⁰⁾ (Fig. 3)。

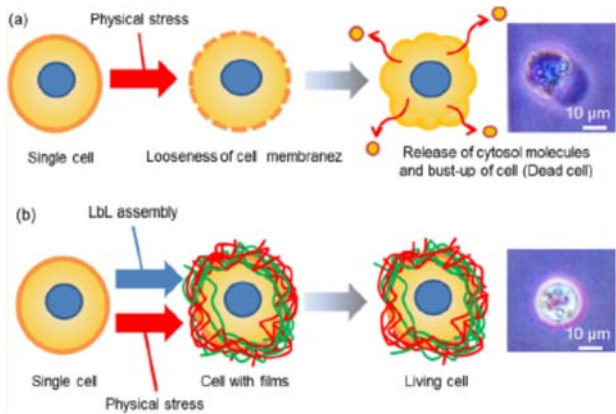


Fig. 3 Schematic illustration of the effect of physical stress on (a) uncoated cells or (b) cells with films by LbL technique.¹⁰⁾

物理ダメージに敏感なHep-G2細胞（ガン化させた肝細胞）に約6から10 nmのFNとGの薄膜コーティングを施した上で、遠心分離機の回転数を変化させ、物理ダメージ量（G）を振って、コーティング処理のないものと、処理後の細胞の生存率を比較した。コーティングの有無で顕著な差異が見られ、コーティング膜による物理ダメージの低減が認められた¹⁰⁾ (Fig. 4)。つまり、インクジェットの吐出による物理ダメージに対しても、軽減の効果が見込まれる。

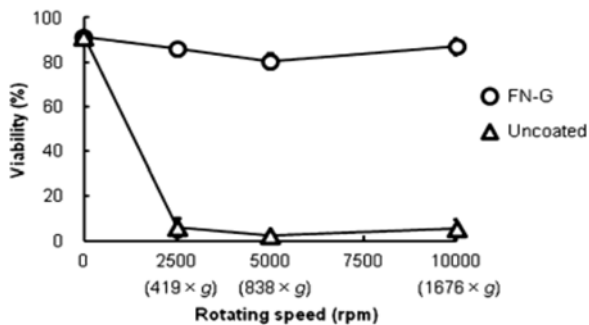


Fig. 4 Effects of FN-G nanofilms on cell viability. The viability of Hep G2 with FN-G nanofilms after nine-step LbL technique and uncoated cells that underwent the same centrifugation regime was measured at different rotational speeds, as described in the Experimental Section (n = 3).¹⁰⁾

1-5 3次元組織作製を目的とした産官学連携プロジェクトについて

本研究テーマは大阪大学を中心とした産官学連携プロジェクト^{11,12)}に採択されており、アカデミア、素材メーカ等と分担して開発を行っている。例えば、iPS細胞から分化した心筋細胞等の供給は大阪大学医学部で、作製した組織片の薬理評価は大阪大学薬学部、医学部等で実施されており、著者らは社内保有技術であるインクジェット技術、インク材料技術、光学技術を応用して細胞を3次元に組み立てる自動化装置と周辺技術の開発を担当している。

本報告では、ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋細胞の3次元積層体を、LbL法を自動化した自動コーティング装置を用いて作製し、手技と同等以上の機能が得られるか検証した。また、作製した3次元積層体の1つとして挙げられる拍動性の検査手法として、組織の拍動を画像解析することで定量化できるかを試みた (Fig. 5)。

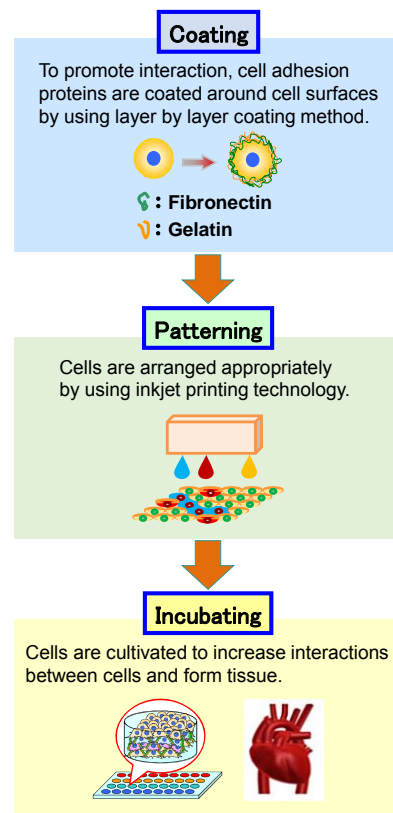


Fig. 5 Process flow of construction of 3D tissue with iPS derived human cells.

2. 実験方法

2-1 自動コーティングの方法検証

細胞に薄膜コーティングを行う際、まず2種類のたんぱく質（FN：和光純薬製，G：和光純薬製）を0.04 mg/mlで溶解させた0.05M Tris-HClバッファ（pH 7.4）に細胞を浸漬し、次いで洗浄液としての0.05M Tris-HClバッファ（pH 7.4）に浸漬する。これらのプロセスで合計18回の浸漬を行う必要があるが、18回もの処理を行うため、細胞への物理ダメージの蓄積が懸念される。そこで、ラット新生仔由来心筋細胞（r CM）を用いて細胞コートを行ったところ、

コーティング後の細胞の収率は50%以下と低く、また、細胞質たんぱく質（乳酸デヒドロゲナーゼ：LDH）の漏出が起これ、細胞膜がダメージを受けていることが示唆された（Fig. 7c）。これはC-LbL法の各ステップで細胞分離のため、遠心分離法を用いるが、遠心（400G）により、細胞への物理ダメージ蓄積が考えられる。そこで、著者らは細胞と液の分離に通常利用される遠心分離ではなく、フィルタリング（F-LbL法）を選定した。本F-LbL法を用いることにより回転速度から計算した物理ストレス（g）が約1/400に低減でき（Fig. 6）、収率は70%に向上し、溶出量も低減できた¹³⁾（Fig. 7 a, c）。

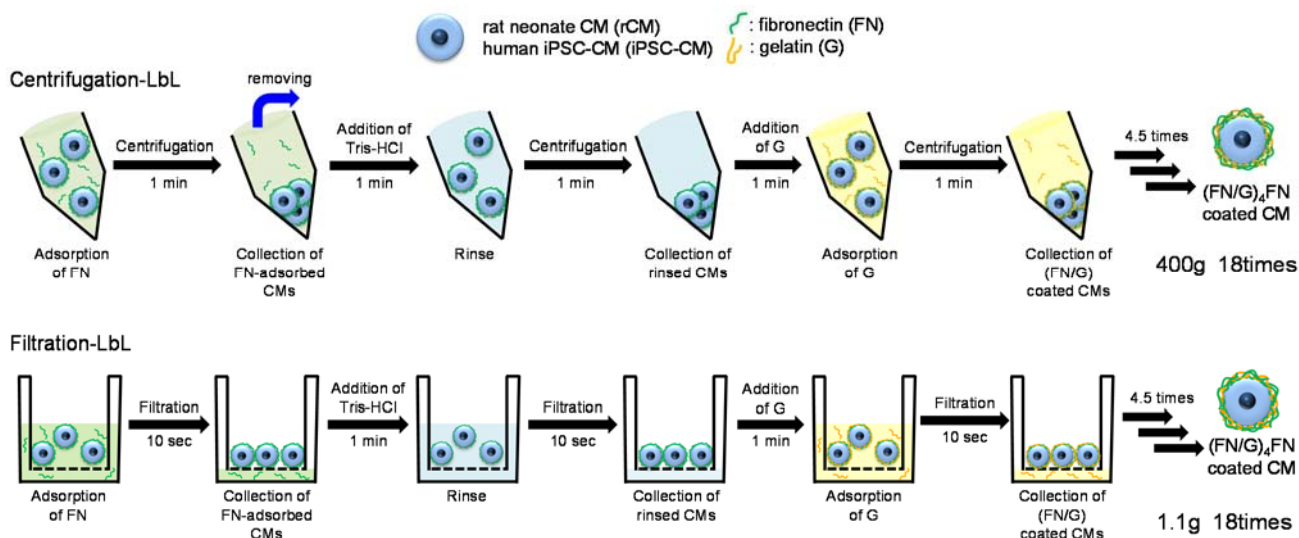


Fig. 6 Schematic flow of C-LbL and F-LbL method.¹³⁾

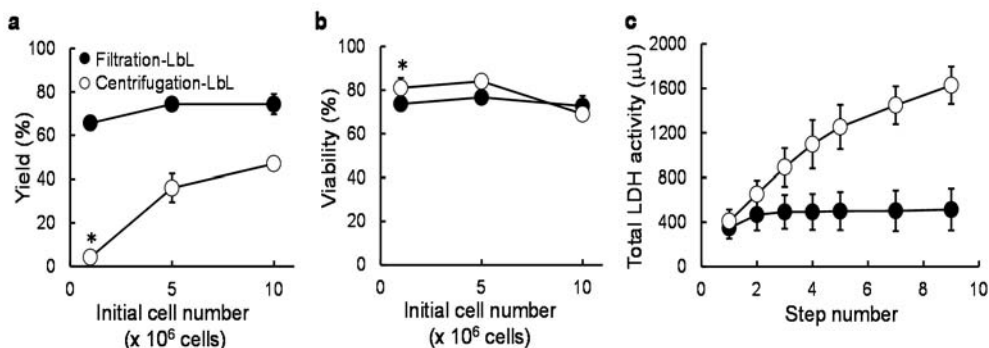


Fig. 7 Comparison between C-LbL and F-LbL method.¹³⁾

2-2 自動コーティング装置の検証

F-LbL法をベースに開発した自動コーティング装置を以下に示す (Fig. 8). 送液, 揺動, 排液を自動化し, 30分ほどで5回のFN溶液, 4回のG溶液, 毎回のTris-HClバッファ洗浄の合計18ステップの浸漬, 液の分離処理を行った.

装置のサイズは安全チャンバ内に設置可能なサイズ, 重量とし, 汚染対策として溶液が触れる部分はディスポーザブルまたはオートクレーブ滅菌にて対応できる材料, 部材を選定した (Table 1).

次に装置性能の検証のため, ヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF) をコーティング処理する際の送液速度, 揺動速度, 廃液速度を調整し, 装置条件の最適化を行った. コーティング処理後の収率, 生存率測定は, エッペンチューブに細胞分散液を10 ul回収し, 0.4%トリパンブルー染色液10 ulを加えてピペッティングを行い, 細胞数計測には, invitrogen社のCountess™ Automated Cell Counterを用いた.

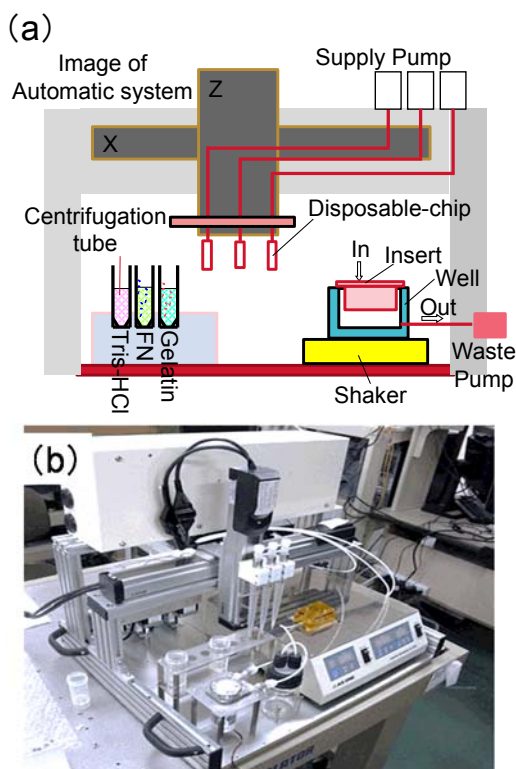


Fig. 8 Automatic coating system with F-LbL method. (a)skeleton drawing, (b) picture of system

Table 1 Specification of automatic coating system.

	Item	Requirement
System	Size	W/D below 550mm
	Weight	below 20kg
	AC power	AC100V
Solution sending	Method	Syringe pump + Pippette chip
	Disposable	Yes
Process Area	Disposable	Autoclave treatment
Circulation Area	Shaking system	Oscillating mechanism
Stage	Xaxis stage stroke	300mm
	X repeat accuracy	±0.02mm
	Zaxis stage stroke	100mm
	Z repeat accuracy	±0.02mm

2-3 コーティング状態の評価方法

実用化するには処理プロセスのばらつきを定量的に評価できるようにすることが望ましい.

細胞にコーティング処理を施す際に, 実際にたんぱく質が細胞の周辺に存在するかを検証したい. そこで, たんぱく質に反応する抗体を利用した蛍光染色をコーティング膜に施した. プロトコルは以下になる.

Alexa488 結合済みFN抗体 (Anti-FN) を用いた免疫染色

- 1.5 mLマイクロチューブに, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) に懸濁したコーティング処理後の細胞 (5.0×10^5 cells, コーティング処理前, Countess 計測) 1 mLを入れた後, 遠心分離 (ミニスピンド5452, ASONE製) を室温, 1 min, 2.5 krpmの条件で行った.
- 遠心分離後, アスピレータにて上澄みを除去して得られた細胞塊に, PBS (-) で5倍に希釈した Anti-FN (抗体濃度 $0.25 \mu\text{g} / 5 \mu\text{L}$, BD Biosciences) 100 uLを加え再懸濁し, 4°C 環境にて1時間インキュベートした.
- 1時間後再び遠心分離を行い, 細胞塊を得た.
- 得られた細胞塊にPBS(-) 500 μL を加え懸濁後, 再び遠心分離を行い, アスピレータにて上澄みを吸引する作業を2回繰返すことで抗体の洗浄を行った.

評価手法としては、共焦点蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems, confocal fluorescence microscope systems, TCS SP8 CW) で観察を行う。共焦点蛍光顕微鏡を用いることで、細胞1個ごとのコーティング状態の可視化が可能になる。観察条件を調整することで焦点面のみで情報が発生している部分を特定、面積割合等をノイズが少ない状態で算出できる。

2-4 3次元組織体の形成方法

以下の手順で3次元組織体を構築した。iPS細胞を分化して得た心筋細胞 (iPS-CM/分化誘導効率は50から60%のものを使用) とヒト正常心臓線維芽細胞 (NHCF: CC-2904, ロンザジャパン) に2種類のたんぱく質 (FN: 和光純薬, G: 和光純薬, 0.04 mg/ml) を溶解させた0.05M Tris-HClバッファ (pH 7.4), さらに洗浄液としての0.05 M Tris-HClバッファ水溶液 (pH 7.4) にて, (FN+G) x 4+FNと9回の洗浄からなる合計18回の浸漬を行うコーティング処理を、手技と自動コーティング装置で施した。次に、2種の細胞の混合比率iPS-CM/NHCFを75/25, 25/75と振って、24ウェルのセルカルチャーインサートに手技にて5層の積層体を作製した。ここで生体内の心筋細胞の全細胞との比率は30から40%と言われており¹⁴⁾, iPS細胞の分化効率を考慮したサンプルと考慮しないサンプルを作製し、比較を行うことを目的とした。心筋細胞同士が接着し、相互作用を起こして組織体全体での拍動が起きるまで、培地 (D-MEM, 和光純薬製5% FBS, 和光純薬製0.1% Antibiotic - Antimycotic Mixed Stock Solution) を毎日交換しながら、4日間インキュベート (37°C, 5%CO₂, 湿度100%) した (Fig. 9)。

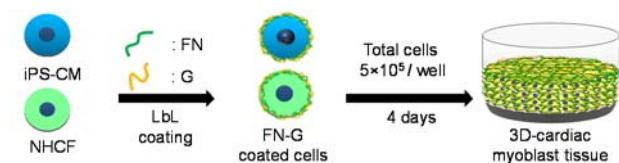


Fig. 9 Construction method of 3D tissue with iPS-CM and NHCF.

2-5 3次元組織体の評価方法

また、作製したiPS細胞由来の心筋細胞を用いた3次元組織体の形状や拍動挙動を定量的に評価することで、3次元組織体の品質を検証する必要がある。自動コーティング装置にて処理をした細胞を用いて完成した3次元組織体について、組織体を固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を施し、断面の顕微鏡観察を行った。さらに、断面観察画像を2値化し、組織体の厚み (nm) と充填率 (%) について定量化を行った。内部構造解析では、3次元組織体の薄膜切片を作製し、それら切片へHE染色を行うことにより細胞の可視化を行った後、画像解析を行うことで内部構造の定量評価を行った。またその際、同一サンプル内の場所によるばらつきも評価できるように、解析領域を任意数にて分割し、組織厚及び細胞充填率 (空間/全体) を算出した (Fig. 10)。

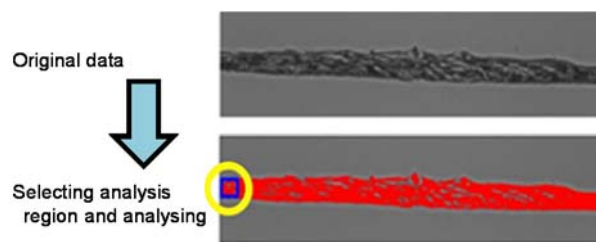


Fig. 10 Calculation method of thickness and filling rate.

次に、画像相関法を用い、心筋の3次元組織体の拍動を解析した。画像相関法は以下の手順で動きをベクトル化する。まず、全画像中のある微小領域 (下記 $m \cdot n$ サイズの領域) が、 Δt 後にどこに移動したのかを算出する。微小領域をある量 ζ , η だけ移動させたとき、 Δt 後の画像 $g(x, y)$ は元の画像 $f(x, y)$ とほぼ同じになり、 $g(x + \zeta, y + \eta)$ と $f(x, y)$ の相関が最大となる。つまり、 ζ と η を変えて相関を取り、その値が最大となると η が変位量に相当する。この処理はフーリエ変換を利用することによって、一括で処理することができる (Fig. 11)。

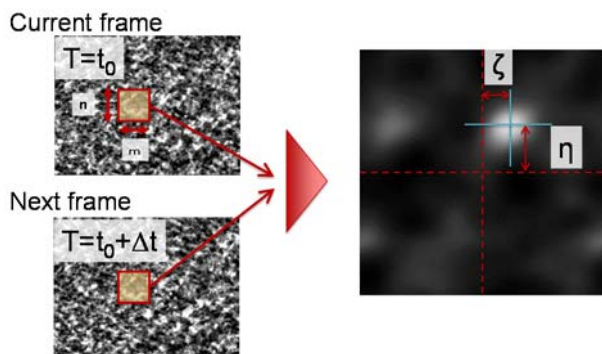


Fig. 11 Calculation method of image correlation.

次に、心筋組織の拍動観察における画像処理の詳細を示す。今回、画像処理にはImageJを利用した。画像を 32×32 pix (約 $20 \mu\text{m}$) に区切り、1つの区画に対して 64×64 pix範囲の相互相関を計算して、そのピーク値から変位量を算出した。

3. 結果と考察

3-1 コーティング法による収率、生存率の検証

Fig. 12に、NHDFを用いたコーティング装置での処理前後での収率を検証した結果を示す。初期の条件では50%前後しか回収できなかったが、装置の処理パラメータを最適化することで、手技によるF-LbL処理と同等の収率を示した。初期細胞量が少ない際に、低い収率を示す傾向があるのは、分離時にフィルター部分に一定数の細胞が捕集されているためと考える。

次に、Table 2にiPS細胞由来の心筋細胞 (iPS-CM) を手技と自動コーティング機を用いて処理した後の細胞の収率、生存率を示す。iPS-CMでも高い収率と生存率を達成した。

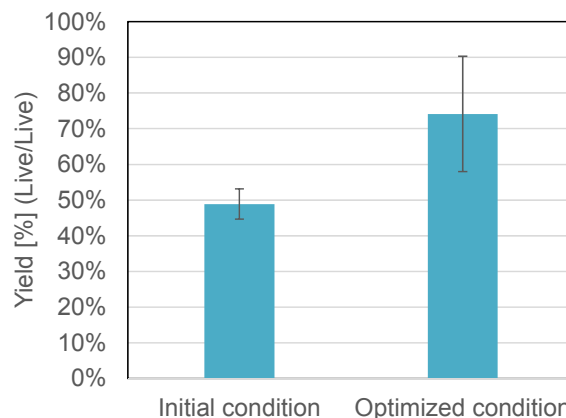


Fig. 12 Yield via Automatic Coating system with initial (n5) and optimized (n7) condition, NHDF, average and 1sigma.

Table 2 Yield, Viability via Manual and Automatic Operation with iPS-CM, 5×10^6 cells in each test (n=2).

iPS-CM	Yield	Viability
Manual	83%	90%
Machine	73%	93%

3-2 コーティング状態の評価

Fig. 13に、手技にてコーティングされた細胞に対してFNに反応する抗体染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて取得した蛍光像を示す。細胞の周囲にFNが存在していることが分かる。

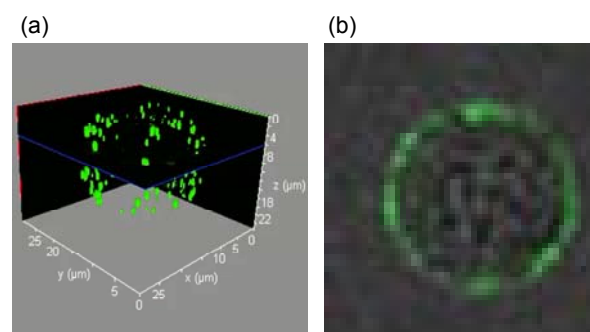


Fig. 13 FN coat image with Confocal microscopy. (a) 3D image, (b) tomographic image.

次に、コーティング量の検証として、以下に示す手法で細胞の周囲に存在するFNの量を定量化した。以下の図 (Fig. 14) は、断面観察像における細胞の断面積全体に対するFN蛍光領域との面積の比率で算出している。コーティング回数とともに、計算値が増加していることが分かり、コーティング量が増加しているといえる。

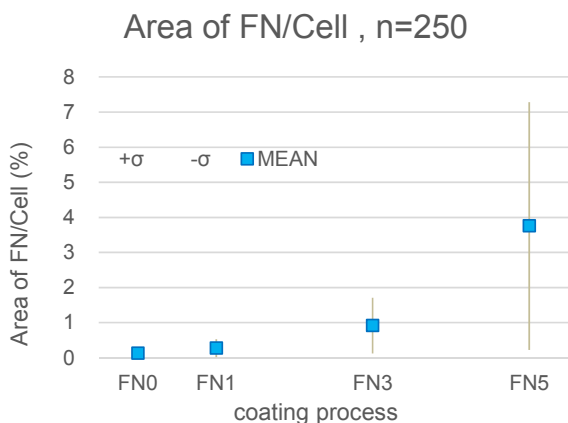


Fig. 14 FN coating measurement with confocal microscopy, (NHDF, FN 0.2 mg/ml in Tris-HCl Buffer) Sampling in each 0, 1, 3 and 5 times of FN coating.

3-3 3次元組織体の断面形状評価

Fig. 15 (a)に、HE染色を施し、断面の顕微鏡観察を行った結果を示す。2種の細胞の比率によって組織体の状態、特にiPS-CM / NHCF = 75 / 25のサンプルには空隙が多く観察できる。

次に、2値化による組織厚み、充填率の算出結果をFig. 15 (b)に示す。充填率において細胞の比率によって大きな差異が見られる。NHCFは心筋が固定されるECMを豊富に産生することが知られており、心筋細胞を強く固定化することができたので、充填率が高くなったと考えられる。

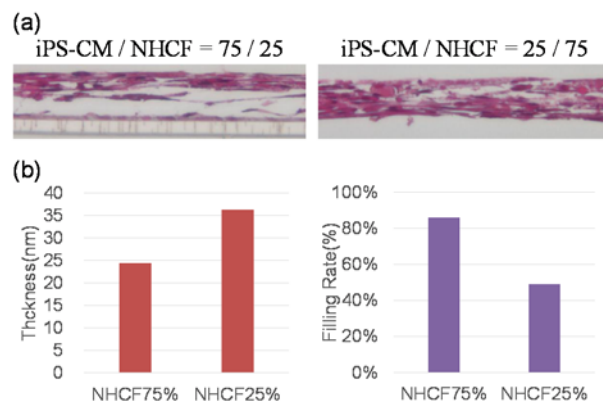


Fig. 15 Construction result of 3D tissue with iPS-CM and NHCF (75/25, 25/75).

(a) Tomographic image, (b) Thickness (nm) and Filling rate (%) via Automatic coating system.

3-4 3次元組織体の拍動状態の評価

Fig. 16に動画のベクトル解析の計算結果を示す。移動量と移動方向をベクトルによって表示し、移動量 (pix単位) をumに変換 (0.654 um/pixel), 時間 Δt (= 0.05s) で割ることで速度を算出した。さらに、拍動の可視化のために、速度を絶対値によって色を変えて表示させることで、分布を把握できるように処理した。移動速度の絶対値では、iPS-CM : NHCF = 75 / 25が70 um/sと10倍ほど高く、組織の広い範囲での伸展と収縮の動きを確認できた (Fig. 17)。このように、心筋組織の動きが可視化でき、心電図のように電極を接触させることなく非侵襲で測定できた。

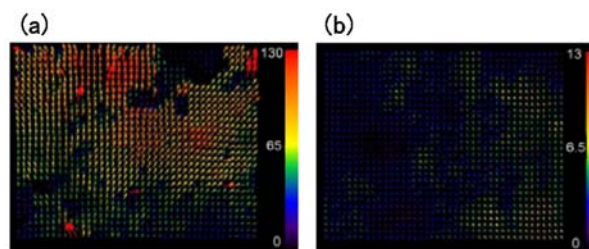


Fig. 16 Image by calculation motion vectors. (a) iPS-CM / NHCF = 75/25, (b) iPS-CM / NHCF = 25/75.

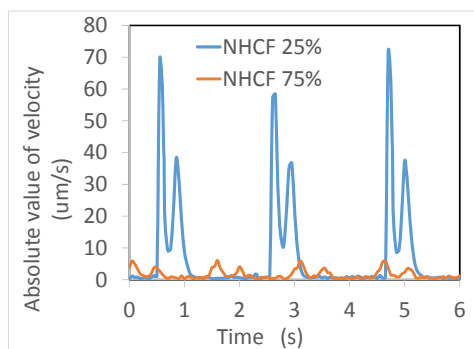


Fig. 17 Calculation, absolute value of velocity with 2conditions, iPS-CM/NHCf=75/25, 25/75.

4. まとめ

iPS-CMを用いた3次元体作製において、細胞へのダメージが低減可能なフィルターLbL法を選定の上、工程の大部分を自動化した自動コーティング装置を作製し、装置条件を最適化することで、高い収率、生存率が得られることを示した。次に、コーティング膜の可視化、定量化の検証を行い、共焦点顕微鏡等にて、条件比較が可能なことを確認した。さらには、作製した3次元組織体の機能検証として、画像相関法を用いた拍動解析を行い、拍動の挙動の可視化が可能なことを示した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、大阪大学 生命機能研究科 明石満特任教授、また大阪大学 工学部 松崎典弥准教授には産官学共同プロジェクトを通じて、多くの指導を頂きました。また、本報告作成にあたり、実験環境、細胞、一部のデータ等の提供を頂いております。この場を借りて、深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) K. Takahashi et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell.*, Vol. 131, No. 5, pp. 861-872 (2007).
- 2) J. Yang et al.: Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 6415-6422 (2005).
- 3) M. Ito et al.: Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae, *PLoS ONE*, DOI:10.1371 / journal.pone.0136681, (2015).
- 4) Y. Nishiyama et al.: Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology, *J. of Biomech. Eng.*, Vol. 131, No. 3, 035001 (2009).
- 5) Organobo: The bioprinting process, <http://www.organovo.com/science/technology/bioprinting-process> (accessed 2015-09-08).
- 6) D. Hur et al.: Reconstituting organ-level lung functions on a chip, *Science*, Vol. 328, No. 5986, pp. 1662-1668 (2010).
- 7) M. S. Mannoer et al.: 3D Printed Bionic Ears, *Nano Lett.*, Vol. 13, No. 2, pp. 2634-2639 (2013).
- 8) M. Matsusaki et al.: Fabrication of cellular multilayers with nanometer-sized extracellular matrix films, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 46, No. 25, pp. 4689-4692 (2007).
- 9) A. Nishiguchi et al.: Rapid Construction of Three-Dimensional Multilayered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-Accumulation Technique, *Adv. Mater.*, Vol. 23, pp. 3506-3510 (2011).
- 10) A. Matsuzawa et al.: Effectiveness of Nanometer-Sized Extracellular Matrix Layer-by-Layer Assembled Films for a Cell Membrane Coating Protecting Cells from Physical Stress, *Langmuir*, Vol. 29, No. 24, pp. 7362-7368 (2013).

- 11) JST産学連携展開部 先端計測室: 「iPS細胞を用いた3次元心筋組織チップ自動作製装置の開発」平成26年度中間評価結果, <http://www.jst.go.jp/sentan/hyouka/h26cyuukan/4-26akashi.html> (accessed 2015-10-20).
- 12) NEDOバイオテクノロジー・医療技術部: 「立体造形による機能的な生体組織製造技術の開発」平成26年度実施方針, <http://www.nedo.go.jp/content/100581726.pdf> (accessed 2015-10-20).
- 13) 松崎典弥ほか: 細胞コート法による毛細血管様ネットワークを有するiPS細胞由来三次元心筋組織の構築と薬剤評価への応用, *バイオマテリアル* Vol. 33, No. 3, pp. 232-235 (2015).
- 14) P. Camelliti et al.: Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts, *Cardiovasc Res.*, Vol. 65, No. 1, pp. 40-51 (2005).