

## 細胞の自己凝集化誘導技術を用いた メッシュ形状細胞凝集塊の作製

藤 魯鵬・中桐 僚子\*・木股 敬裕\*・岩井 良輔\*\*

岡山理科大学工学部生命医療工学科

\*岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 形成再建外科学講座

\*\*岡山理科大学フロンティア理工学研究所

2020年12月15日受理

### 1. はじめに

再生医療においては、血液細胞のような体内を循環する浮遊系の細胞を除いては、移植する細胞を確実に移植部位に留める必要がある。そこで、細胞を懸濁液中の浮遊状態ではなく3次元の凝集塊として移植することで、患部への生着率の向上による確実な組織再生効果と、細胞の拡散による副作用リスクの低減が期待できることから、本邦で認可が進む人工多能性幹細胞(iPS細胞)等の幹細胞を用いた再生医療の前臨床や臨床研究においても、細胞を凝集塊にして移植する方法が積極的に採用されている<sup>1),2)</sup>。

我々が開発した“接着細胞”の自己凝集化技術(Cell self-Aggregation inductionTechnology: CAT)においては、CATを誘導する特殊荷電ポリマー(CATポリマー)を培養表面の任意の領域に塗布することで、CATポリマーの塗布表面にのみ細胞を接着させ、そこに形成した細胞単層の自発的な凝集化が誘導されることで(図1A)、形状制御された球形(スフェア)、輪形(リング)や線形(ファイバー)状の細胞のみからなる立体細胞凝集塊を作製することが容易であり、再生医療のための新規の細胞凝集塊作製法としての開発を進めている<sup>3~5)</sup>(図1B)。ここで、網目(メッシュ)状の細

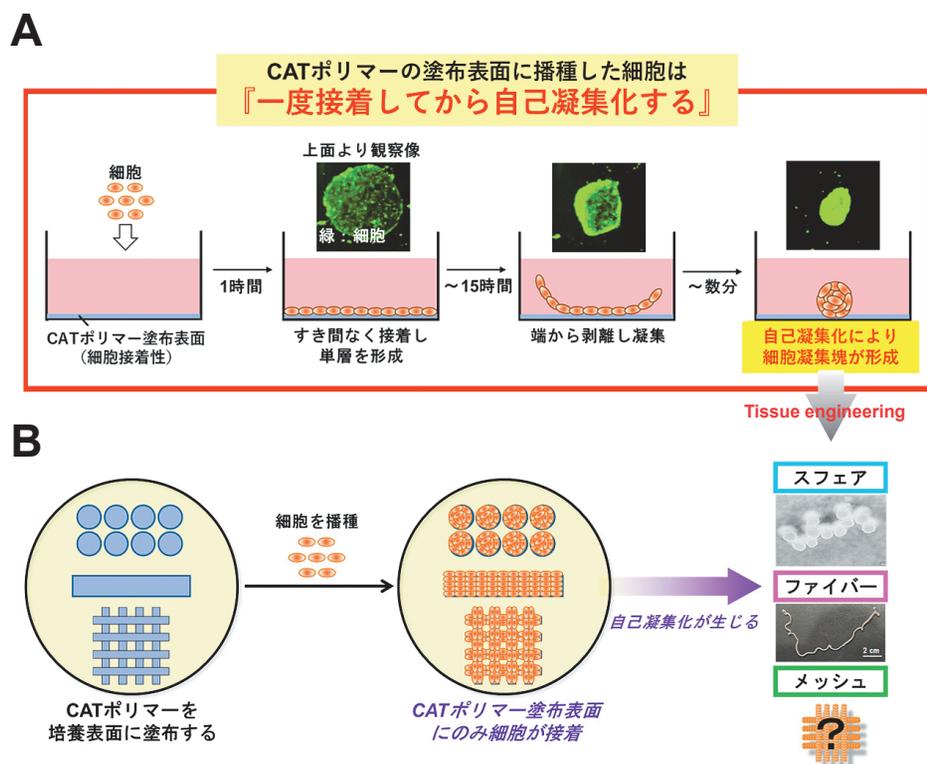


図1 細胞の自己凝集化技術(CAT)の機構(A)と形状化細胞凝集塊作製への応用(B)

胞凝集塊が作製できれば、そのメッシュ構造によって移植後も効率的に酸素と栄養分の供給がされることによって、単一の構造体でありながら大量数の細胞を細胞の壊死を回避しつつ患部に確実に留めることができると考えた。本研究では、CATを用いた細胞凝集塊の作製法を用いてメッシュ状の立体細胞凝集塊を作製することを目的とした。

## 2. 材料と方法

CATポリマーの塗布形状、すなわち、細胞の接着領域の形状を規定するために、培養部屋（チャンバー）として厚さ1 mmのシリコン製のゴム板を格子形状に切り抜き培養皿表面に貼付した。チャンバー内にCATポリマーの水溶液を塗布し5分間静置することでCATポリマーを培養皿表面に吸着させた後、液を吸引してCAT誘導表面とした。細胞としてラット皮下由来の間葉系幹細胞をチャンバー内に播種して2時間培養し、細胞単層の形成を顕微鏡下にて確認した後、チャンバーを培養皿から剥離しDMEM（低グルコース）の基礎培地に10%のウシ胎児血清と1%のペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液を追加してさらに約1日培養を行った（図2）。

## 3. 結果と考察

### 3-1 基礎的検討/CATの塗布形状設計

CATを用いた細胞凝集塊の作製法においては、CAT

ポリマーの塗布表面上へ播種した細胞が形成する細胞単層の外縁部から生じる剥離と凝集化によって形状制御された細胞凝集塊が形成する（図1A）。ここで、メッシュ状の細胞凝集塊を得るためには複数本の線が直行した格子形のCAT誘導表面を作製する必要がある、その線の幅はメッシュを成す線状凝集塊の太さに影響を及ぼすと予想されるため、線の幅が異なる溝が縦横2本ずつ直行した単格子形状のチャンバー（図3A）を作製し細胞を播種して培養した。

細胞は播種して2時間以内には線幅に関わらず隙間のない細胞単層を溝内のCAT誘導表面上に形成したので、チャンバーを剥離してさらに数時間培養を続けた。その結果、細胞単層はCAT誘導表面の線幅が4 mm以下では剥離すると同時に格子形状を保ちつつ凝集化を生じて格子状の凝集塊を形成したが（図3B, 赤枠写真）、8 mm以上では剥離が凝集化より早く進み、大部分が細胞単層の状態で剥離して培養液中に浮遊した状態で凝集化が徐々に生じることで、不均一で無秩序な凝集塊となった（図3B, 青枠写真）。すなわち、CATを用いて格子形状の細胞凝集塊を作製するには、線状のCAT誘導表面の幅を少なくとも4 mm以下に設計する必要があることが分かった。

### 3-2 多格子メッシュ状細胞凝集塊の作製

3-1にて、チャンバーの格子を成す線幅を4 mm以下に設計することで格子形状の細胞凝集塊が得られ

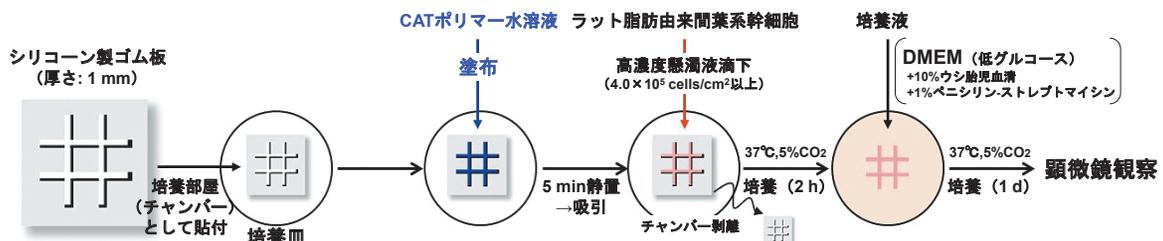


図2 実験方法の概要

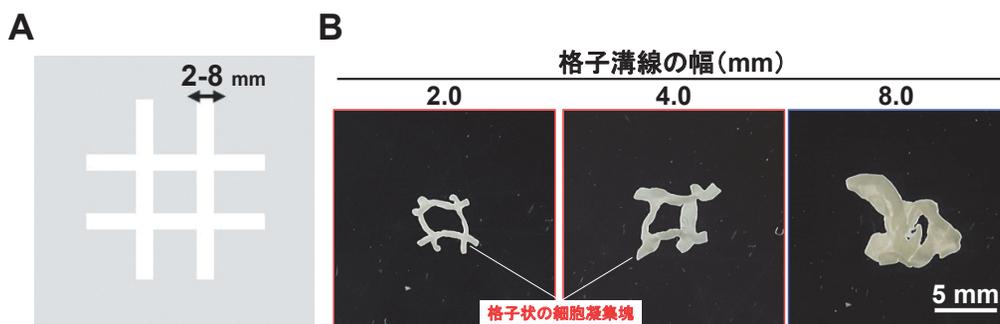


図3 幅の異なる溝線を有する格子状の培養チャンバー設計 (A) とチャンバー内に形成した細胞単層の一体凝集化により生じた細胞凝集塊の形態 (B)

赤枠写真：格子状細胞凝集塊，青枠写真：無秩序な形状の細胞凝集塊

ることが分かったので、線幅が2 mmの溝が縦横4本ずつ直行した9格子構造を有するメッシュ状のチャンバーを作製し細胞を播種して培養した。その結果、細胞はCAT誘導表面に沿ったメッシュ状の細胞単層形成した後(図4A)、約1日の培養の間に3-1と同様に細胞単層の剥離と凝集化を生じてCAT誘導表面の寸法の約40%の大きさに縮小化した3次元化した9格子構造を有するメッシュ状の細胞凝集塊を成し培養液中に浮遊した(図4B)。このメッシュ状の細胞凝集塊は、スパチュラを用いて培養液中からその構造を崩すことなく容易にすくい上げることができ、移植物として十分な操作性を有していた。

### 3-3 メッシュ状細胞凝集塊の生着評価 (*in vitro*評価)

メッシュ状細胞凝集塊の静的な環境下での生体組織への生着性を調べるために、培養による*in vitro*評価を行った。Wister系ラットの皮下に正方形のシリコン製のゴム板(2 cm×2 cm、厚さ1 mm)を4週間埋植することで、ゴム板を被覆化した真皮組織を生体真皮由来組織とし、これに赤色蛍光色素を用いて細胞を標識した9格子構造を有するメッシュ状細胞凝集塊を貼付して約1週間培養した。

生体真皮由来組織に貼付したメッシュ状の細胞凝集塊は、貼付から約30分で培養液をその直上から添加しても剥離することなく組織表面に維持されていたことから、接着していると判断した。さらに7日間培養を

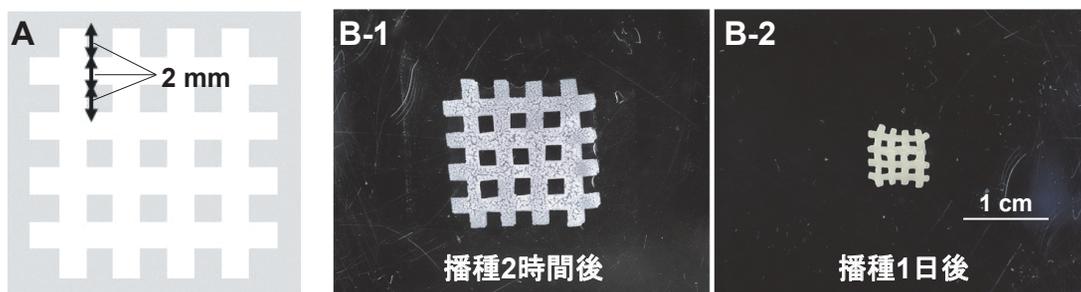


図4 9格子を有するメッシュ状の培養チャンバーの設計(A)と播種2時間後にチャンバー内に形成した細胞単層(B-1)および約1日後に形成したメッシュ状細胞凝集塊(B-2)

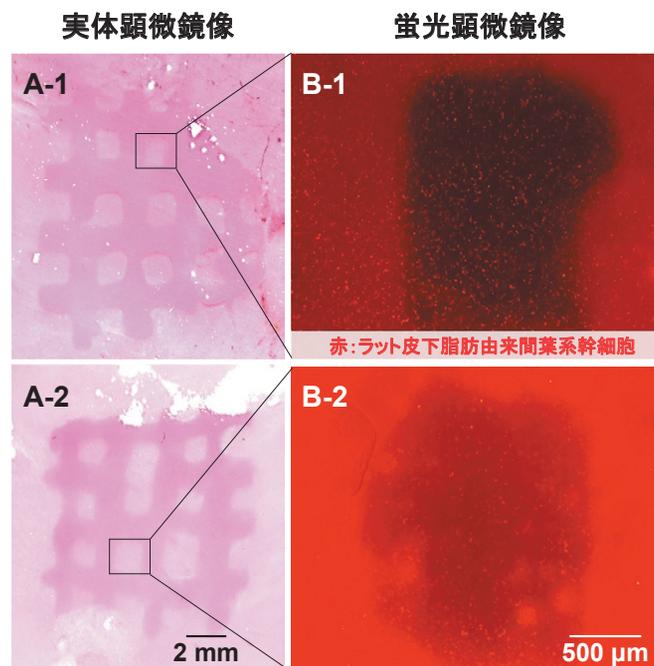


図5 生体真皮由来組織体に貼付した9格子構造を有するメッシュ状細胞凝集塊の培養1日後(A-1, B-1)と7日後の(A-2, B-2)の実体顕微鏡(A-1, A-2)、および蛍光顕微鏡(B-1, B-2)による観察像

続けてもメッシュ状凝集塊の形状は肉眼的にほとんど変形することなく維持されていた (図5A-1, A-2).  
そこで, 蛍光顕微鏡観察を行い細胞レベルでの組織表面の変化を調べた結果, 培養1日後にはメッシュ状細胞凝集塊の格子部分, すなわち生体由来真皮組織の表面が露出した部位に赤色蛍光を発する凝集塊由来の細胞の点在が認められ (図5B-1), 7日後には, それらの細胞は格子内の組織表面を完全に被覆化していることが分かった (図5B-2).

#### 4. まとめと展望

CATを用いた我々独自の細胞凝集塊の作製法において, CATポリマーの塗布領域を最適化することで, 培養皿に細胞を播種するだけで多格子構造を有するメッシュ状の細胞凝集塊を得ることができた. メッシュ状細胞凝集塊は, 生体の真皮由来組織に迅速に接着する

とともに, 細胞の浸出によってその表面を被覆化し得ることを確認した. 本メッシュ状凝集塊は, 培養皿ベースで簡便に作製でき, かつ高い組織生着性を有することから再生医療における新たな細胞の移植形態となり得ると期待される. 実験動物モデルへの移植実験にて有用性を検証していく予定である.

#### 参考文献

- 1) Kikuchi T et al., Nature. 548, 592-596 (2017).
- 2) 朝日新聞デジタル「iPS細胞で心臓再生, 慶応大が計画承認」: <https://www.asahi.com/articles/ASN263SJ8N25ULBJ011.html> (2020年2月6日).
- 3) Iwai R, Nemoto Y and Nakayama Y., Biomaterials., 34(36), 9096-102 (2013).
- 4) Iwai R, Nemoto Y and Nakayama Y., J Biomed Mater Res A., 104(1), 305-12 (2016).
- 5) Iwai R, Haruki R, Nemoto Y and Nakayama Y., J Biomed Mater Res B Appl Biomater., 105(5), 1009-1015 (2017).

## Preparation of mesh-shaped cell aggregated constructs using cell self-aggregation induction technology

Lupeng TENG, Ryoko NAKAGIRI\*, Yoshihiro KIMATA\*, Ryosuke IWAI\*\*

*Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Okayama University of Science,  
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama-shi, Okayama 700-0005, Japan*

*\* Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Faculty of Medicine, Okayama University,  
2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama-shi, Okayama 700-08558, Japan*

*\*\*Institute of Frontier Science and Technology, Okayama University of Science,  
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama-shi, Okayama 700-0005, Japan*

In cell-based regenerative therapy, transplanted cells fabricated as a form of three-dimensional cell aggregates can be expected to not only enhance the tissue regeneration following the improvement of cells engraftment rate in the affected tissue area but also reduce the risk of side effects induced by cell diffusion. We have developed cell self-aggregation technique (CAT) for the preparation of three-dimensional cell aggregates, and can successfully prepare spheres, rings and fiber-shaped cell aggregates simply by seeding cells in CAT induction polymer (CAT polymer) coated culture dishes. In this study, we could prepare novel mesh-shaped cell aggregates (CELL MESH) with a multi-lattice structure by designing the surface coating shapes of CAT polymer on culture dishes. The CELL MESH was handled easily and could be transplanted on the surface of dermis-derived living tissues as a patching manner simply using a spatula. *In vitro* evaluation showed that CELL MESH could adhere biologically to dermis-derived living tissues within 30 minutes after patching and the cells exuded from CELL MESH were covered on their lattice area exposing dermis-derived living tissue within one week culturing. The CELL MESH having a large number of transplanted cells as a single construct should be surely retained in the affected tissue area, which expected to be a promising cell transplants for regenerative therapy.

**Keywords:** tissue engineering; cell aggregates; regenerative medicine; cell self-aggregation