

## 細胞シートマニピュレーション技術



笹川 忠

東京女子医科大学 先端生命医学研究所

細胞シートの移動または積層操作の際には、キチン膜や親水化 PVDF (ポリフッ化ビニリデン) 膜などが細胞シート回収用支持体として用いられてきた。しかしながら、このタイプの支持体では1回の行程において細胞シート1枚の移行となるため、細胞シートを積層化し、厚みのある三次元的な組織を再構築する場合には、必ずしも効率が高いとは言えない。また、将来的に細胞シート積層工程の自動化を実現するためにも、新たな細胞シート積層化システムとそれを支援するデバイスの技術開発は必須である。そこで本研究では、細胞シートの積層化を支援する新規ツールとして、スタンプ型デバイスと細胞シート回収用支持体であるハイドロゲルから構成された「細胞シート積層用マニピュレータ」を開発した。その結果、安定かつ簡便に細胞シートを積層させるシステムを構築することができた。

温度応答性高分子であるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを固定化した表面では、低温処理を施すだけでコンフルエント状態にある培養細胞を非侵襲的に1枚のシート状で回収することが可能である。特に注目すべき点は、回収された細胞シートが培養中に産生した細胞外マトリックス成分を保持した状態にあるため、容易に他の表面に接着させることができることにある。そこで、我々はこの特性を利用して細胞シートを別の表面上へ移行・再接着させる技術を「細胞シートの二次元マニピュレーション」、さらに細胞シート同士を積層化し三次元的な組織様構造体を再構築する技術を「細胞シートの三次元マニピュレーション」と称し、これらの基盤技術を用いて再生医療に関する応用研究を展開してい

る。これまで細胞シートを別の表面に移行させる場合には、主に細胞シート回収用支持体としてキチン膜や親水化 PVDF (ポリフッ化ビニリデン) 膜などが用いられてきた。操作手順としては、Figure 1-A に示すように、物理的吸着により細胞シートを支持膜側に転写させた後、別の基材表面、もしくは培養細胞や生体組織へ再接着させるというものである。この手法の利点は、細胞シートを支持膜に転写した状態で操作するため、移行前の形状を維持したままで再接着または移植が可能であることと、さらに特別な道具を必要とせず支持膜とピンセットだけで容易に行えることにある。しかしながら、このシステムでは1回の行程において細胞シート1枚だけの移行となるため、細胞シートを積層化し、厚みのあ

る三次元的な組織を再構築する場合には必ずしも効率が高いとは言えない。従って、将来的に細胞シート積層工程の自動化を実現するためにも、新たな細胞シート積層化システムとそれを支援するデバイスの技術開発は必須となる。そこで、今回我々は細胞シートの積層化を支援するツールとして「細胞シート積層用マニピュレータ」を開発し、作業者の手技的要因に左右されない安定した細胞シートの三次元マニピュレーションシステムの構築を試みた。作製したマニピュレータは、スタンプ形状を呈したデバイスと細胞シートを回収する際に支持体となるハイドロゲルから構成されており、支持体の素材にはフィブリンゲルやコラーゲンゲル、ゼラチンゲルといった生分解能を有するものを採用した (Figure 1-B)。

フィブリンゲルおよびコラーゲンゲルを用いた細胞シートの三次元マニピュレーションに関する操作手順は以下の通りである。マニピュレータを温度応答性培養皿上に静置させ、低温処理 (20°C) を施し、基材からの細胞シートの脱着と支持体への接着を同時に行うことで1枚目の細胞シートを回収する。2枚目以降は、37°Cでのインキュベーションによる「細胞シート間の結合を促す過程」とそれに続く20°Cでの「基材からの脱着過程」を経ることで回収を行なう。この工程を繰り返すことにより、細胞シートを連続的に同一支持体上へ積層させることが可能となった (Figure 1-C)。これまでに、心筋細胞、筋芽細胞、線維芽細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞など種々の細胞シートにおいて、

同種または異種同士の積層化を実現している。特に心筋細胞シートを積層化した場合、肉眼でもその拍動が確認できる程である。さらに、作製された三次元的な組織様構造体は、積層化細胞シートと支持体とが一体化した再生組織となるため、一定期間培養した後に生体へ移植する実験やバイオリアクターを用いて圧力、ずり応力、伸展などの物理的刺激を与える実験にも応用が可能となった。

一方、再生組織からの支持体除去に関しては、フィブリンやコラーゲンに対する特異的なタンパク質分解酵素で処理することにより可能ではあるが、高濃度での使用かつ長時間の反応を要するため、細胞に対するダメージが懸念される。そこで、細胞シートとの分離を可能とする支持体素材について検討を進めた結果、ゼラチンゲルが有効であることを見出した。ゼラチン溶液は冷却するとゲル化し、そのゲルは通常細胞培養に用いられる温度では融解する。この性質を利用することで、移行後に細胞シートから支持体を除去させることに成功した。

まず、ヒト由来筋芽細胞シートに対する二次元マニピュレーションの例を示す。細胞シート回収・移行操作時における細胞傷害性の有無に関しては、**Live/Dead assay** 試薬を用いて評価した。また、この実験では移行操作前後における細胞シートの形態変化を比較し易くするため、筋芽細胞シートの作製には細胞接着領域が正方形にパターン化された温度応答性培養皿を用いた。なお、細胞シート回収時の条件はフィブリンゲルの場合と同様である。その結果、移行操作ならびにゼラチン

ゲルの除去操作に伴う細胞傷害性はほとんど認められず、移行後における筋芽細胞シートの形状は回収前とほとんど変わらないことが示された (Figure 2-A)。

次に、筋芽細胞シートに対する三次元マニピュレーションの例を示す。筋芽細胞シートを赤色および緑色に蛍光ラベルし、交互に5枚積層化を行なった。なお、この積層行程では37°Cで行なう「細胞シート間の接着を促す過程」は省略しており、「細胞シート間の結合過程」と「基材からの脱着過程」を20°Cで同時に行なう点はフィブリングルを用いた積層操作と相違する。次に、別の基材表面上に移行させ、ゼラチンゲルを除去した後、凍結切片を作製することで積層化状態を評価した。その結果、移行後においても5層構造が維持されていることが示された (Figure 2-B)。よって、ゼラチンゲルを用いた場合でもフィブリングルと同様に細胞シートを連続的に積層することが可能であった。

最後に、これらの特性を踏まえたゼラチンゲルによる新しい積層化細胞シート移植法の可能性を示す。移植操作としては、予めDNA結合色素であるヘキスト 33342 で細胞核をラベルした筋芽細胞シートを5枚積層した後、ゼラチンゲルごと細胞シート面がヌードラット背部皮下組織に接するように貼付した (Figure 2-C-1)。続いて10分後に温生理食塩水でゼラチンゲルを溶かしながら除去・洗浄を行った (Figure 2-C-2)。その結果、皮下組織上に積層化筋芽細胞シートを認めることができ (Figure 2-C-3)、さらに移植7日後においても生着が見られた (Figure 2

-C-4, -5, -6)。また、ゼラチンゲルだけを貼付・除去した偽手術群では、炎症反応は認められなかった (Figure 2-C-7)。このように、ゼラチンゲルを用いることで細胞シートを積層化した上で、別の表面に移行させることが可能となった。

以上のことから、温度応答性培養基材と細胞シート積層用マニピレータを併用することで安定かつ簡便に細胞シートの積層化が可能となり、生体外で組織・臓器を再構築するための要素技術の一つを確立することができた。現在、この技術を基に細胞シート自動積層化装置の開発プロジェクトも進められており、将来的に様々な組織・臓器の再生医療に大きく貢献するものと期待される。

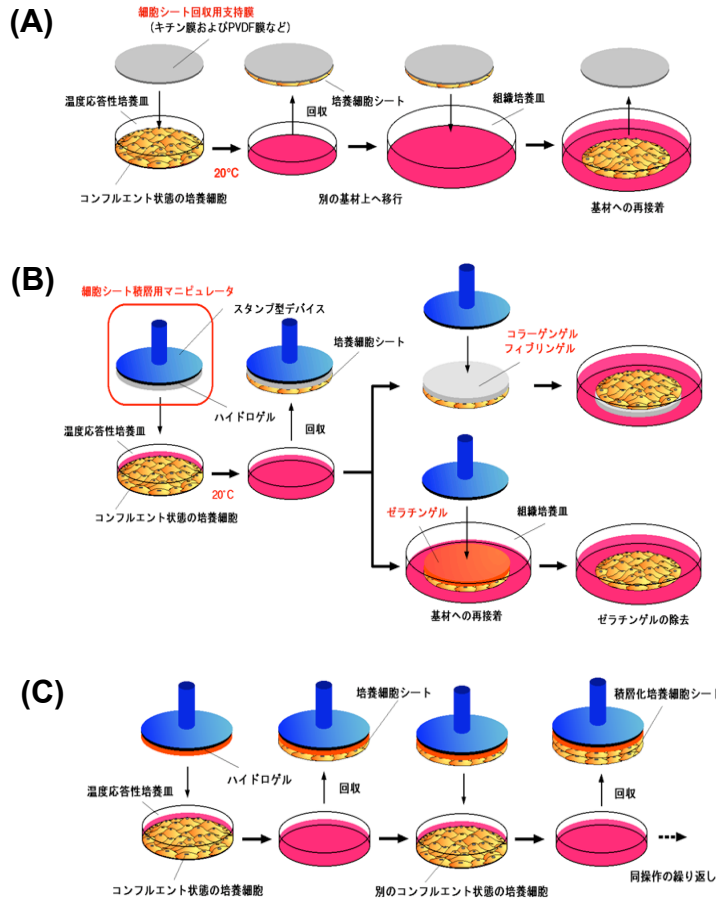


Figure 1 細胞シートマニピュレーション技術の模式図  
 支持膜を用いた細胞シートの二次元マニピュレーション (A) , 細胞シート積層用マニピュレータを用いた細胞シートの二次元 (B) および三次元 (C) マニピュレーション

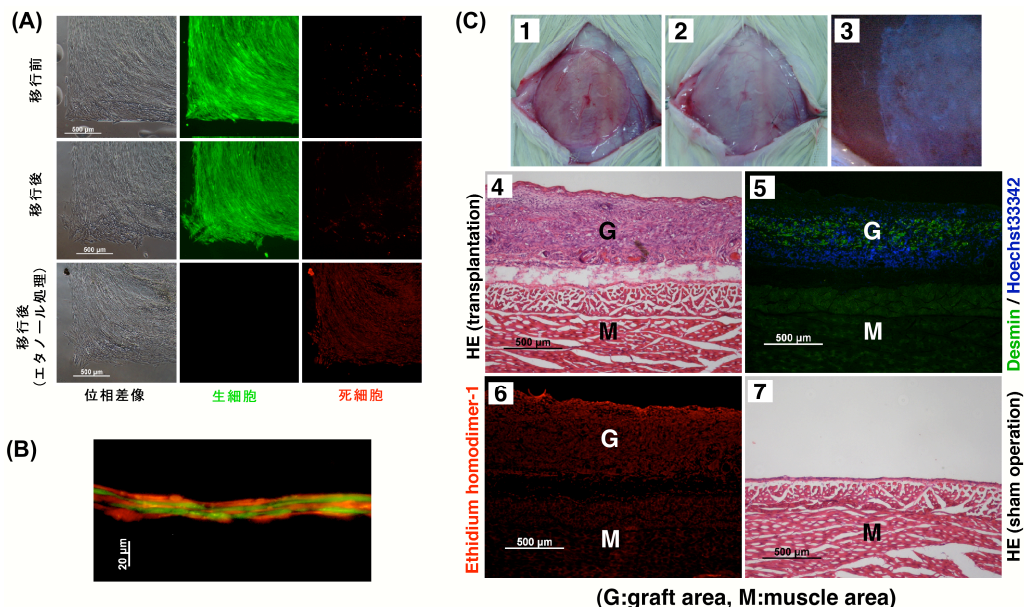


Figure 2 細胞シート回収用支持体としてのゼラチンゲルの有効性  
 A : 筋芽細胞シートの二次元マニピュレーションの評価, B : 5枚積層した筋芽細胞シートを別表面へ移行 (断面像)  
 C : 積層化細胞シート移植法への応用  
 (1)筋芽細胞シートを5枚積層後に皮下組織上へ貼付(2)静置10分後に温生理食塩水でゼラチンを除去 (3)ヘキスト33342による移植した積層化筋芽細胞シートの可視化 (4)移植7日後における皮下組織のHE染色像 (5)デスミンの免疫染色による移植筋芽細胞の可視化(6)エチジウムホモダイマー1による全細胞核の可視化(7)偽手術7日後における皮下組織のHE染色像