

簡単に細胞ブロックを作製可能な三次元 細胞培養方法および培養治具

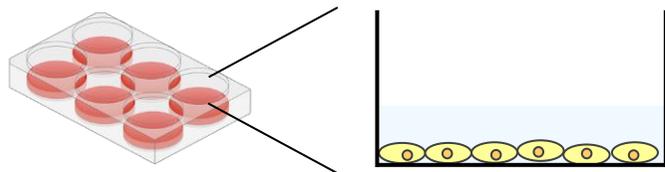
京都大学 医学研究科 人間健康科学系専攻
助教 伊藤 明良

2022年6月28日

従来技術とその問題点①

— 培養細胞を用いた研究 —

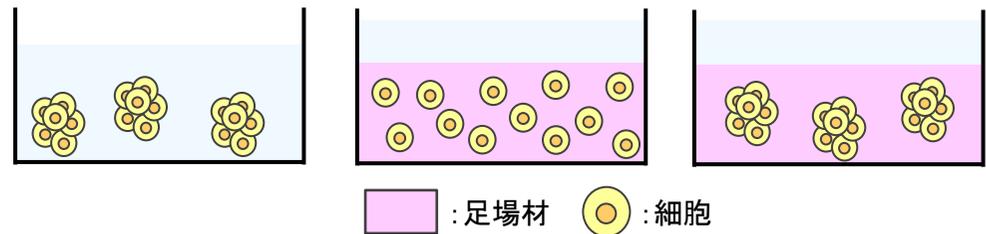
2次元培養



課題

- 生体組織内での細胞代謝などが反映されていない

3次元培養



再生医療分野では

課題

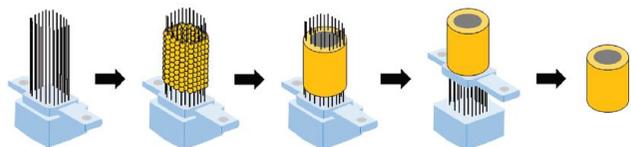
- 生体内へ移植する際の炎症反応や感染リスク（異物である足場材の混入）
- 限定的な治療効果

足場材フリーの3次元培養手法・機器の開発が進められている

従来技術とその問題点②

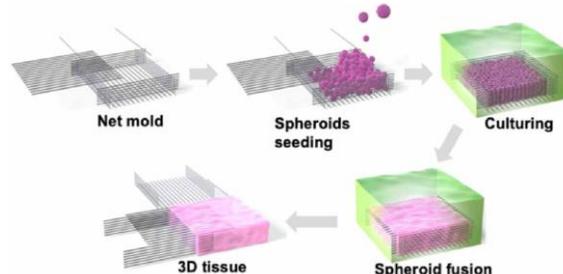
— 従来の足場材フリー3次元培養法 —

剣山法



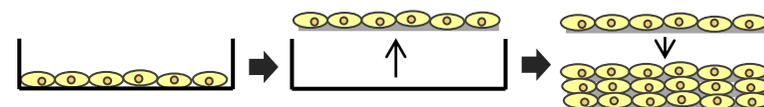
Murata D, et al. Adv Healthc Mater. 2020

ネットモールド法



Sakaguchi K, et al. Biofabrication. 2021

温度応答性培養皿による細胞シートの積層化



Takahashi H, et al. Adv Drug Deliv Rev. 2019

課題

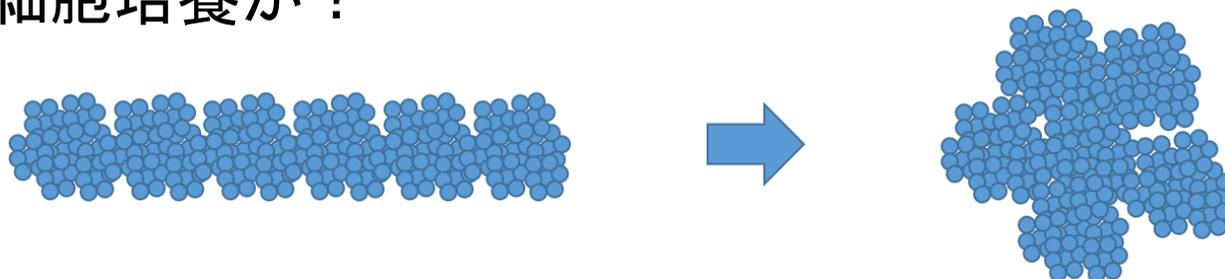
- 特殊な装置を用いず簡便に、任意の形状を保持したまま、足場材フリーで三次元培養する手法はない

解決することで

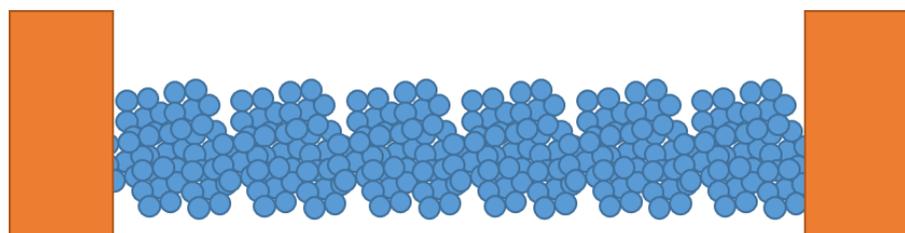
- 三次元培養法の簡便化・低コスト化による基礎研究の加速
- 様々な組織に対する生体移植片開発の基盤

新技術の特徴・着眼点

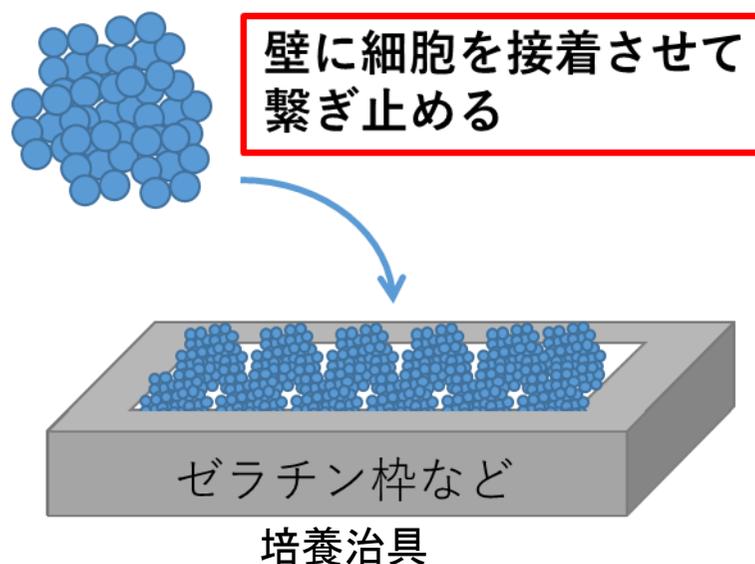
どのようにすれば、特殊な装置を用いず、任意の形状を保持したまま、足場材フリーで三次元細胞培養か？



スフェロイドをただ並べても、大きい団子ができるだけ



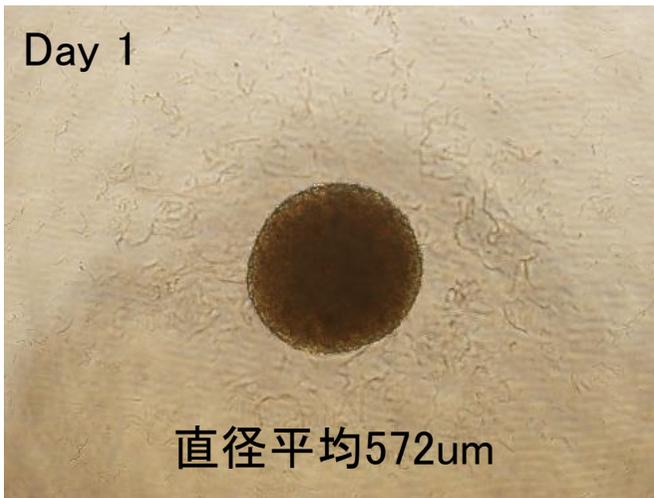
何かで繋ぎ止めておけば良いのでは？



ブタ軟骨細胞三次元シートの作製

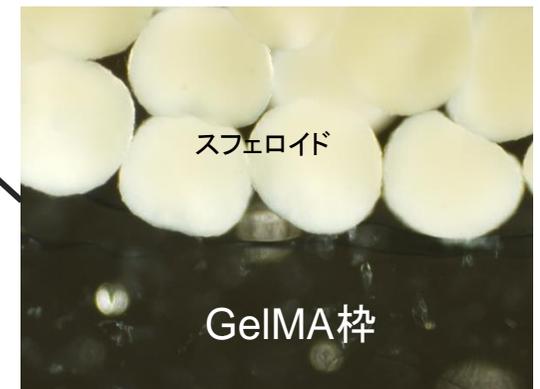
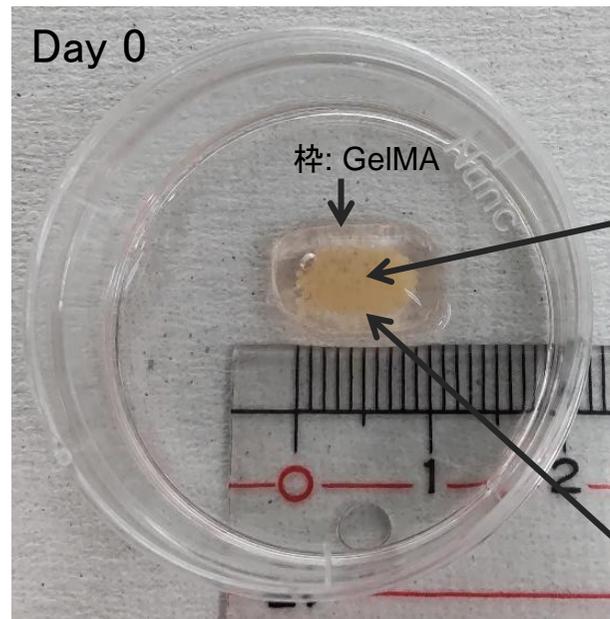
スフェロイドの作成

- 非接着性の96 wellプレート使用
- ブタ軟骨細胞 (1×10^4 /スフェロイド)



シートの作成

- 3Dプリンターでゼラチン(GelMA)枠を作製 (8 × 4 mm)
- 192スフェロイド使用



ブタ軟骨細胞三次元シートを作製

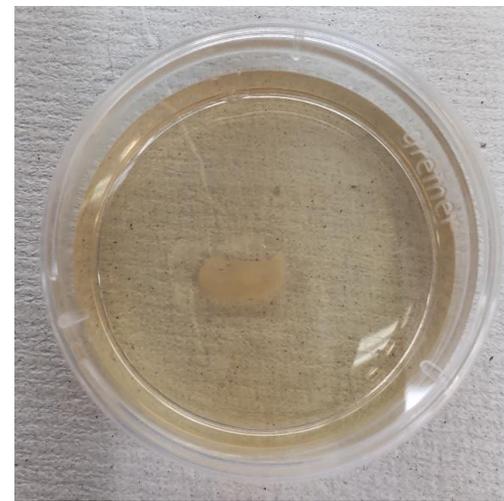
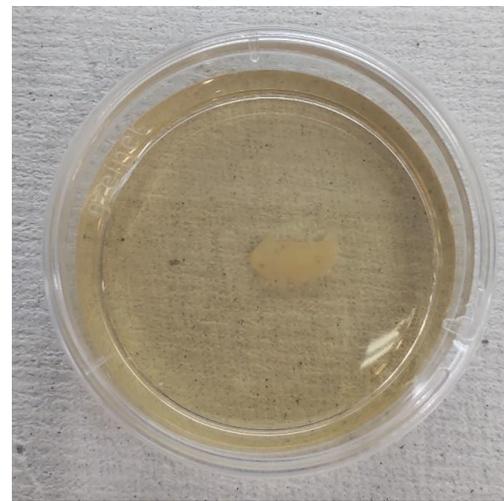
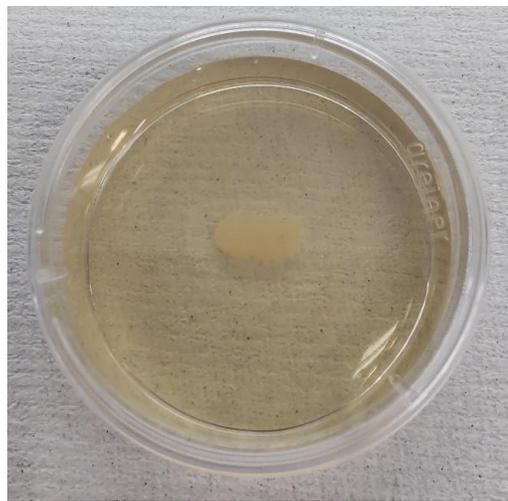
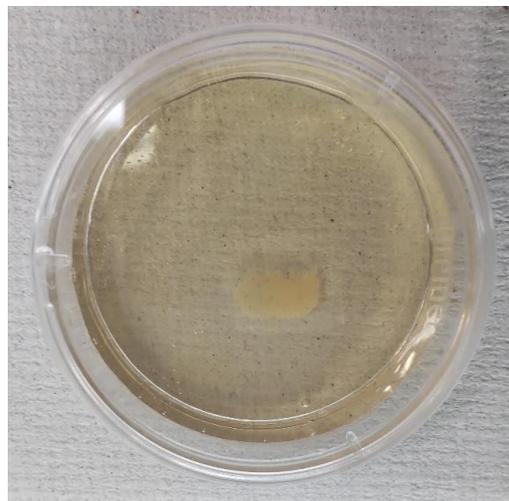
培養1日後

培養3日後

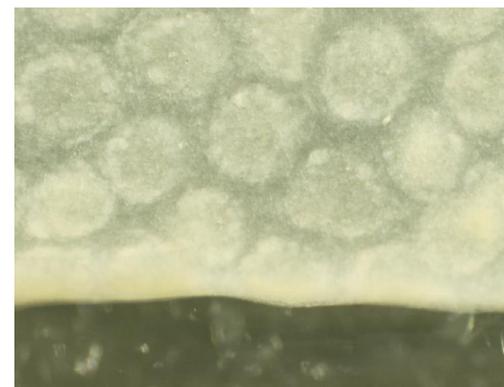
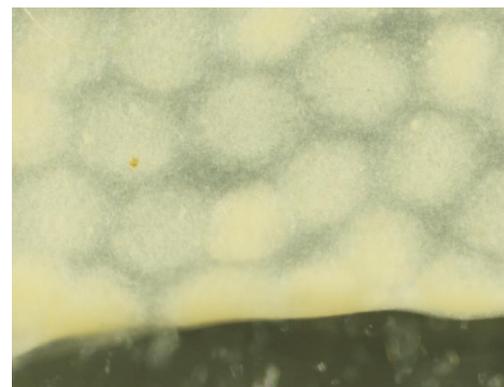
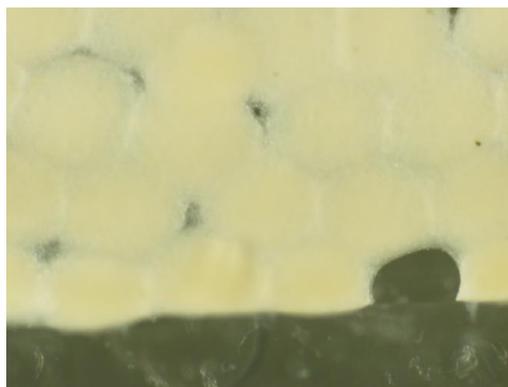
培養7日後

培養14日後

マクロ写真

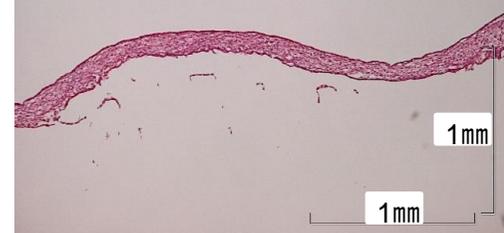


顕微鏡像



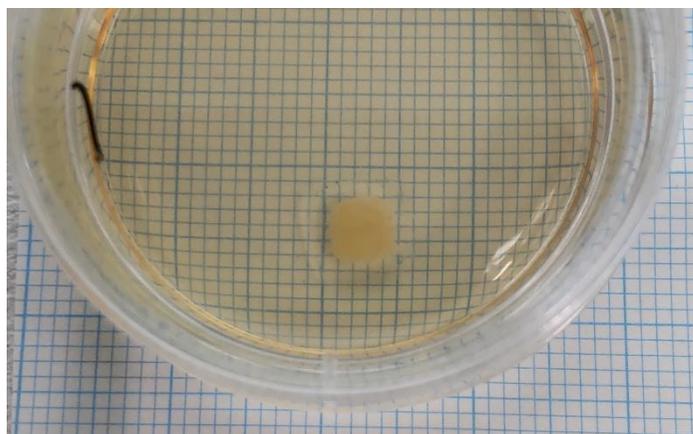
細胞の壁面への接着および自己凝集力によって壁面の形状に沿った細胞構造物を作成することができる。

H・E染色



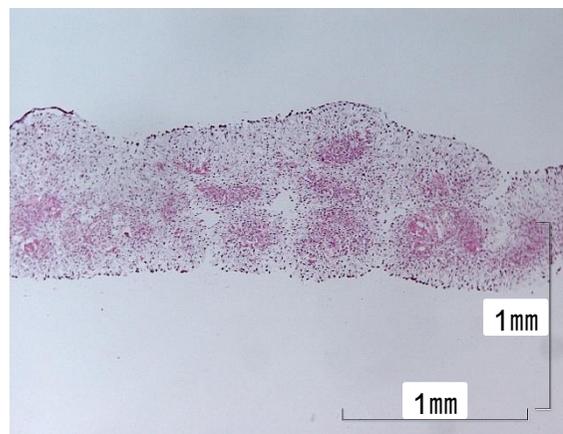
ブタ軟骨細胞三次元構造体の作製(培養7日間)

マクロ写真



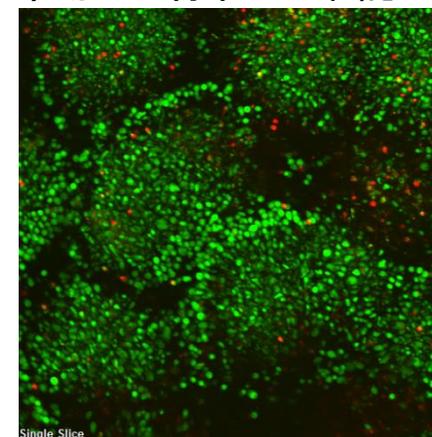
4mm×4mm 192個の軟骨スフェロイド

H・E染色



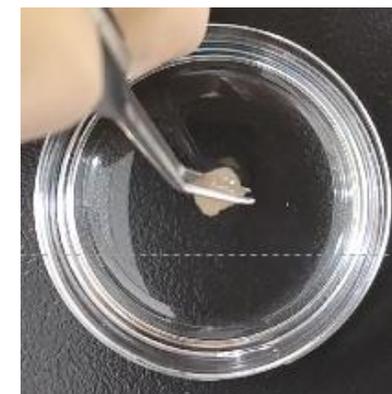
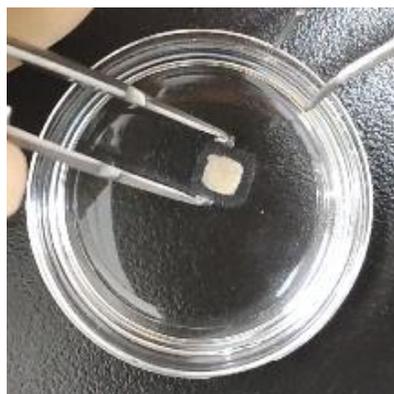
細胞密度の増減で厚みの調整が可能

Live/Dead assayによる
細胞生存性の確認

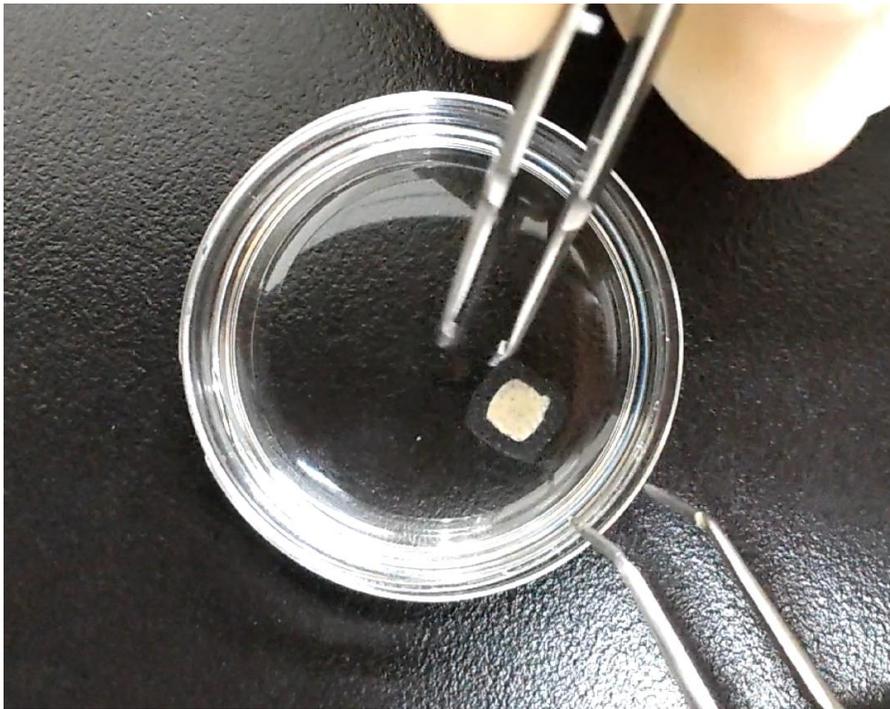


緑:生細胞 赤:死細胞

壁(GelMA)の取り外し方法



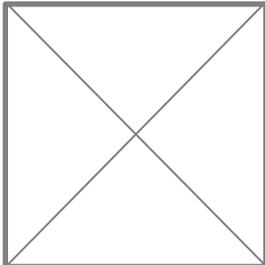
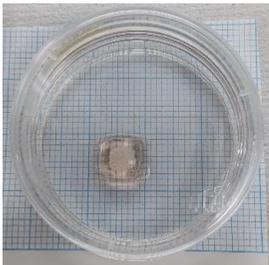
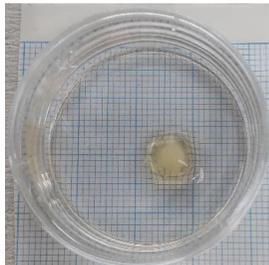
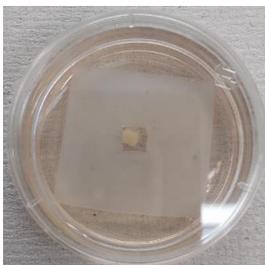
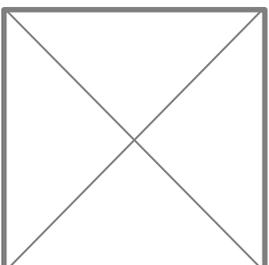
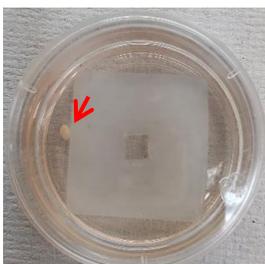
壁 (GelMA) の取り外し方法



ピンセットでの操作性

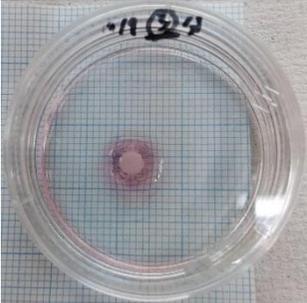
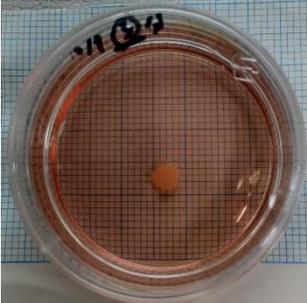
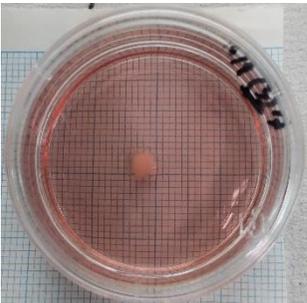


ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)三次元構造体の作製

	シリコン枠+スフェロイド	GeIMA枠+スフェロイド	GeIMA枠+細胞懸濁液
Day 0	 	 	 
Day 3	 	 	 
Day 7	 	 	 

* シリコンは細胞接着性(一)

ヒト間葉系幹細胞(MSC)三次元構造体の作製

	GelMA枠+スフェロイド	
Day 0		 <p>スフェロイド GelMA枠</p>
Day 3		
Day 7		

培養治具材料の検討

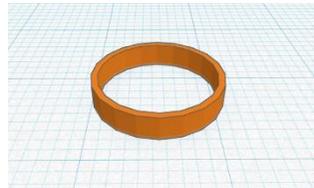
	アルギン酸ゲル (HDF)	アルギン酸ゲル+ RGDペプチド修飾 (HDF)	GeIMA (HDF)	マトリゲル (HDF)	キトサンゲル (MSC)
Day 0					
Day 3					
Day 7					

赤矢頭: 枠から細胞が剥がれていることを示す

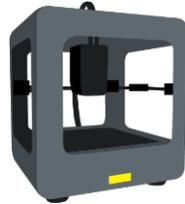
顕微鏡像



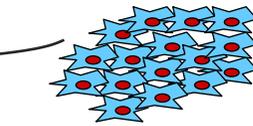
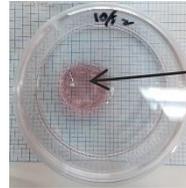
バイオ三次元プリンターを応用した二次元MSCシートの作製



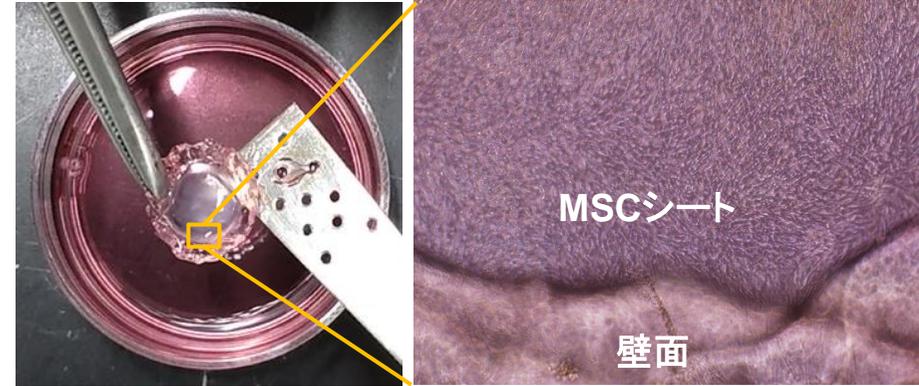
壁面を自由に
デザイン



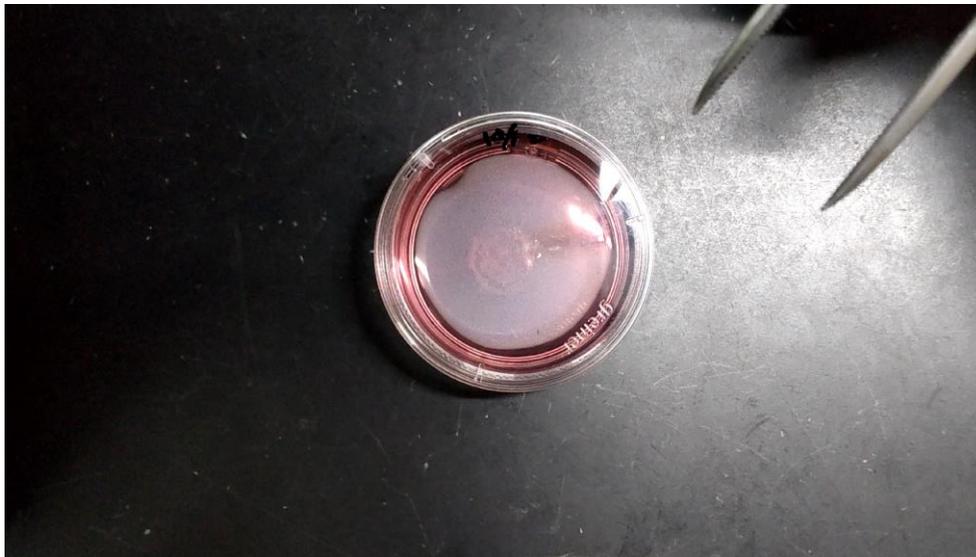
バイオ3Dプリンターを
用いてGelMAで壁面を
造形



MSCを壁内に播種し
て壁面接着細胞培養



培養9日間でready-to-useに移植可能な
MSCシートが完成(様々な表面形状に合わ
せたMSCシート作製が可能)



H・E染色



従来技術との比較

- 細胞接着性の高い壁面に細胞を接着させて三次元培養する新しい手法を開発した。
- 任意の形状を保持したまま三次元培養することが可能となった。
- 従来の足場材フリーの培養手法と比べ、培養治具の構成がシンプルで、取り扱いが簡単である。
- 本技術の適用により、特殊な装置・器具や温度の制御も必要としないため、低コスト化が期待される。

想定される用途

- 再生医療や創傷治癒などのための治療材料の作製
- 移植用の人工臓器・組織の作製
- 創薬・研究ツールとしての人工臓器・組織の作製
- 培養肉など細胞培養食品の作製

実用化に向けた課題

- 現在、大型（幅10mm以上）の細胞構造体の作製について未解決である。
- 今後、より細胞接着性の高い材料を用いた培養治具を検討し、構造体の大型化および精度向上のための条件設定を行っていく。

企業への期待

- 未解決の細胞構造体の大型化については、細胞接着性材料の技術により克服できると考えている。
- 生体材料の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、足場材フリーの細胞構造体を開発中の企業、再生医療分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞構造体の製造方法、
培養治具および培養基材
- 出願番号 : 特願2022-032396
- 出願人 : 国立大学法人京都大学
- 発明者 : 伊藤明良、青山朋樹

お問い合わせ先

**国立大学法人京都大学内
株式会社TLO京都
京大技術移転部**

TEL 075-753-9150

FAX 075-753-9169

e-mail event@tlo-kyoto.co.jp