

細胞接着と培養液保持の 二層型基材での 気液界面培養による腸組織作製

早稲田大学 理工学術院

先進理工学部 生命医科学科

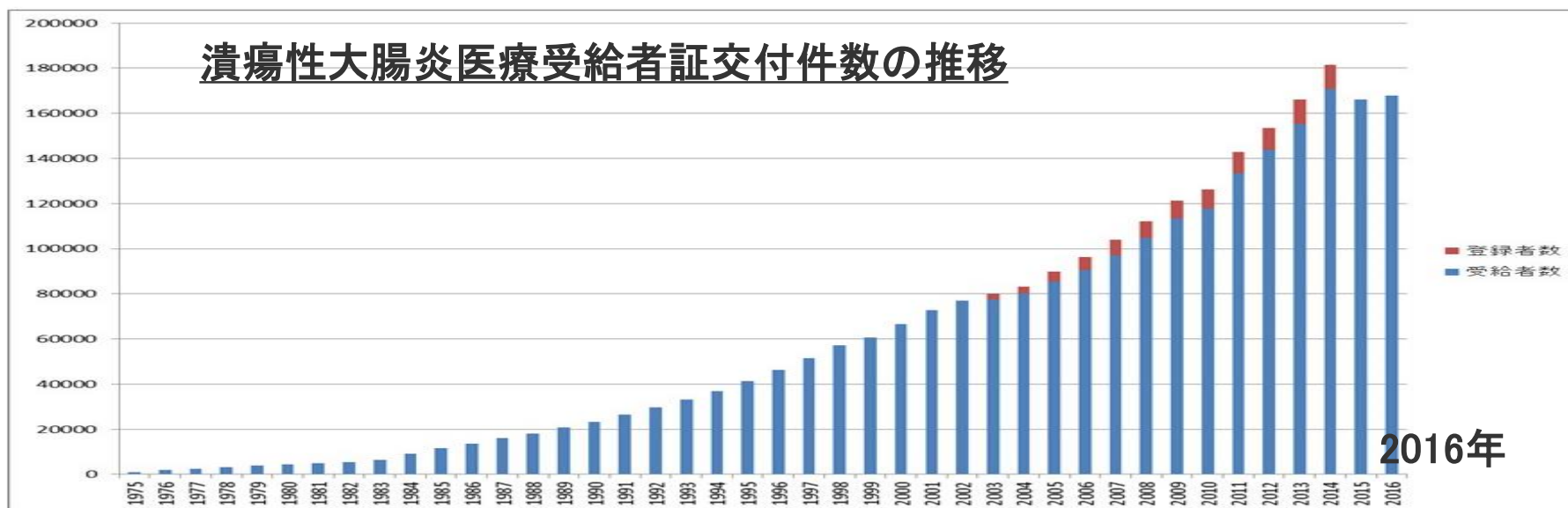
教授 武田 直也

2022年11月22日

炎症性腸疾患の 患者数急増

20万人

潰瘍性大腸炎医療受給者証交付件数の推移



2016年

4.5万人

クローン病医療受給者証交付件数の推移



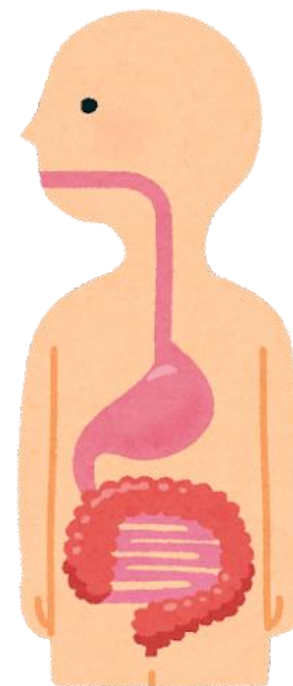
2016年

腸組織の特徴

・高次構造（絨毛突起、微絨毛）

絨毛突起構造（組織の凹凸）

微絨毛（細胞表面）

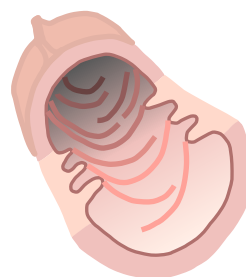


・多機能（消化、吸収、薬物代謝、免疫）

・腸モデル組織の有用性



薬剤・機能性食品開発



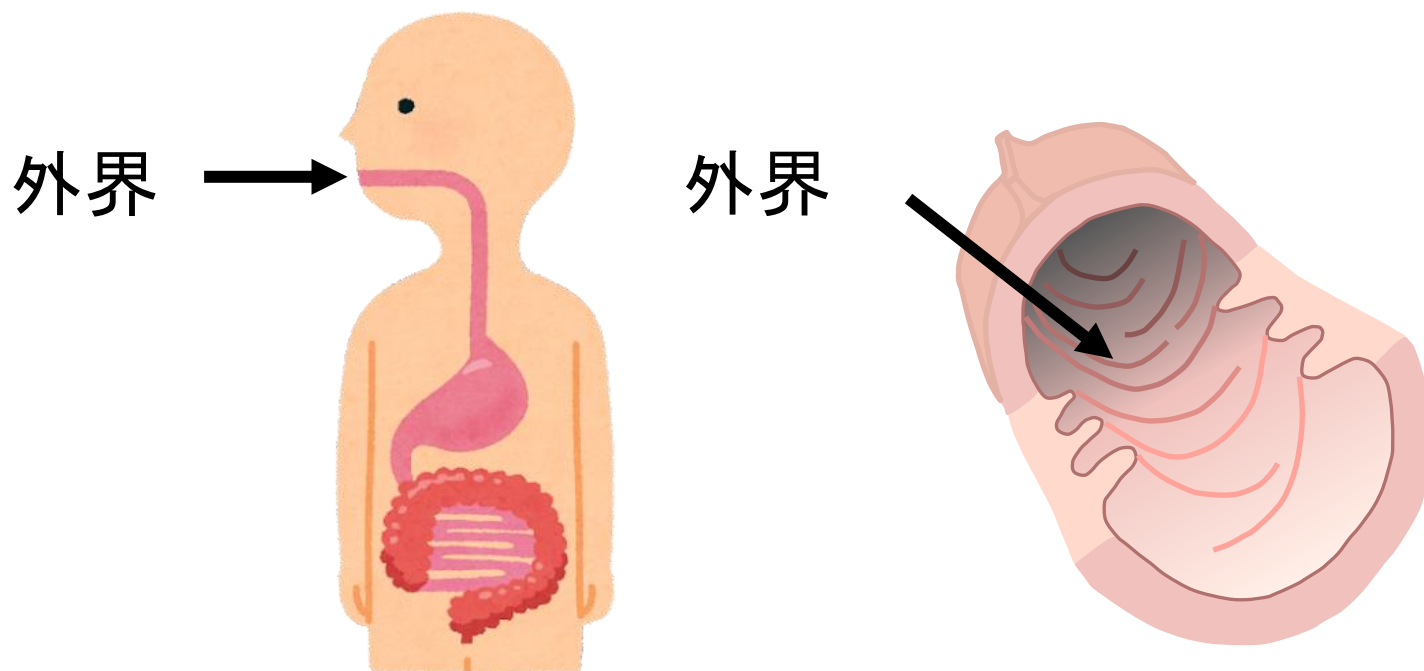
移植医療・再生医療



実験動物の代替

体内環境を模倣した条件での 培養の重要性

- 腸管上皮の内腔は、外界につながる気相に接する。

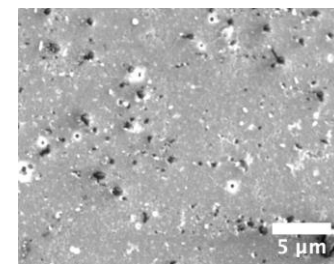
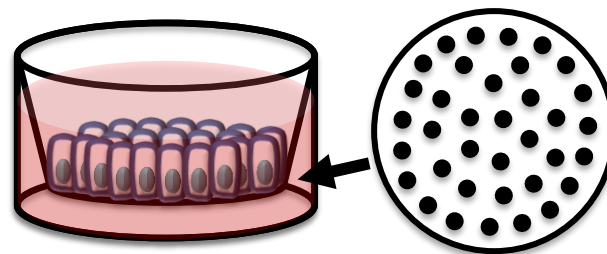


- 体内環境を模倣した条件での培養(気液界面培養)が有効と考えられる。

従来技術①とその問題点

これまでの腸モデル組織作製には、ポリカーボネート多孔膜をもつセルカルチャーインサート 培養基材が用いられているが、

- 培養基材が高価
- 空隙が少ない。
- 細胞を培養液に浸漬させて培養を行う。
- 作製した腸組織が平面的（柔毛突起構造が形成されない）
- 作製された組織が生体と比べて機能が不十分
- 組織の作製（分化・成熟）に21日間必要



多孔膜のSEM像. 孔径0.4 μm

等の問題があった。

従来技術②とその問題点

マイクロ流体デバイス内に設けた孔径10 μm の多孔性PDMS(シリコンゴム)膜の上で細胞を培養し、腸組織を作製した報告がある。

H.J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D.E. Ingber, Lab Chip, 2012, 12, 2165–2174.

H.J. Kim, D.E. Ingber, Integr. Biol., 2013, 5, 1130–1140.

しかし、

- 大掛かりな微細加工施設(多数の装置、クリーンルーム環境)が必要で、デバイスの作製自体も手順が範雑。
- PDMSは細胞接着性に乏しく、タンパク質での表面修飾が必要。
- 培養場は開放型でなく操作性に劣り、培養面積が小さく作製できる組織の大きさもmmスケールである。
- 気液界面培養は実施していない。

等の問題があった。

従来技術③とその問題点

ゲルの上での気液界面培養を行った研究例がある。

H.J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D.E. Ingber, J. Invest. Dermatol. 1983, Jul;81, (1 Suppl), 28s-33s.

しかし、

- ゲル材料はさまざまに選択できるが、細胞接着に乏しい（例えばアガロース）材料の場合は、細胞接着性のタンパク質の表面修飾が必要。
- 組織工学研究において、主に皮膚の表皮の作製。
- 研究の歴史は長いが、製品化されてはいない。

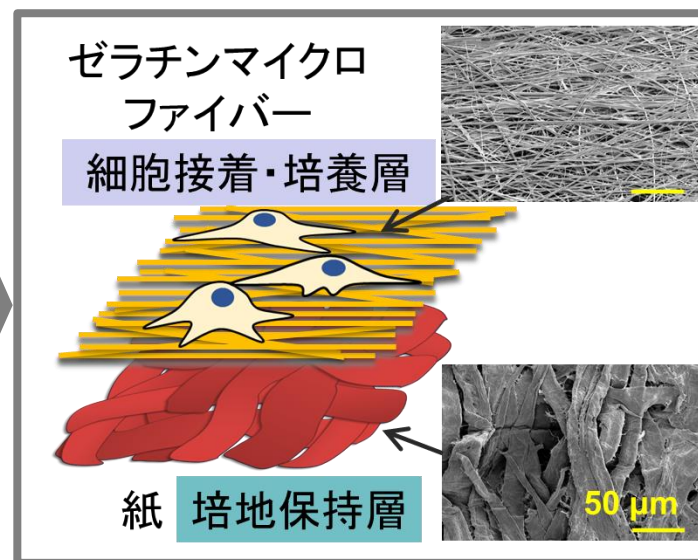
等の問題があった。

当研究室のこれまでの開発技術と課題

電解紡糸したゼラチンマイクロファイバー(細胞接着・培養層)と紙(培養液保持層)を組み合わせた簡単な構造の二層培養基材を開発して、以下の成果を達成している。

[成果]

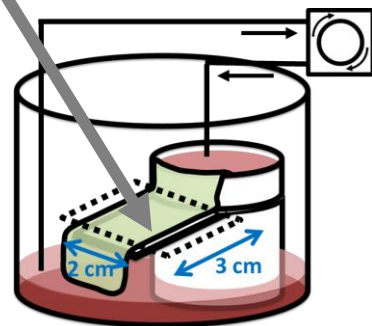
- 灌流培養による血管内皮細胞の配向制御(血管組織作製に向けた研究): A. Ozaki, et al., *Biofabrication* 2016, 8, 035010.
- 腸管上皮細胞からの構造と機能に優れた腸組織の作製



一方で、以下の課題もあった。

[課題]

紙は光透過性に乏しいため、光学顕微鏡での経時観察ができない。

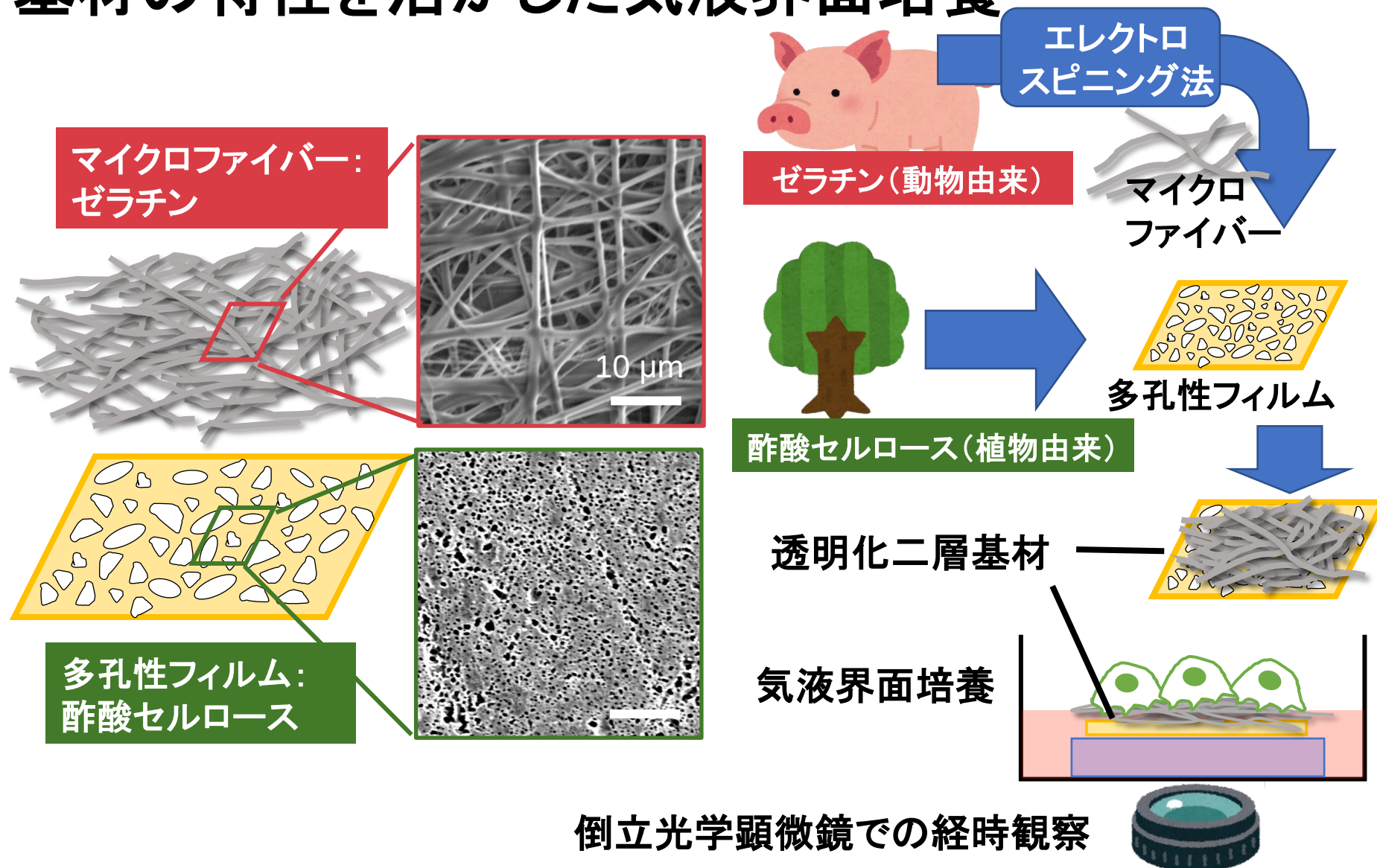


新技術の特徴・従来技術との比較

- 培養液保持層の紙を酢酸セルロースの多孔性フィルムに変更し、十分な培養液保持能を維持しながら従来技術の問題点であった光透過性を改善し、光学顕微鏡での経時観察を実現した。
- 市販のポリカーボネート多孔性膜と比較して、マイクロファイバーもセルロース多孔性膜も孔密度が高く、培養液の保持・透過が高い。材料も天然由来の素材であり、SDGsに適している。

新技術の概要と重要点

- 天然由来材料での透明化二層基材の作製
- 基材の特性を活かした気液界面培養



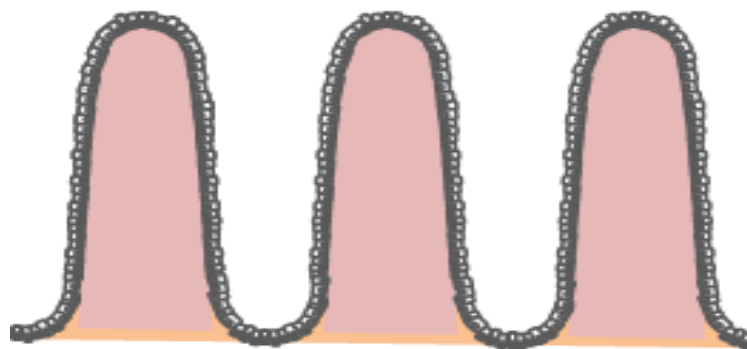
新技術(透明化二層基材)の特徴

- 培養時(水系培養液に浸漬時)の透明化
(光学顕微鏡での細胞観察が可能)
- 高い吸水性(培養液保持能)

サンプル	吸水率の相対比
多孔性セルロースフィルム	1.00
紙	0.99
再生セルロース透析膜	0.82

作製した腸組織の構造上の特徴

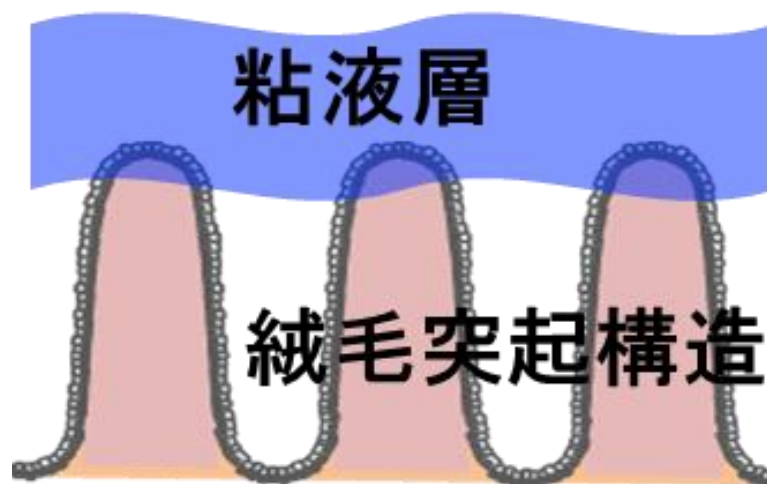
- 透明化二層基材での気液界面培養により、ヒト腸管上皮細胞(Caco-2)から腸組織を作製した。
- 腸組織に特有の立体的な構造を形成した。



- 従来法よりも早く組織を形成した。

作製した腸組織の機能上の特徴

- 豊富な粘液を産生する(粘液層は細菌叢を形成する場として、極めて重要である)。



- 腸組織特有の酵素の活性を有する。

実用化に向けた課題

- 透明化二層培養基材は、細胞が光学顕微鏡で観察可能なところまで開発済み。しかし、より観察が容易な基材の開発は有用である。
- 今後、セルロース多孔性フィルムの作製方法を改善し、孔の大きさや密度について実験データを取得して条件の最適化を行っていく。
- ファイバー層の厚みの変更も検討項目に入れる。これら仕様の変化に伴い、細胞接着性の変化につながる可能性もある。
- 生体同様に、複数種類の細胞からなるより複雑な組織の作製も期待される。細胞種によって、基材仕様の変更(材料の変更も含む)が必要な場合は積極的に進める。

想定される用途とビジネスモデル

- 本発明の「応用が期待される用途」は、「細胞培養基材」と「生体組織モデル、特に腸組織モデルの作製」である。よって、「細胞培養基材」としての事業化と、「生体組織モデル」としての事業化の2つのビジネスモデルが考えられる。
- 本培養基材の原材料のコストの試算値は、市販のポリカーボネート製セルカルチャーインサートの定価よりも桁数が小さく、コスト削減が期待される。
- 作製した腸組織は、薬や機能性食品の機能評価に利用できると期待される。
- 他の上皮組織作製への応用も可能と思われる。
- 培養基材の大型化により、大型の生体組織の作製も可能と思われる。
- モデル組織と細胞培養基材をパッケージング化しての事業形態の可能性も考えられる。

企業への期待

- 基材（特に多孔性フィルム）の大型化や量産化を進めてくれる材料、バイオ基材・試薬の企業との共同研究を希望。
- モデル組織を開発中の企業についても、本培養基材の導入は有効と思われる。
- 再生組織、薬、食品の機能評価ツールとしての腸組織モデルを有用性を検証してくれる再生医療、製薬、食品業界の企業との共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

- **発明の名称** : 二層培養基材
- **出願番号** : 特願2021-92013
- **出願人** : 早稲田大学
- **発明者** : 武田直也、土戸優志、大貫真依

お問い合わせ先

早稲田大学

リサーチイノベーションセンター

知財・研究連携支援セクション（承認TLO）

TEL 03-5286 - 9867

e-mail contact-tlo@list.waseda.jp