

福岡工業大学 学術機関リポジトリ

再生医療用細胞構造体作製のための多細胞スフェロイド形成システムの開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): Cell-construct, Multicellular spheroid, Rapid prototyping system, Tissue engineering 作成者: 下戸, 健, 張, 秀英, 青山, 小春, 大塩, 崇博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/11478/00001745

再生医療用細胞構造体作製のための 多細胞スフェロイド形成システムの開発

下戸 健 (情報工学部情報システム工学科)
張 秀英 (九州大学大学院医学研究院小児外科学分野)
青山 小春 (工学研究科情報システム工学専攻)
大塩 崇博 (工学研究科情報システム工学専攻)

Development of the Multicellular Spheroid Formation System for Regenerative Medicine

SHIMOTO Takeshi (Department of Information and Systems Engineering, Faculty of Information)
ZHANG Xiu-Ying (Department of Pediatric Surgery, Reproductive and Developmental Medicine)
AOYAMA Koharu (Information and Systems Engineering, Graduate School of Engineering)
OSHIO Takahiro (Information and Systems Engineering, Graduate School of Engineering)

Abstract

In the production of vascular and cardiac cell constructs, the use of the multicellular spheroids with mixture of fibroblasts and endothelial cells has been found to be effective. It is necessary to suppress variation factors that occur from human operation by using automation, improving data accuracy, and obtaining reproducible spheroids. Therefore, the aim of this study was to develop a multicellular spheroid formation system for the fabrication of cell structures for regenerative medicine. As a result of the research, it was found that the multicellular spheroids obtained varied according to the different timing of dispensing.

Keywords : Cell-construct, Multicellular spheroid, Rapid prototyping system, Tissue engineering

1. 緒言

再生医療分野において、医学的アプローチである iPS 細胞といった細胞ソースの開発の一方で、工学的アプローチによる細胞構造体の形成開発が活発化している。本研究グループでは、スフェロイド同士は融合するという特性を利用して、独自の技術で再生医療用細胞構造体を作製することに成功している⁽¹⁾。スフェロイドとは、従来の平面的な細胞培養とは異なり、3次元に培養することで作製される細胞の塊である。医学的アプローチにより、血管や心臓の構造体の作製には、線維芽細胞と内皮細胞をある細胞比率で混合させた多細胞スフェロイドが有効であることが証明されつつある⁽²⁾。したがって、異なる種類の細胞を任意の比率で混合させることが求められているが、作業者が任意の細胞比率に調整するのは困難であり、最適な細胞比率を検討するための膨大な実験は、作業者に大きな負担が掛かる。

一方で、個々の技術に依存する多くの変動要因を最小限に抑えることが求められており、作業者による細胞培養の作業過程の自動化が行われている。自動化によって、迅速な

操作、データ精度の向上および新規データの取得など、研究サイクルが向上する。本研究においても、スフェロイド形成システム⁽³⁾やスフェロイド形態評価システム⁽⁴⁾の開発を行い、作製プロトコルの自動化や形態評価を行ってきた⁽⁵⁾。そこで本研究では、任意の細胞比率を有した多細胞スフェロイドを形成するシステムを開発することを目的とした。

2. 対象および方法

2.1 多細胞スフェロイド形成システム

開発したシステムの概観図とソフトウェア画面を図1に示す。スカラロボット (E2C, EPSON) 第4関節先端にチップ間距離 9mm の 2×2 チャンネルのチップ着脱可能ピペットを取り付け、滅菌済みのチップを装着して細胞を扱うようにした。細胞懸濁液の吸引・排出は、電動シリンダー (CPL28T2B-06KD, Orientalmotor) を用いた。作業者と多細胞スフェロイド形成システムの多細胞スフェロイド培養方法を図2に示す。多細胞スフェロイドの作製は、まずスフェロイドを作製するのに十分な細胞数を有する細胞懸濁液と細胞が入っていないメディアムとスフェロイド培養用のリザーバーを、2種

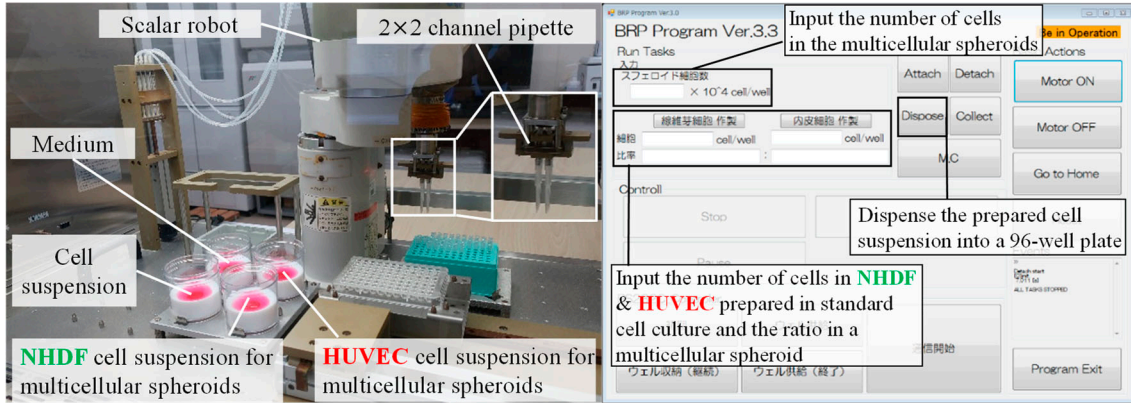


図 1 多細胞スフェロイド形成システムの概観図とソフトウェア画面

Fig. 1. Overview diagram and software screenshot of the multicellular spheroid formation system.

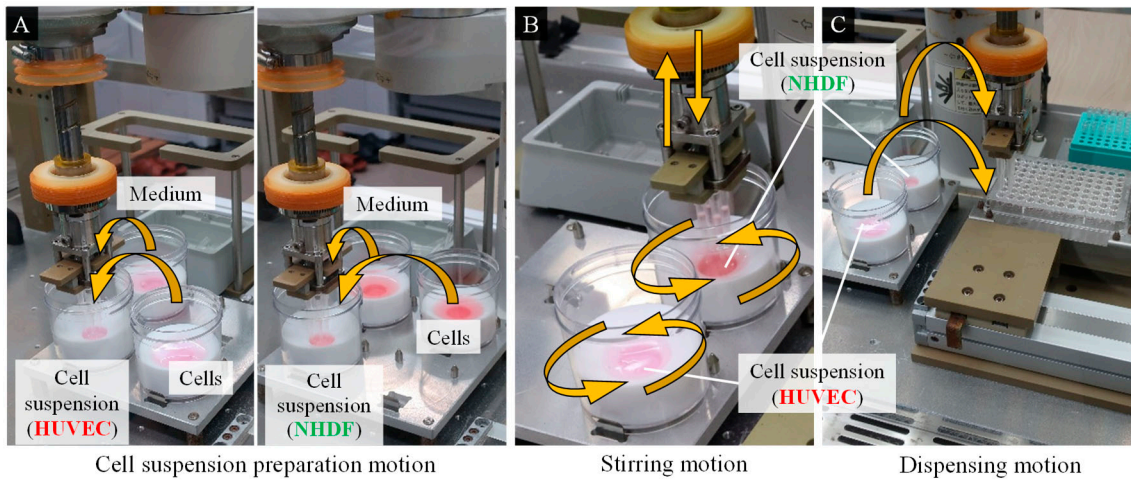


図 2 多細胞スフェロイド形成システムのモーション

Fig. 2. Motion of the multicellular spheroid formation system.

類の細胞（ヒト皮膚線維芽細胞（Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF）とヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC））について用意した。次に、ソフトウェア上で、作製したい多細胞スフェロイドの細胞数、用意した 2 種類それぞれの細胞の細胞数と多細胞スフェロイドにおける比率を入力することで、2 種類の細胞懸濁液の調整が自動で行われる（図 2A）。その後、各細胞懸濁液が $50\mu\text{l}$ ずつ 96 ウェルプレートに分注される（図 2C）、96 ウェルプレートの各ウェルに 1 つのスフェロイドが作製される。これにより、任意の細胞比率を有する多細胞スフェロイドを作製することができる。

作業者は 1×8 チャンネルのピペットを使用して、比率が調整された 2 種類の細胞が入った細胞懸濁液を、96 ウェルプレートに播種していく。その際に、リザーバーで細胞懸濁液を入念にピペッティングし細胞分布を均一化してから、96 ウェルプレートに分注する。これにより、96 ウェルプレートの各ウェルに 1 つのスフェロイドが作製され、スフェ

ロイドの大きさは播種する細胞数で調整することができる。多細胞スフェロイド形成システムでは、作業効率を向上させるために、 2×2 チャンネルのピペットを作製し、それに合わせたリザーバーを作製した。作製したリザーバーは、深部の円筒部分に向かってテーパ加工されている。作業者が使うリザーバーも V 字になっており、これは細胞懸濁液が極力残らないようにするためである。

細胞培養操作において、懸濁液の攪拌、吸引排出、分注といった動きは、細胞に対する外的刺激を極力小さくする必要があり、目的のスフェロイドを高品質な状態で獲得するためには、高度な教育訓練、培養経験を有した技術が必要となる。さらに、多細胞スフェロイドの培養方法は定量化されていないため、熟練した作業者の経験に基づいて行われている。そこで、熟練した作業者の知見を基にモーションの開発を行った。

2.2 多細胞スフェロイドの作製と評価方法 細胞はヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）とヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）

を用い、多細胞スフェロイド培養に必要な細胞数に達するまで作業者が通常培養を行った。多細胞スフェロイド培養のための細胞懸濁液の細胞数および細胞比率の調整、96 ウェルプレートへの分注は、作業者と開発した多細胞スフェロイド形成システムで行った。本研究における作業者は、細胞培養の基本を理解し、細胞株を適切な方法で培養できるとともに、24 ヶ月以上の細胞培養の経験を有している者である。細胞数は本研究グループの細胞構造体作製において使用頻度の高い、 3×10^4 cells/well とし、継代数は 5 から 10、比率は 7 : 3 とした⁽²⁾。細胞を分注してから 24 時間毎に 5 日間撮影を行い、定量評価として 96 ウェルプレートの各ウェルに生成される全ての多細胞スフェロイドの直径および円形度を算出し経時的に観察した。定性評価としては、多細胞スフェロイド内の組織構造および NHDF と HUVEC の分布状況を観察するために、HE 染色および蛍光免疫組織化学分析を行った。

3. 結果および考察

予備実験の結果、作業者と多細胞スフェロイド形成シ

テムで作製した多細胞スフェロイドは、直径と円形度および蛍光免疫組織化学分析における多細胞スフェロイド内の細胞分布とともに、異なる傾向が認められた。これらについて、多細胞スフェロイドの作製過程が影響していると考えられた。作業者はリザーバーに細胞比率を調整した細胞懸濁液を用意し、入念にピペッティングしてから $100 \mu\text{l}$ ずつ分注する。それに対して多細胞スフェロイド形成システムは、細胞比率を調整した NHDF と HUVEC それぞれの細胞懸濁液を作成し、NHDF を $50 \mu\text{l}$ 分注し、その後 HUVEC を $50 \mu\text{l}$ 分注しており、2 種類の細胞を混ぜるタイミングや順番が影響していると考えられた。そこで、多細胞スフェロイドを作製する際に、NHDF と HUVEC を播種する順番によって生じる形状の差異に着目し、播種する順番を入れ替えて 2 種類の多細胞スフェロイド作製する実験を行った (図 3)。

作製した多細胞スフェロイドの外観と直径と円形度を算出した結果を図 4 に示す。細胞数が 3×10^4 cells/well の多細胞スフェロイドの直径は $0.55 \sim 0.65 \text{ mm}$ になるため、全ての手法の多くの多細胞スフェロイドが満たしていた。円形度に関しても、本研究グループが定める品質基準の 0.6

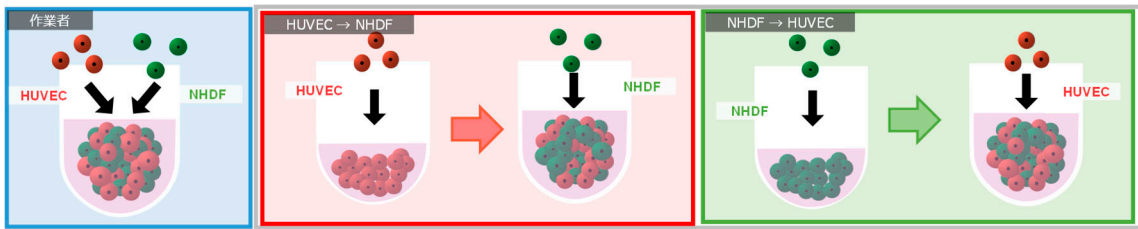


図 3 多細胞スフェロイドの作製過程を考慮した作製実験

Fig. 3. Fabrication experiments considering the process of producing multicellular spheroids.

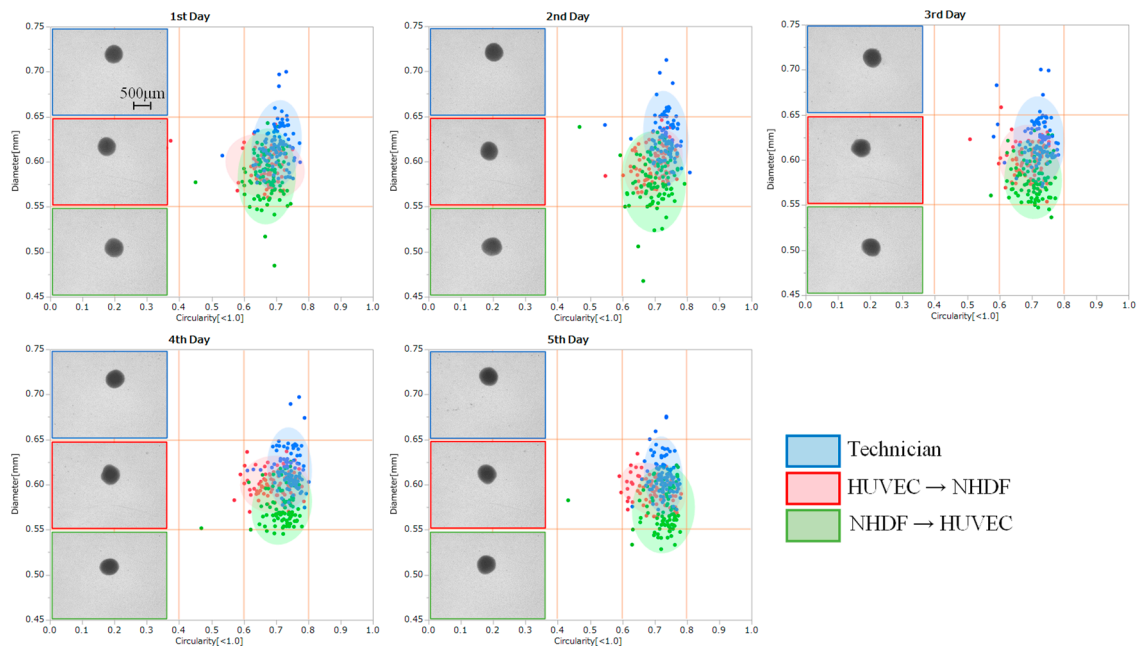


図 4 3つの方法で作製した多細胞スフェロイドの直径と円形度の経時変化

Fig. 4. Change over time in diameter and circularity of multicellular spheroids prepared by three different methods.

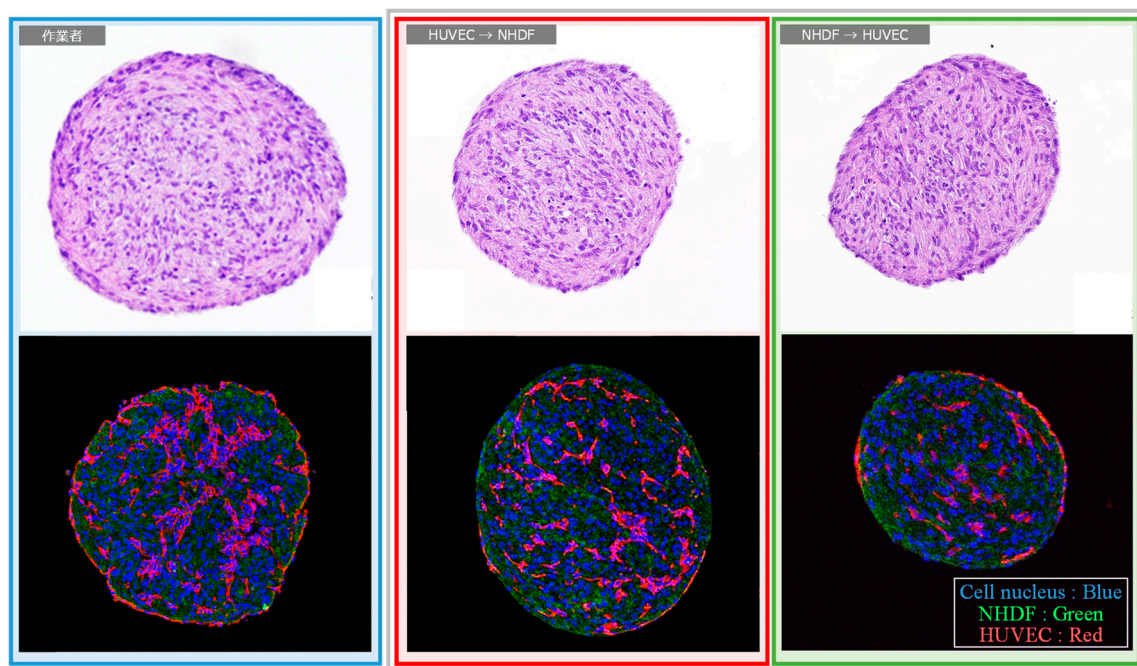


図5 多細胞スフェロイドの作製過程を考慮した作製実験

Fig. 5. The distribution of cells inside multicellular spheroids produced by three different methods.

を多くのスフェロイドが満たしていた。このことから再現性のあるスフェロイドの作製に成功したと考えられる。これらの実験結果から、HUVECを先に播種した方法の方が、作業者が作製したものに近いことが確認された。

スフェロイド培養して2日目の多細胞スフェロイドに対し、HE染色および蛍光免疫組織化学分析を行った結果を図5に示す。HE染色により多細胞スフェロイド内の細胞は死滅していないことが確認された。蛍光免疫組織化学分析において、作業者が作製したスフェロイドでは、HUVECが外周部と内部に様に分布していた。多細胞スフェロイド形成システムで作製した多細胞スフェロイドに関しては、HUVECを先に分注した場合、外周部には分布していなかったが、スフェロイドの内部には作業者と同程度のHUVECが様に分布していることが確認された。NHDFを先に播種した場合には、外周部にHUVECが分布していたが、スフェロイドの内部のHUVECは少ないことが確認された。スフェロイド内部一様にHUVECが分布している方がよいとされており、これらのことについても、HUVECを先に播種した方法の方が、作業者が作製したものに近いことが確認された。

4. 結言

血管や心臓の3次元細胞構造体を作製するために必要となる多細胞スフェロイドについて、細胞比率を調整できる多細胞スフェロイド形成システムの開発を行った。開発したシステムを用いることにより、多細胞スフェロイド作製過程を自動化することができた。再現性のある多細胞スフェロイドを作製することができ、作製過程を考慮することで、作業者が作製するものと同様の多細胞スフェロイドを

作製できることを確認した。これらの情報は、培養工程の自動化における作業方法の検討や、再現性のあるスフェロイド獲得に役立つと考えられる。今後は、開発したシステムを応用して、スフェロイドの融合特性を解明するための研究を行う計画である。

<謝辞>

本研究の一部は本学の2021年度若手卓越研究支援制度の研究費により実施された。佐賀大学の中山功一教授、九州産業大学の日垣秀彦教授と石川篤教授には、研究について助言を頂いた。ここに記して謝意を表す。

文 献

- (1) Takeshi Shimoto, Koichi Nakayama, Shuichi Matsuda and Yukihide Iwamoto: "Building of HD MACs using cell processing robot for cartilage regeneration", Journal of robotics and mechatronics, Vol.24, No.2, pp.347-353 (2012)
- (2) Xiu-Ying Zhang, Yusuke Yanagi, Zijing Sheng, Kouji Nagata, Koichi Nakayama and Tomoaki Taguchi: "Regeneration of diaphragm with bio-3D cellular patch", Biomaterials, Vol.167, pp.1-14 (2018)
- (3) 下戸健, 石川篤, 日垣秀彦: 「再生医療用 cell processing ロボットを用いたスフェロイド作製過程の自動化」, 臨床バイオメカニクス, Vol. 39, pp. 305-311 (2018)
- (4) Takeshi Shimoto, Xiu-Ying Zhang, Shizuka Akieda, Atsushi Ishikawa, Hidehiko Higaki and Koichi Nakayama: "Analysis of cell spheroid morphological character using the spheroid morphology evaluation system", Journal of robotics and mechatronics, Vol.30, No.5, pp.819-826 (2018)
- (5) Takeshi Shimoto, Chihiro Teshima, Toshiki Watanabe, Xiu-Ying Zhang, Atsushi Ishikawa, Hidehiko Higaki, and Koichi Nakayama: "Study on pipetting motion optimization of the automatic spheroid culture system for forming spheroids", Journal of robotics and mechatronics, Vol.33, No.1, pp.78-87 (2021)