

【助成 41-39】

気液界面制御によるオルガノイドのコンビナトリアル培養

研究者 京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 准教授 藤本 和也

〔研究の概要〕

本研究は、工学的な観点から再現性の高いオルガノイド培養技術を確立し、培養条件と形成されるオルガノイドの状態を定量的に関連付けることを目的とする。2010 年代より、多能性幹細胞に関する知見の進展と生体外における 3 次元的細胞培養技術の発展に基づいて、生体内の臓器に類似した細胞の分化状態と微細構造をもつオルガノイドと呼ばれる 3 次元培養組織に関する研究が盛んにおこなわれ、臓器の発生メカニズムを理解することや、再現性の高い薬剤のスクリーニングを実現することなど、基礎・応用の両面から大きな期待が寄せられている。より高度なオルガノイド培養に向けて課題となっている再現性の向上と高次構造の再現に向け、マイクロ流体デバイスを用いて空間的な環境を規定した環境で腎臓オルガノイドを培養することを目指した。

ハンギングドロップ法を用いた前駆細胞のスフェロイド化を実現するとともに、腎臓オルガノイドを培養可能なデバイスの要件検討と数値シミュレーションによる濃度勾配の時間的変化の解析を進め、3D プリンタを利用して製作したデバイス内での腎臓オルガノイド培養の準備を完了している。本研究では腎臓オルガノイド培養過程における最初の段階は従来通り進め、スフェロイド化およびその後の培養をそれぞれ適した流体デバイス内で行うことを構想した。

本期間中ではまず、細胞の懸濁液を培養基板に懸垂させることで細胞塊を形成するハンギングドロップ法を応用して腎臓オルガノイドの前駆細胞をスフェロイド化した。3D プリンタを利用して筒状の構造をもつデバイスを作成し、液滴を形成すると iPS 細胞から分化させた細胞の懸濁液が重力と表面張力によって下向きに凸な液滴を形成し、重力により凸部に集まった細胞がスフェロイドを形成する。

形成したスフェロイドを、液滴ごと対応するデバイス構造に移すことでオルガノイド培養の次の段階に移行で

きるよう、デバイスを設計した。3D プリンタで使用されるレジン素材には細胞毒性がみられることがあるため、まずヒト由来の線維芽細胞を用いて毒性の検討を行った。結果として、3D プリンタメーカー推奨の後処理だけでは線維芽細胞に対する毒性がみられたのに対し、200℃で 6 時間の熱処理を行うことで細胞毒性が軽減され、細胞培養に広く利用されているポリジメチルシロキサン (PDMS) に比較しても有意な差は見られなかった。このデバイスを利用して腎前駆細胞によるスフェロイドが形成できることも確認した。(図 1)

続いて、発生過程を模したモルフォジェンの濃度勾配を形成できるデバイスの構造を検討し、数値計算に基づいてデバイス内に形成される勾配の時間変化を解析した。検討したデバイスは 2 つのリザーバとその中央に位置するオルガノイド培養部で構成され、スリット状の開口で接続されている。中央の培養部にハイドロゲルを導入し、オルガノイドを培養する。隣接するそれぞれのリザーバに組成の異なる培養液を導入し、スリット部を通した物質の拡散によりハイドロゲル内部に

濃度勾配が形成される。(図 2)

腎臓の発生に深く関与していることが知られている成長因子である、FGF7 とよばれるタンパク質を想定し、設計したデバイスの形状に基づいて濃度勾配の形成を数値計算により解析した。計算には COMSOL を用い、計算に用いる拡散係数を光褪色後蛍光回復法 (FRAP) により推定した。FRAP では FGF7 と同程度の分子量をもつ蛍光標識デキストラン分子を用い、高強度のレーザーを照射してスポット状に蛍光を褪色させる。レーザー照射を停止すると褪色したスポットへと周囲から蛍光分子が拡散し、蛍光強度が回復する。回復に要する時間を計測し、理論式でフィッティングすることで拡散係数を算出した。FRAP により計測した拡散係数に基づき数値計算を行い、設計したデバイスにおいて 24 時間程度は有効な濃度勾配が保たれることが示されたため、実際に 3D プリンタを用いてデバイスを作成した。(図 3)

現在は、スフェロイド作成からオルガノイド培養デバイスへの移行と作成したデバイスでのオルガノイド培養を実証するための実験を進めている。予備実験および数値計算により実証したコンセプトに基づき、スフェロイド形成及び移動を安定かつ少ない作業量で実現できるデバイスを設計し、3D プリンタを用いて製作し

た。

このデバイスの中心部にオルガノイドを包埋するためのハイドロゲルとしてマトリゲルを導入し、片側のリザーバに蛍光標識デキストラン溶液を導入し、共焦点顕微鏡を用いてデキストランが時間経過とともにデバイス内で拡散する様子を観察した。24 時間の観察結果から、片側のリザーバから中央部のマトリゲル内をデキストランが拡散し、濃度勾配が形成されることを確認した。蛍光強度の分布から、マトリゲル中に式濃度の分布が形成されているとともに、その時間変化は COMSOL でシミュレーションした変化と同程度であることがわかった。これらのことから、オルガノイド培養における空間パターン形成のためのデバイス構築が行えたと言える。

現在は従来法と同様のオルガノイド培養の実証に向け、デバイス製作・培養条件のフィックスを進めている。腎臓オルガノイドが培養できることを示したのち、培養初期段階において成長因子やシグナル分子の空間的な分布を形成することでより高次の空間的構造をもつオルガノイドの培養に向け、成長因子の種類や濃度、時間変化を検討している。具体的には、ネフロン細胞の分化に必要な WNT 刺激の空間的パターンを形成することを検討している。



図 1. ハンギングドロップ法によるスフェロイド形成

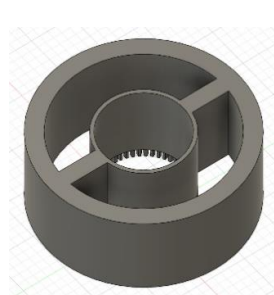


図 2. オルガノイド培養デバイス

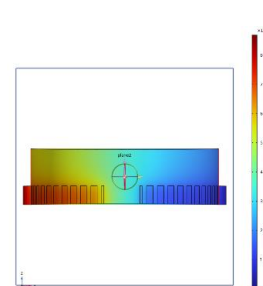


図 3. オルガノイド培養デバイスによる勾配形成