

68    機械刺激の深化 -細胞集団への適応-	袴田 昌高
--------------------------	-------

**【目的】** 高細胞密度かつ階層的血管網 (hierarchical vascular networks : HVN) を持つミリメートルサイズの 3D 組織を開発するために、著者らはスフェロイドの集団に振盪 (周期的機械的刺激) を与えて高細胞密度組織の自己組織化を促進することを着想した。振盪は機械的な刺激のほかにも、酸素・栄養の供給を促進する効果がある。その他の工夫として、血管の形成・安定化・成熟に関連する周皮細胞を取り入れ、また容器作製に 3D バイオプリンティングも援用することとした。

**【方法】** スフェロイドは、マイクロウェルのプレートまたはディッシュを用いて作製した 3 種の細胞を組み合わせたスフェロイド (以降、3 細胞スフェロイドと称する) の場合、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト肝星状細胞 (HSC) を 10 : 1 : 0、10 : 1 : 1、10 : 1 : 10 の細胞比で混合した。混合細胞を 200 細胞/マイクロウェルで播種し、3~5 日間の前培養を行った。作製したスフェロイドはすべて、EBM-2 (CC-3162) を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下の加湿雰囲気中で保管した。

また、バイオプリント用のバイオインクは、GelMA 粉末を、光重合開始剤であるフェニル (2,4,6-トリメチルベンゾイル) ホスフィン酸リチウム (LAP) を含む 10 mL の DPBS に溶解し、適切な温度条件で使用した。また、犠牲バイオインク (プルロニック) を 4℃で印刷し、CAD モデルに基づいた 3D 構造体を作製した。この構造体を液体 GelMA の入った容器に移し、GelMA を波長 405 nm の光で 1 分間架橋した。最後に温度を 4℃に下げてプルロニック構造体を除去し、GelMA 容器とした。容器は DPBS 中、4℃で最低でも 1 週間保存した後、チャンバーにスフェロイドを充填して高細胞密度前駆体とした。この前駆体を 45 rpm で 2 週間振盪培養し、高細胞密度組織を作製した。試料は各種顕微鏡観察・遺伝子発現分析に供した。

**【結果】** 高細胞密度前駆体を振盪培養にかけた結果、試料を構成するスフェロイド間の結合が強化され、組織をピンセットでつまみ上げ、崩れることなく何度もつまむことができ、同時に高細胞密度 (>10<sup>8</sup> 細胞/cm<sup>3</sup>、生体内の臓器の細胞密度とほぼ同等) が達成された。スフェロイド同士の融合が各種観察により確認され、かつ、高密度細胞組織の中心にプルロニック犠牲材構造体から作製された人工的なマクロ流路 (=擬似人工動脈) が明瞭に観察された。また、毛細血管はこの擬似人工動脈と吻合していた。薄切試料の α 平滑筋アクチン (αSMA) の免疫染色後の観察から、活性化した HSC が管腔構造の周囲に偏在し、成熟した HVN の迅速な形成を支えていることが示唆された。さらに、蛍光ビーズを含む培地を流した試料の蛍光顕微鏡観察により、培地は組織中央の擬似人工動脈から組織内の毛細血管へと流れていること、毛細血管が擬似人工動脈とつながっていること、毛細血管と蛍光ビーズが同じ場所にあることが確認された。

機械刺激 (振盪培養) によるミリメートルサイズの 3D 組織創製

