

磁力を用いた細胞操作による三次元生体組織の構築

井 藤 彰*

Construction of 3D Tissue-Like Structures by Magnetic Force-Based Cell Manipulation

Akira Ito*

1. はじめに

筆者らは「細胞を物理的にハンドリングする」といった生物プロセス工学的な視点から、より高度な臓器構築が要求される次世代のティッシュエンジニアリングにおけるキーテクノロジーになると考えられる「三次元的な細胞の配置・配列技術」について、細胞の磁気マニピュレーションを目的とした機能性磁性ナノ粒子の開発を行い、それらを用いたティッシュエンジニアリング技術である Magnetic force-based tissue engineering (Mag-TE) 法を開発している。本稿では、今まで筆者らが行った Mag-TE 法を用いた三次元組織構築法の研究について紹介する。

2. 機能性磁性ナノ粒子

磁性粒子は、磁束密度の高い方へ引き寄せられる性質をもつため、DNA 分子から細胞まで幅広い生体物質の磁気分離の分野において、盛んに研究が行われてきた。マグネタイト (Fe_3O_4) は、鉱物として自然界に存在しており、生体内にも微量に存在していることが知られている磁性体であり、化学的に安定であることから生体における毒性が低く、核磁気共鳴イメージング (Magnetic resonance imaging, MRI) の造影剤や癌の温熱療法といった医療分野においても利用されてきている [1]。一方、標的細胞の表面に磁性粒子を結合させることで、外部磁場により、細胞に直接接触することなく「遠隔で」、細胞機能を操作・制御することができるため、これらの技術のティッシュエンジニアリング分野への応用が行われ始めている [2]。

筆者らのグループは、カチオニックリポソームに直径 10 nm ほどのマグネタイト粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型マグネタイト (magnetite cationic liposome,

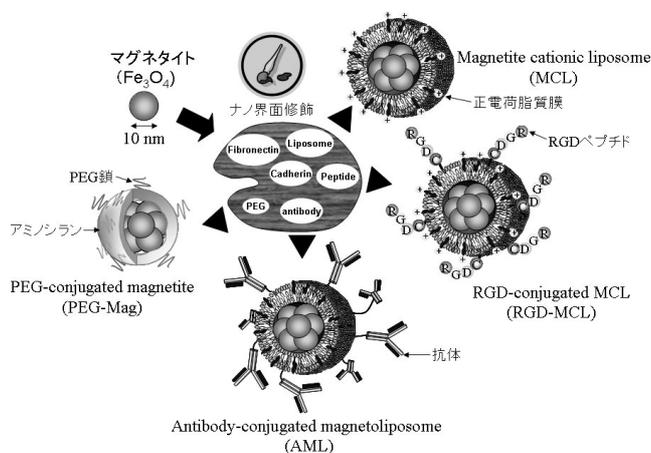


図 1 機能性磁性ナノ粒子. 磁性ナノ粒子を様々な生物活性をもつバイオマテリアルで修飾することにより、機能性磁性ナノ粒子を開発した。

MCL, 図 1) を作製した。MCL は正電荷を持っているために、一般的に表面に負電荷を持っている細胞に結合することができ、さらにリポソームの効果として、マグネタイトをエンドサイトーシスの作用で標的細胞内に導入することができる [3]。一方、多種類の細胞が混在する場合に目的の細胞だけを選択的に結合させることを目的に、中性の電荷をもつリポソームでマグネタイトを包埋し、さらに表面に細胞特異的な抗体を結合させた抗体結合型マグネトリポソーム (antibody-conjugated magnetoliposome, AML, 図 1) を作製した [4]。筆者らは今までに、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) の表面抗原である CD105 に対する抗体を結合させた AML を用いて、骨髓液中から MSC を分離し、さらに、磁力で MSC の培養面積を規定することで、細胞の播種密度を高くし、オートクライン作用などの細胞間相互作用を利用して、数少ない骨髓中の MSC を増幅するための有効な培養方法を開発した [4]。一方、MCL はほとんどの細胞に結合することができるため、特異性を要する細胞の分離には向かないが、どのような細胞にも結合できるという汎用性を有するため、標的細胞を分離・増幅し

* 九州大学大学院工学研究院化学工学部門
Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kyusyu University

た後のプロセス（本稿で解説する三次元構築技術）における細胞の磁気ラベルには威力を発揮する。

細胞のマニピュレーション技術のなかで、細胞の接着制御はもっとも研究されている分野の一つである。足場依存性の接着細胞を培養するためには、培地の血清に含まれるフィブロネクチンなどの接着タンパク質が培養皿表面に沈着することで、細胞の足であるインテグリンが接着タンパク質に接着する必要がある。ここで、フィブロネクチン等の接着タンパク質をうまく利用することで、細胞の接着を制御する研究が行われている。さらに、フィブロネクチン分子中のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) のアミノ酸配列が細胞接着に重要なことから、RGD 配列をもつ合成ペプチドの利用も行われている[5]。筆者らは、MCL にさらに細胞操作のための機能を付加するために、MCL のリポソーム表面に、合成した RGD ペプチドを共有結合させることによって、細胞接着性磁性ナノ粒子 RGD-MCL を開発した(図1)[6]。RGD ペプチドは細胞のインテグリンシグナルを介して、細胞接着を誘導し、細胞骨格を発達させる。このように、リポソーム表面に、細胞に対する生物活性をもつペプチドやタンパク質を結合することで、細胞機能を操作するための機能性磁性ナノ粒子の創製を行っている。

さらに、全く逆の発想で、細胞が接着しない磁性ナノ粒子を開発すれば、細胞の非接着領域をつくり出すことが可能であり、また、その領域は磁力で制御可能であると考えられる。細胞が接着しない表面をつくり出すためには、一般的に、高分子を化学的に結合させて培養表面の親水性を高くする方法が用いられる。その中でも、最も有用な高分子の一つであるポリエチレングリコール (PEG) による表面修飾は、PEG 鎖の高い親水性と柔軟性により、タンパク質等の生体分子の吸着を抑えることができることから、細胞が接着しない培養表面をつくり出すことができる[7]。筆者らは、磁性ナノ粒子をアミノシランでコートし、その表面に PEG を修飾することで、細胞非接着性磁性ナノ粒子 PEG-Mag を開発した (図1)[8]。

3. MCL を用いた三次元細胞組織の構築

培養細胞を *in vitro* で自然沈降によって培養表面上に積み上げていっても、その上下の細胞どうしが即座に接着して重層化することはない。それは、タンパク質分解酵素を用いた細胞回収法では細胞が接着するための細胞外マトリクスが分解されてしまうことによる。こういった背景から、東京女子医大の岡野教授らのグループは、温度感受性高分子を利用することによって、従来の細胞回収における酵素処理を不要とすることで細胞をシート状に回収することが可能な「細胞シート工学」を開発した[9]。一方、筆者らは、重層化細胞シートを形成するための一つの方法論として、磁力を用いた物理的な方法を提案している。ここ

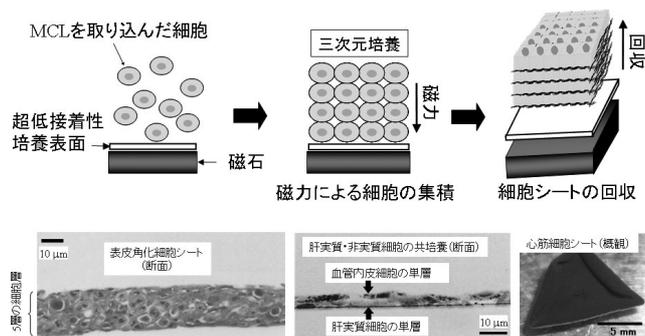


図2 MCLを用いた三次元細胞組織の構築。MCLを取り込んだ細胞を磁力で引きつけることによって、一定期間細胞を三次元培養し、細胞シートを作製した。細胞シートは、超低接着性培養表面上で培養することで、磁力を開放すると底面から剥がれて回収可能であった。この技術により、表皮角化細胞シート、肝実質細胞・非実質細胞の三次元共培養および心筋細胞シートを構築した。

で、筆者らは、MCL を用いて細胞を磁気ラベルし、磁力で引きつけることにより、細胞間を密に長時間維持することによる三次元培養が可能となり、細胞間接着を促進させて三次元重層組織を構築することができるのではないかと考えた。図2に、Mag-TE法による三次元組織作製法の概念図を示す。

筆者らは、表皮角化細胞を Mag-TE 法によって重層化させることで、培養表皮細胞シートが構築できるかを検討した[10]。MCL を添加することによって磁気ラベルした細胞を、タンパク質や細胞がほとんど吸着しない材質でできた超低接着性の培養皿に、コンフルエント時の細胞数の5倍の細胞数で播種し、円柱磁石を培養皿底面に設置して1日培養したところ、均一な5層からなる細胞シートが形成された(図2)。このシートの細胞間結合を電子顕微鏡で観察したところ、接着斑であるデスモソームが観察されたことから、Mag-TE で作製した細胞シートは、磁力で凝集しているだけではなく、細胞どうしが接着タンパク質を介して能動的に結合していると考えられる。作製した培養表皮シートは、超低接着性表面上で磁力によって物理的に集積させて培養しているため、磁力を解除することで、酵素処理なしで回収可能だった。さらに、Mag-TE 法で作製した培養表皮シートは、シート形成後も磁性ナノ粒子を含んでいたことから、作製したシートが棒磁石を用いることで回収できた。培養組織は脆弱な場合が多いことから、磁力で培養組織を回収できる点は Mag-TE 法の大きな利点である。すでに、筆者らは、Mag-TE で作製した間葉系幹細胞シートを、独自に開発した電磁石で回収・運搬して、ラット頭蓋骨欠損部に移植することに成功している[11]。

生体組織は複数種類の細胞が情報伝達しながら機能していることから、複数種類の細胞を三次元的に配置する技術の開発が望まれている。例えば肝臓は、肝実質細胞と非実質細胞といった複数種類の細胞から成り立っており、それ

らを共培養することによって肝機能が促進されるといった報告がある[12]. そこで筆者らは, Mag-TE 法によって, 肝臓のような複数種類の細胞が三次元的に綿密に相互作用することによって機能が発揮される器官が, 重層組織として構築できるかについて調べた[13]. 細胞を磁気ラベルするために, MCL をヒト大動脈血管内皮細胞 (human aortic endothelial cell, HAEC) の培養液に添加した. 磁気ラベルした HAEC を, 単層培養したラット肝実質細胞上に添加し, 磁石を培養皿底面に設置して培養したところ, 培養皿全体にわたって均一に HAEC が沈降し, 肝実質細胞に接着した (図 2). 肝機能の評価としてアルブミン生産を測定したところ, Mag-TE 法で共培養を行うことでアルブミン生産能は有意に増加することが分かった. 以上の結果から, Mag-TE 法を用いることで, 通常三次元的には接着しない細胞どうしを磁力によって接着させることができ, この三次元共培養によって, 肝実質細胞の機能を亢進させることができた.

心臓病は日本人の三大死因の一つであり, 年間 15 万人以上が亡くなっている. 筆者らは, Mag-TE により心筋組織を再構築した「機能する」心筋細胞シートの創製を目指した. MCL でラット初代心筋細胞を磁気ラベルし, 心筋細胞シートを作製した[14]. 作製した心筋細胞シート (図 2) は, 8 層の均一な細胞シートであることが, 細胞シートの断面の顕微鏡写真により確認された. 心臓は一定のリズムで拍動しているが, これは連結した心筋細胞の間にギャップ結合が存在するために, 活動電位が細胞から細胞へと急速に広がるからである. そこで, 作製した心筋細胞シートの内部にギャップ結合が存在するかどうか調べるために, 免疫組織染色を行ったところ, 心筋細胞シート内部にギャップ結合タンパク質である connexin43 が存在することがわかった. さらに, 活動電位が心筋細胞シート内を伝わっていることを, 微小電極アレイを用いて確かめた. これらの結果から, Mag-TE で作製した心筋細胞シートは, 電気的な結合を持った「機能する」組織になりうると考えられる.

さらに, Mag-TE 法の最大の利点として, 様々な形の磁石を用いることで, 重力方向以外の標的部位にも目的細胞を特異的に配置・配列できることがある. このことにより, 細胞を自然沈降させても構築が不可能な形状の組織を構築することができる. 従来のティッシュエンジニアリング技術では, 血管のような管組織を形成させるには, 管状のポリマーに細胞を自然沈降させて接着させる等の方法で行っている. この場合, 細胞を均一にポリマーに接着させることは困難であり, また, 多くの細胞はポリマーに接着しないで流れていってしまうといった問題点があった. 筆者らは, 管の軸を棒磁石にすることによって, MCL で磁気ラベルした細胞をロスすることなく, 確実に標的した位置に細胞を播種でき, 軸の磁石を引き抜くことで管構造を構築する手法を開発した[15]. 図 3 に Mag-TE による管状組織構

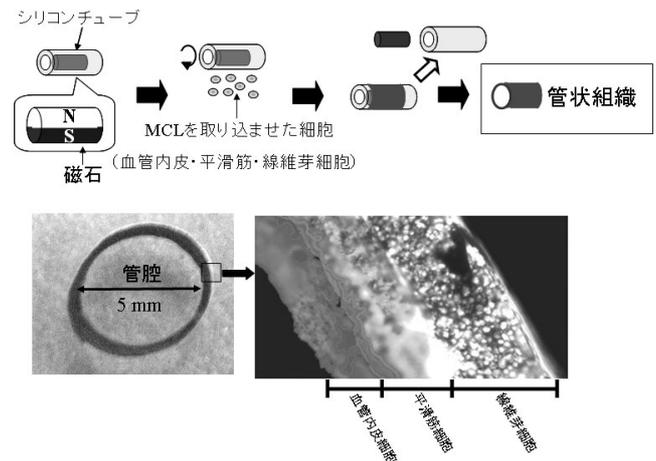


図 3 MCL を用いた管状組織の構築. MCL を取り込んだ細胞を棒磁力で引きつけることによって, 三種類の細胞を順次磁石に吸着させていき, 棒磁石を引き抜くことで, 管状組織を作製した. この技術により, 血管内皮細胞・血管平滑筋細胞・線維芽細胞からなる血管様構造を構築した.

築法の概念図を示す. MCL で磁気ラベルした血管内皮細胞 (endothelial cells, EC), 血管平滑筋細胞 (smooth muscle cells, SMC), 線維芽細胞 (fibroblast, FB) を順に棒磁石に播種していったところ, 三種類の細胞層構造 (内膜・中膜・外膜構造を模擬している) からなる内径 5 mm の小口径血管様組織を構築することに成功した (図 3).

4. RGD-MCL および PEG-Mag を用いた磁気細胞パターンニング

生体組織は複数種類の細胞が情報伝達しながら機能していることから, 複数種類の細胞を高精度に, さらに三次元的に配置する細胞パターンニングの技術の開発が望まれている. 現在, 微細加工技術の進歩に伴い, 様々な方法による培養基材のパターンニング技術が開発されている. 一方, ティッシュエンジニアリングにおける移植に使用するためには, 細胞を培養基材から取り出す必要があるため, 培養基材の微細加工技術による細胞接着のパターンニングは移植には不向きであると考えられる. また, 培養基材の微細加工では, 三次元パターンニングが困難である. こういった観点から, 筆者らは磁力による物理的な細胞パターンニングの開発を行った.

RGD-MCL を用いた細胞のパターンニング法[16]の概略を図 4 に示す. 磁力で細胞をマイクロパターンニングするためには, 磁石の形状をデザインできる必要がある. 筆者らは, コンピューター援用設計 (computer-aided design, CAD) により, 厚さ 1 cm のアクリルの板に「M」「A」「G」といった文字の溝を 200 μm 幅で彫り, その溝に磁性体 (鉄板) を埋め込むことにより, 磁力を集中させるデバイスを作製した (図 4) [6]. 磁石の上にこのデバイスを置き, その上に細胞が接着することのできない超低接着性細胞皿をのせて, RGD-MCL を培養皿に添加すると, RGD-MCL は設置した

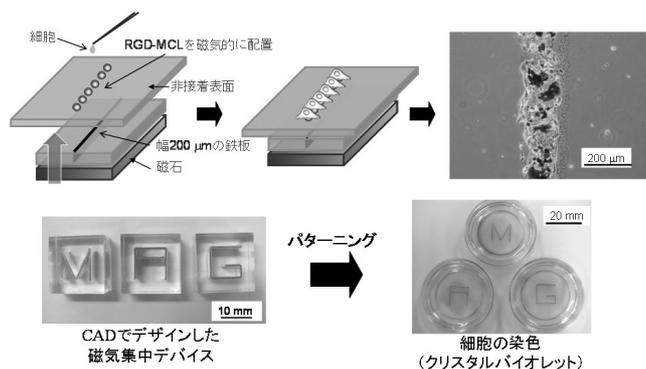


図4 RGD-MCLを用いた細胞のパターニング。磁石の上にパターン化した鉄板（線状やM・A・G字状）を置くことで、磁気を集中させる。RGD-MCLは磁気集中デバイスによって、超低接着性表面上にパターンニングされ、播種された細胞はRGD-MCLに接着して増えることで、細胞のパターニングを行うことができた。

磁石デバイスのパターンに沿って培養皿表面に並んだ。さらに細胞を添加すると、細胞は、培養皿には接着できないが、細胞接着ペプチドをもつRGD-MCLにだけ接着してパターンを形成した（図4）。RGD-MCLに接着した細胞は、細胞骨格が伸展し、細胞自身のフィブロネクチン発現量が増加していた。このことは、RGDペプチドが細胞のインテグリンを介してシグナル伝達を活性化していることを示唆している。これらの結果から、RGD-MCLは細胞のマイクロパターニングのみならず、細胞の骨格形成を誘導するバイオマニピュレーターとして応用できると期待される。

PEG-Magを用いた細胞のパターニング法[8]の概略を図5に示す。アレイ状にパターン化された磁石を用いてPEG-Magを培養表面でアレイ状に配置し、表皮角化細胞株HaCaT細胞を播種した。ここで、PEG-Magを配置した領域には細胞は接着できないことから、マスクとして使用することができた。細胞の接着後、磁石を外してPEG-Magを洗い流し、マウス筋芽細胞株C2C12細胞を播種することによって、二種類の細胞のパターン化共培養系の構築に成功した（図5）。また、磁力を用いた細胞のパターニングは培養表面を選ばないという利点があることから、細胞の単層培養上に別の細胞をパターンニングすることができるかを調べた。コンフルエントな単層のヒト表皮角化細胞株HaCaT細胞上に、パターン化磁石を用いてアレイ状にPEG-Magを配置し、マウス線維芽細胞株NIH3T3細胞を播種した。細胞の接着後、PEG-Magを取り除くことにより、単層の細胞上における異種細胞のパターニングに成功した。

5. 結 言

生体組織や臓器は三次元組織であることから、細胞は三次元的に配置させることで、より本来の性質に近づくと考えられる。さらに、構築した組織内の細胞の配置・配列を制御（パターニング）することは、さらなる高機能化につ

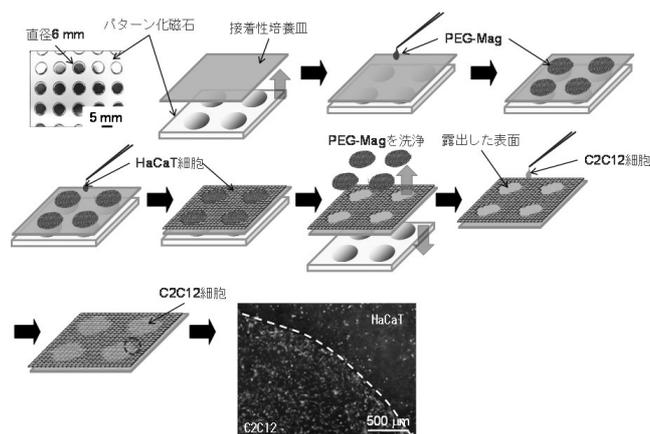


図5 PEG-Magを用いた細胞のパターニング。アレイ状のパターン化磁石を接着性培養表面の下に設置することで、PEG-Magをパターンニングした。そこに播種されたHaCaT細胞はPEG-Magでマスクされた場所以外に接着して増えることで、PEG-Magを洗浄するとHaCaT細胞のパターンを形成した。さらに露出した細胞培養表面にC2C12細胞を播種することで、共培養パターニングを行うことができた。

ながると考えられる。筆者らは現在、本稿で述べた三次元組織構築法と細胞のパターニング法を組み合わせ、磁力によって細胞を配置・配列しながら立体的に積み上げていくことで、従来のティッシュエンジニアリング技術では構築不可能な複雑な構造と機能をもつ器官構造を再構築することを目標に、Mag-TE法をいろいろな臓器再生に展開しつつある。

文 献

1. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T: Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* **100** (1): 1-11, 2005.
2. Dobson J: Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol.* **3** (3): 139-143, 2008.
3. Shinkai M, Yanase M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T: Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: in vitro study. *Jpn J Cancer Res.* **87** (11): 1179-1183, 1996.
4. Ito A, Hibino E, Shimizu K, Kobayashi T, Yamada Y, Hibi H, Ueda M, Honda H: Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **75** (2): 320-327, 2005.
5. Hersel U, Dahmen C, Kessler H: RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* **24** (24): 4385-43415, 2003.
6. Ito A, Ino K, Kobayashi T, Honda H: The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials.* **26** (31): 6185-6193, 2005.
7. Satomi T, Nagasaki Y, Kobayashi H, Otsuka H, Kataoka K: Density control of poly(ethylene glycol) layer to regulate cellular attachment. *Langmuir.* **23** (12): 6698-6703, 2007.
8. Akiyama H, Ito A, Kawabe Y, Kamihira M: Cell-patterning using PEG-modified magnetite nanoparticles. *J Biomed*

- Mater Res A. in press.
9. Yang J, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Kanzaki M, Sekine H, Shimizu T, Okano T: Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *J Control Release*. **116** (2): 193–203, 2006.
 10. Ito A, Hayashida M, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T: Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*. **10** (5–6): 873–880, 2004.
 11. Shimizu K, Ito A, Yoshida T, Yamada Y, Ueda M, Honda H: Bone tissue engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite nanoparticles and magnetic force. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. **82** (2): 471–480, 2007.
 12. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M: Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J*. **13** (14): 1883–1900, 1999.
 13. Ito A, Takizawa Y, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T: Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells. *Tissue Eng*. **10** (5–6): 833–840, 2004.
 14. Shimizu K, Ito A, Lee JK, Yoshida T, Miwa K, Ishiguro H, Numaguchi Y, Murohara T, Kodama I, Honda H: Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol Bioeng*. **96** (4): 803–809, 2007.
 15. Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H: Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*. **11** (9–10): 1553–1561, 2005.
 16. Ito A, Akiyama H, Kawabe Y, Kamihira M: Magnetic force based cell patterning using Arg-Gly-Asp (RGD) peptide-conjugated magnetite cationic liposomes. *J Biosci Bioeng*. **104** (4): 288–293, 2007.

井藤 彰 (イトウ アキラ)

2001 年名古屋大学大学院工学研究科博士課程後期課程修了 (工学博士)。2002 年名古屋大学大学院工学研究科助手。2006 年九州大学大学院工学研究院助教授。現在、九州大学大学院工学研究院准教授。磁性ナノ粒子を用いた医療分野への応用の研究、具体的には、がん温熱療法の開発と再生医療技術の開発を行っている。



所属学会：化学工学会，日本生物工学会，日本再生医療学会，日本癌学会等。