

課題番号	LR026
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	1細胞レベルで3次元構造を制御した革新的ヒト正常・疾患組織モデルの創製
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・大学院工学研究科・助教
氏名	松崎 典弥

1. 当該年度の研究目的

本研究では、①細胞積層技術とインクジェットプリント技術の融合による、1細胞レベルでの3次元組織化法の開発、②複数種類の細胞とタンパク質で構成したヒト正常および疾患組織モデルの構築、③作製した組織モデルの医薬品評価試験への応用、の3項目の達成を目的とする。前年度までに1細胞レベルでの3次元組織化法に関する基礎技術が確立できた。本年度は、本技術の更なる改善と、皮膚組織・肝組織・腫瘍組織モデルのプロトタイプ確立を目的とする。

2. 研究の実施状況

<1細胞レベルでの吐出精度の向上>

昨年度の課題は、「1細胞レベルの配置精度の向上」および「乾燥防止条件の最適化」であった。ある化合物を添加することで、両課題を解決することが可能であり、厳密に1個レベルには至っていないが、**1.6 ± 0.7 個**の精度で再現性良く細胞プリントすることが可能となった(図1)。昨年度の課題を克服し、1細胞レベルの細胞プリントの技術を確立することに成功した。

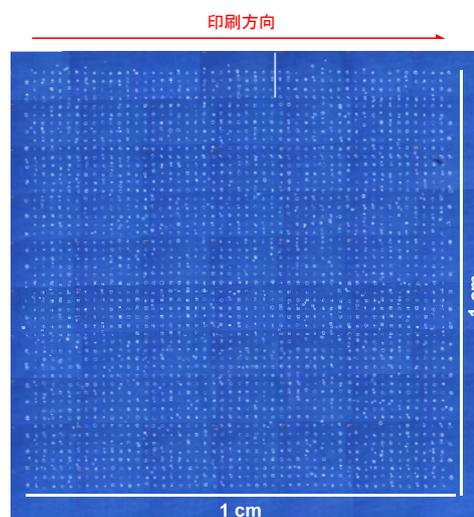


図1. ヒト皮膚由来線維芽細胞(NHDF)細胞を50列 x 50行=2,500個プリントした際の位相差顕微鏡写真。

<各組織モデルのプロトタイプの構築>

研究計画の予定通り各組織モデルのプロトタイプとして、「血管・リンパ管網を有する3次元皮膚モデル」、「血管網を有する3次元肝組織モデル」、「3次元腫瘍浸潤モデル」の構築に取り組んだ。以下、代表として皮膚モデルについて簡単に報告する。

「血管・リンパ管網を有する3次元皮膚モデル」

ヒト皮膚は、主に線維芽細胞とコラーゲンで構成される真皮層とケラチノサイト(KC)で構成される表皮層の二層構造を有し、毛細血管やリンパ管などの脈管構造が真皮層に附属器として存在し

様式19 別紙1

ている。そこで、昨年度までの研究成果である細胞集積法を用いてHUVECの毛細血管網を有する8層のNHDF構造を真皮層とし手構築した。その上部にKCを積層して分化誘導させることで、毛細血管網を有する3次元ヒト皮膚モデルを構築した(図2)。構築した皮膚モデルが、外部からの異物の侵入を防ぐ表皮層に特有の高いバリア性を有していることや、親水性薬物の透過性がヒト皮膚と同等であることが明らかとなった。さらに、本皮膚モデルは、2~3週間培養後においても機能や構造を安定に維持していることが確認され、既存の皮膚モデルと比較して長期間使用できる可能性が示唆された。

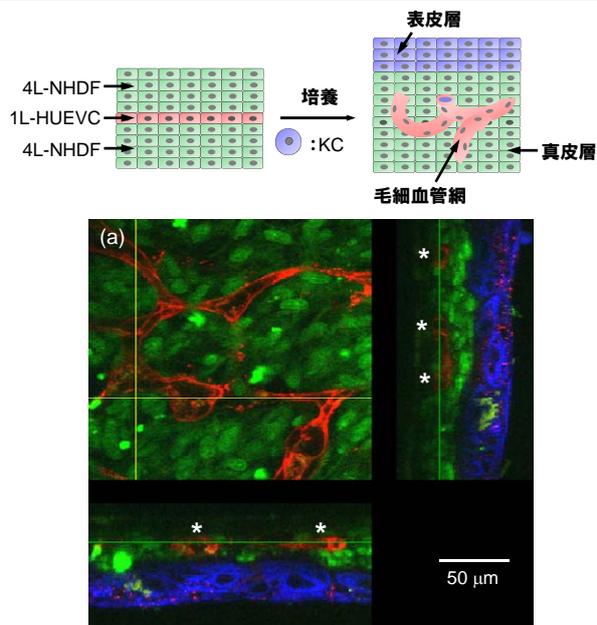


図2. 皮膚モデル構築のイメージ(上)と、構築した皮膚モデルの蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡観察結果(a)。HUVECはCD31抗体で(*印)、NHDFはセルトラッカーグリーン、KCはセルトラッカーブルーにて蛍光染色した。

<派生研究への展開>

派生研究として腸粘膜モデル、胎盤モデルについても引き続き研究を行った。その結果、胎盤モデルが生体の胎盤バリア構造と同様の性質を有していることが確認され、生理学的評価や薬剤評価に有効であることを見出した。腸粘膜モデルにおいても、毛細血管網を有した3次元組織体を構築し、高いバリア機能が3週間以上維持されることを見出した。

今後、他の組織・臓器モデルの構築へ展開する予定である。特に、iPS細胞由来の正常・疾患細胞を用いた3次元組織化および医薬品評価、移植応用へと研究を展開する予定である。

<国民との対話>

国民との科学・技術の対話を昨年度より活発に取り組むことができた。昨年度に引き続きサイエンスカフェを開催した(写真1)。また、「三次元生体組織構築公開シンポジウム~世界基準へのチャレンジ~」シンポジウムを主催し(写真2)、さらに、バイオインダストリー協会主催のセミナーで講演することで、ヒト組織モデル構築の社会的重要性や医療産業への貢献などを説明した。



写真1. サイエンスカフェの様子。

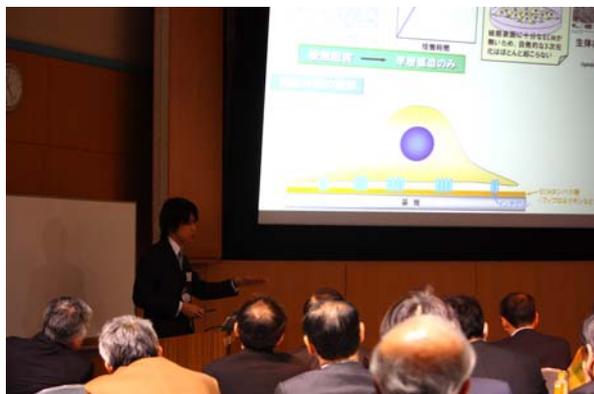


写真2. シンポジウムの様子。

＜研究内容の製品化＞

連携企業である住友ベークライト株式会社が、昨年度の研究成果で見出された「細胞集積法」を基に、2013年3月21日より、「細胞積層培養キット「CellFeuille」」の販売を開始した。

※住友ベークライト株式外社の細胞積層培養キット「CellFeuille」に関するHP

<http://www.sumibe.co.jp/product/s-bio/cell-culture/cellfeuille/index.html>



**細胞の3次元モデルによる試験・研究に
細胞積層培養キット “CellFeuille® (セルフィーユ)”**



特長

- (1)細胞積層化技術により生体組織モデルが構築できます。
- (2)プロトコルが簡単
 - ・基本的な細胞培養操作だけで実施可能。
- (3)異種細胞の組み合わせによる3次元培養も可能。

品番	品名	内容	参考価格(円)
BS-X5913	細胞積層培養キット CellFeuille®	・溶液A (4.4 mL) ・溶液B (25 mL) ・溶液C (8 mL) ・洗浄液 (60 mL) ・ステムフルR (5本) ・プロテオセーブR SS (5本)	70,000 (税込 73,500)

この製品は大阪大学大学院工学研究科 明石教授、松崎助教のご指導の下、開発した製品です。

SUMITOMO BAKELITE CO.,LTD.

＜まとめ＞

以上より、当該年度の目標はおおむね達成できたと考えられる。国民との対話にも積極的に取り組むことができた。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 10 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. H. Yoshida, M. Matsusaki, and M. Akashi, Multilayered Blood Capillary Analogs in Biodegradable Hydrogels for In Vitro Drug Permeability Assay, <i>Adv. Funct. Mater.</i> 23, 1736 (2013). (IF2011=10.179) Inside Cover Image に採用された。 2. M. Matsusaki, K. Sakaue, K. Kadowaki, M. Akashi, Three-dimensional Human Tissue Chips Fabricated by Rapid and Automatic Inkjet Cell Printing, <i>Adv. Healthcare Mater.</i> 2, 534 (2013). Frontispiece に採用された。 3. P. Chetprayoon, K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, Survival and Structural Evaluations of Three-Dimensional Tissues Fabricated by Hierarchical Cell Manipulation Technique, <i>Acta Biomaterialia</i> 9, 4698 (2012). 4. J. Sasaki, T. Matsumoto, H. Egusa, M. Matsusaki, A. Nishiguchi, T. Nakano, M. Akashi, S. Imazato, H. Yatani, In vitro reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct, <i>Integrat. Biol.</i>, 4, 1207 (2012). <p>(掲載済み一査読無し) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 松崎典弥, パニニー チャーパユーン, 西口昭広, 明石 満, 高分子ナノ薄膜を用いた細胞表面の制御に基づく細胞積層技術, 科学と工業, 大阪工研協会, 86(9), 318-324 (2012). 2. 松崎典弥, 門脇功治, 西口昭広, 明石 満, 細胞積層技術による生体外での血管モデルの構築と血管機能評価への応用, 日本生理学雑誌, 日本生理学会, 74(5), 250-251 (2012). 3. M. Matsusaki and M. Akashi, 3D-Human Tissue Chips Fabricated by Inkjet Cell Printing, <i>Journal of the Imaging Society of Japan</i>, Imaging Society of Japan, 51(5), 524-530 (2012). 4. 松崎典弥, 明石 満, セルフィーユ技術を利用した三次元組織構築, バイオマテリアル生体材料一, 日本バイオマテリアル学会, 30(3), 186-187 (2012). <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. S. Shinohara, T. Kihara, S. Sakai, M. Matsusaki, M. Akashi, M. Taya, and J. Miyake, Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, <i>J. Biosci. Bioeng.</i>, <i>accepted</i> (February 21, 2013). 2. A. Matsuzawa, M. Matsusaki, and M. Akashi, Effectiveness of Nanometer-sized Extracellular Matrix Layer-by-Layer Films Coated on Cell Membranes in Protecting the Cells from Physical Stress, <i>Langmuir</i>, <i>accepted</i> (October 22, 2012). Extracellular Matrix News 3.42 にてハイライトされた。
<p>会議発表 計 24 件</p>	<p>専門家向け 計 21 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 【招待講演】M. Matsusaki, M. Akashi, “Engineering Cell Manipulation for Tissue Engineering”, CIRP-BioM 2013, Tokyo, March 5, 2013. 2. 【招待講演】M. Matsusaki, A. Nishiguchi, M. Akashi, “Vascularized 3D-Tissue Models Fabricated by Cell Surface Coating Using Layer-by-Layer Nanofilms”, 2012 ISOMRM, Taipei, Taiwan, August 31, 2012. 3. 【招待講演】M. Matsusaki, A. Nishiguchi, M. Akashi, “Vascularized 3D-Tissue Models Constructed by Polymeric Nanofilms Coating on Cell Surfaces”, IUPAC-MACRO2012, Blacksburg, USA, June 26, 2012. 4. 【招待講演】M. Matsusaki, M. Akashi, “Cellular Multilayers as an Engineered Tissue Model Fabricated by Layer-by-Layer Assembly of Cells and Proteins”, CIMTEC 2012, Montecatini Terme, Italy, June 13, 2012. 5. 【若手招待講演】松崎典弥, 明石 満, “高分子ナノアッセムブリーによる新しい組織工学”, 第 61 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 2012 年 5 月 31 日 6. K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, “Development of Normal and Inflammatory Blood Vessel Models by Hierarchical Cell Manipulation”, 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, June 2, 2012. 7. M. Matsusaki, “Layer-by-Layer Assembly of Cells and Proteins toward Vascularized Human Tissue Models”, Seminar in MINATEC, Grenoble, France, June 18, 2012.

	<p>8. M. Matsusaki, A. Nishiguchi, M. Akashi, “3D-Vascularized Human Tissue Models for Drug Evaluation by Cell Surface Control Using Layer-by-Layer Nanofilms”, Nanobio Seattle, Seattle, USA, July 23, 2012.</p> <p>9. 松崎典弥、西口昭広、明石 満、“細胞集積法による脈管構造を有する三次元組織体の構築と腫瘍浸潤モデルへの応用”、第 61 回高分子討論会、名古屋工業大学、2012 年 9 月 12 日</p> <p>10. 松崎典弥、明石 満、“3D-Human Tissue Chips Fabricated by Inkjet Cell Printing”、第 22 回フットキング Imaging Today、東京工業大学すずかけホール、2012 年 11 月 15 日</p> <p>11. 松崎典弥、松本匡広、相馬剛至、西田幸二、明石 満、“コラーゲンを選択的に架橋する生分解性超分子ナノ粒子を用いた革新的角膜再生医療技術の創製”、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター、2012 年 11 月 27 日</p> <p>12. 松崎典弥、明石 満、“高分子ナノ薄膜を用いた培養界面制御による組織形成”、生物工学フォーラム「細胞工学に資する培養界面の制御技術」、早稲田大学、2012 年 12 月 4 日</p> <p>13. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, “Fabrication of 3D-Cell Chips by Layer-by-Layer Technique”, IPC2012, Kobe, December 14, 2012.</p> <p>14. M. Matsusaki, M. Akashi, “Design of Drug Delivery Nano-Carriers Using Artificial 3D-Human Tissue Models”, JST-MaxPlanck German-Japan International Workshop, Berlin, Germany, January 9, 2013.</p> <p>15. 松崎典弥、明石 満、“ナノバイオテクノロジーによる三次元組織の創製”、第 7 回ナノ・バイオメディカル学会大会、京都テルサ、2013 年 1 月 24 日</p> <p>16. 松崎典弥、明石 満、“工学的手法による立体臓器の創製とその産業応用”、第 3 回医薬・バイオ応用を目指した高分子ナノ構造研究会、富山県ものづくり研究開発センター、2013 年 2 月 1 日</p> <p>17. 松崎典弥、明石 満、“細胞プリントによるヒト組織チップの可能性”、2012 年度印刷・情報記録・表示研究会講座、産総研臨海副都心センター、2013 年 2 月 4 日</p> <p>18. M. Matsusaki, M. Akashi, “Control of Cell Membrane Interfaces Using Polymer/Protein Nanofilms for Tissue Engineering Applications”, CRC International Symposium, Hokkaido University, Hokkaido, February 6, 2013.</p> <p>19. M. Matsusaki, “In Vitro Creation of 3D-Human Tissue Models”, International Workshop on BInterface Engineering 2013, Okayama University, March 13, 2013.</p> <p>20. 松崎典弥、明石 満、“工学的細胞操作に基づく血管・リンパ管網を有する三次元組織の構築”、第 12 回日本再生医療学会総会 パネルディスカッション 7、パシフィコ横浜、2013 年 3 月 23 日</p> <p>21. 松崎典弥、吉海 卓、松澤篤史、明石 満、“交互積層ナノ薄膜による細胞機能の制御”、日本化学会第 93 春季年会、立命館大学、2013 年 3 月 24 日</p> <p>一般向け 計 3 件</p> <p>1. 松崎典弥、“続・プリンターで、細胞を、生きたまま印刷する!”、カフェ・オンザエッジ・ネクスト、アートエリア B1、2012 年 11 月 21 日</p> <p>2. 松崎典弥、“細胞積層法・細胞集積法による新しい三次元組織構築”、三次元生体組織構築公開シンポジウム～世界基準へのチャレンジ～、日本化学会化学会館ホール、2012 年 11 月 28 日</p> <p>3. 松崎典弥、“3 次元生体組織構築の基本技術および応用技術”、iPS 細胞の産業化に向けてー3 次元生体組織の構築と創薬および再生医療への応用ー、バイオインダストリー協会会議室、2013 年 3 月 18 日</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>1. T. Serizawa, M. Akashi, M. Matsusaki, H. Ajiro, T. Kida, LbL Assemblies Using van der Waals or Affinity Interaction and Their Applications, <i>G. Decher and J. Schlenoff Eds., Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, 2nd Edition</i> (Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany), 99-133 (2012).</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 5 件</p>	<p>(取得済み) 計 1 件</p> <p>1. 特許第 5130376 号 発明者：松崎典弥・明石 満・岡野和宣 発明の名称：三次元細胞培養体の生体シグナルの検出方法及び検出キット 出願人：独立行政法人科学技術振興機構 登録日：2012 年 11 月 9 日 (国内)</p> <p>(出願中) 計 4 件</p> <p>1. 出願番号：特願 2012-203154 発明者：明石 満・松崎典弥・松澤篤史 発明の名称：三次元細胞培養体の製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学・三菱製紙株式会社 出願日：2012 年 9 月 14 日</p>

様式19 別紙1

	<p>(国内)</p> <p>2. 出願番号：特願 2012-194398 発明者：明石 満・松崎典弥・縄野政彰・橋本公二・白方祐司 発明の名称：人工皮膚モデルの製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学・株式会社ビーエムティーハイブリッド・国立大学法人愛媛大学 出願日：2012年9月4日 (国内)</p> <p>3. 出願番号：特願 2012-180627 発明者：明石 満・松崎典弥・松浦宏治 発明の名称：被覆細胞の製造方法、及び細胞の三次元構造体の製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学 出願日：2012年8月16日 (国内)</p> <p>4. 出願番号：特願 2012-107879 発明者：明石 満・松崎典弥・松澤篤史 発明の名称：物理的負荷への耐性が向上した細胞の製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学・三菱製紙株式会社 出願日：2012年5月9日 (国内)</p>
Webページ (URL)	<p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>1. 一般市民向けのサイエンスカフェを開催し、研究内容を紹介した。 「続・プリンターで、細胞を、生きたまま印刷する！」 開催日：2012年11月21日 場所：カフェアートエリア B1 なにわ橋駅地下1階コンコース 参加人数：43名 http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/ura/activity/dialogue/20121121.html</p> <p>2. 一般市民も参加可能な公開シンポジウム“三次元生体組織構築公開シンポジウム～世界基準へのチャレンジ～”を主催し、講演を行った。 「細胞積層法・細胞集積法による新しい三次元組織構築」 開催日：2012年11月28日 場所：日本化学会 化学会館ホール 参加人数：130名 日本薬剤学会（共催）HP：http://www.apstj.jp/associated/symposium20121128/view</p> <p>3. 一般市民も参加可能な公開セミナー“iPS 細胞の産業化に向けてー3次元生体組織の構築と創薬および再生医療への応用ー”にて講演した。 「3次元生体組織構築の基本技術および応用技術」 開催日：2013年3月18日 場所：バイオインダストリー協会会議室 参加人数：74名 http://www.jba.or.jp/pc/activities/tip_biotechnology/info/000847.html</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	<p>1. Nature Japan より取材を受け、HPの特集記事に本研究内容が紹介された。 「生体に近い3次元構造組織の構築に向け、細胞の積層や集積を制御する」 掲載日：2013年3月28日 URL: http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/tokushu/detail/285</p>
その他	<p><研究成果の製品化> 連携企業である住友ベークライト株式会社が、昨年度までの研究成果で見出された「細胞集積法」を基に、2013年3月21日より、「細胞積層培養キット「CellFeuille」」の販売を開始した。 ※住友ベークライト株式外社の細胞積層培養キット「CellFeuille」に関するHP http://www.sumibe.co.jp/product/s-bio/cell-culture/cellfeuille/index.html</p>

様式19 別紙1

	<p>昨年度の報告書に記載できていなかった取得および出願中の産業財産権があったため、以下に記載する。</p> <p>(取得済み) 計1件</p> <p>1. US Patent No. 8137964 発明者：Mitsuru Akashi, Yoshiki Sawa, <u>Michiya Matsusaki</u>, Yoshio Nakahara 発明の名称：Method of producing three-dimensional tissue and method of producing extracellular matrix used in the same comprising protein or polymer having an RGD sequence 出願人：国立大学法人大阪大学・住友ベークライト株式会社 登録日：2012年3月20日 (外国)</p> <p>(出願中) 計1件</p> <p>1. 出願番号：PCT/JP2012/058329 発明者：明石 満・<u>松崎典弥</u>・佐倉武司・橋本公二・白方裕司・平川聡史 発明の名称：人工皮膚モデルの製造方法、及び人工皮膚モデル 出願人：国立大学法人大阪大学・住友ベークライト株式会社・国立大学法人愛媛大学 出願日：2012年3月29日 (外国)</p>
--	---

4. その他特記事項

特になし。

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	107,000,000	58,725,000	24,353,000	23,922,000	0
間接経費	32,100,000	17,617,500	7,305,900	7,176,600	0
合計	139,100,000	76,342,500	31,658,900	31,098,600	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	64,039	24,353,000	0	24,417,039	24,014,200	402,839	0
間接経費	8,158,243	7,305,900	0	15,464,143	8,917,105	6,547,038	0
合計	8,222,282	31,658,900	0	39,881,182	32,931,305	6,949,877	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	13,127,473	凍結マイクローム 他
旅費	4,226,219	学会、シンポジウムへの参加 他
謝金・人件費等	2,238,965	人材派遣 他
その他	4,421,543	学会参加費 他
直接経費計	24,014,200	
間接経費計	8,917,105	
合計	32,931,305	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
凍結マイクローム	CM1850	1	3,570,000	3,570,000	2012/8/31	大阪大学
ガス混合装置	MIGM/OL-2	1	800,000	800,000	2012/4/12	大阪大学