

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 25 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

最終年度である本年度は、研究目的の達成に向けて残されている以下の課題、①1細胞レベルでの3次元組織作製法の確立、②血管網を有する3次元肝組織モデルの構築、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した。

2. 研究の実施状況

＜①1細胞レベルでの3次元組織作製法の確立＞
 昨年度までの検討で、1細胞レベルの吐出制御はほぼ達成できた。しかし、実際に細胞の配置を制御して具体的な組織構造を構築するには至っていなかった。これは、吐出した細胞が接着・伸展後に移動することが原因であった。
 この課題を解決するため、細胞と一緒に吐出する細胞外マトリックス成分を検討した結果、細胞の配置を制御したまま接着・伸展させることが可能であった。図 1 に示すように、例えば血管内皮細胞を格子状に配置制御して作製した毛細血管網を 20 日間培養後も維持できた。以上より、昨年度までの課題を克服し、**1細胞レベルでの3次元組織作製の基礎技術を確立することに成功した。**

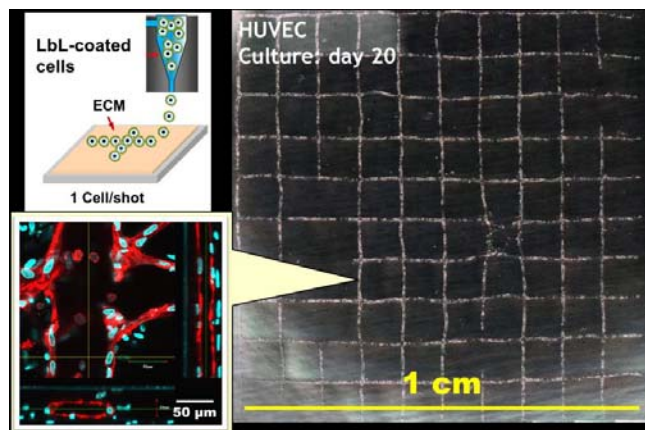


図 1.1 細胞プリントで作製したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の格子構造のイメージ (左上) と 20 日間培養後の位相差顕微鏡写真 (右)、CD31 抗体による蛍光免疫染色の共焦点レーザー顕微鏡イメージ (左下)。

様式19 別紙1

<②血管網を有する3次元肝組織モデルの構築>

これまでの検討より、ヒト初代肝細胞はデリケートな細胞であるため、薄膜作製時の遠心分離によるダメージが生じ、3次元組織構築が困難であった。そこで、遠心分離を使用しない新しいECMコーティング手法を考案した（特許出願済み）。これにより、ヒト初代肝細胞の10層組織を構築可能であり、に、HUVECや他の細胞を混合することで、少し未熟ではあるが毛細血管網の構築が可能であった。今後、薬剤代謝活性などの機能を評価していく予定である。

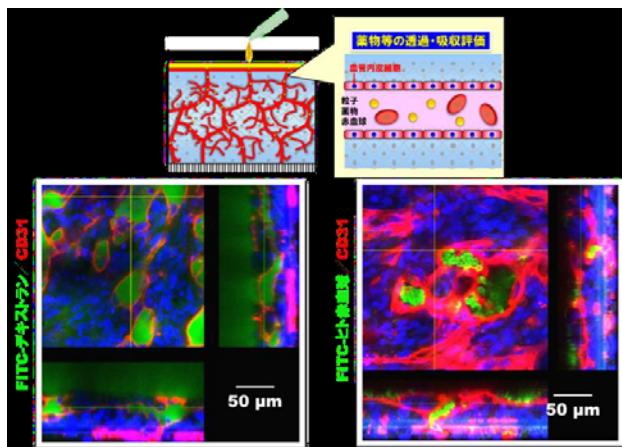


図2.開口構造を有する毛細血管網へ注入したFITC-デキストラン（左）とFITC-ヒト赤血球（右）のCD31抗体で蛍光免疫染色した血管網への局在を示す共焦点レーザー顕微鏡イメージ。

<③作製した組織モデルの医薬品評価試験への応用>

作製した毛細血管網を有する3次元組織モデルを医薬品の評価へ応用するためには、毛細血管網へ溶液や細胞、微粒子などを注入する必要がある。しかし、これまでの血管網は末端が閉じた構造をしており、外部からの注入は困難であった。そこで、HUVEC層を最表・下面に追加することで、表面および下面に開口構造を有する毛細血管網が構築可能であり、蛍光ラベル化モデル薬剤やヒト赤血球などを表面から注入し、下面より排出させることに成功した（図2）また、結腸癌細胞を開口部より注入した癌転移モデルに、抗癌剤ゲムシュタビンを滴下することで、1週間後の腫瘍体積が有意に低下することを見出した（図3）。以上より、これまでの課題を克服し、医薬品評価試験への初期応用を達成することができた。

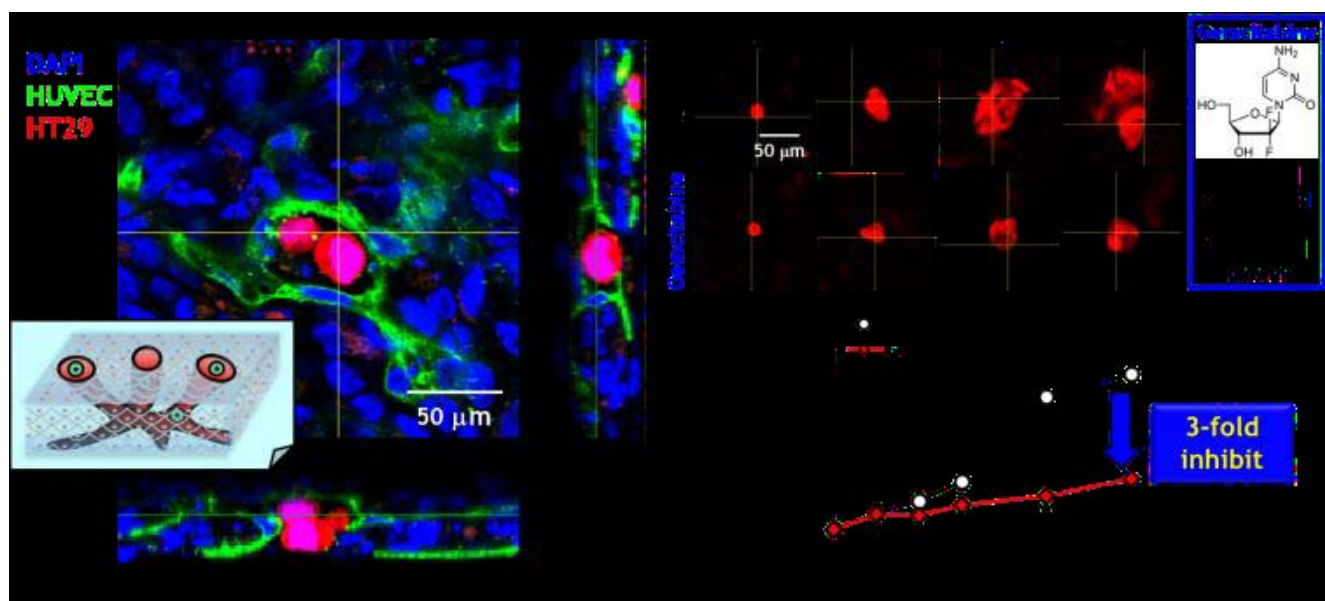


図 3.開口構造を有する毛細血管網へ注入した RFP 発現-HT29 結腸癌細胞（左）と培養に応じた体積変化への抗癌剤の効果の共焦点レーザー顕微鏡イメージ（右上）と定量化グラフ（右下）。

<まとめ>

昨年同様、派生研究にも積極的に取り組むことで、例えばヒト **iPS** 細胞由来心筋 **3** 次元組織体の構築と薬効試験への応用やマウス **ES** 細胞由来 **3** 次元ペースメーカー組織の作製（日刊工業新聞 2014 年 3 月 19 日 1 面掲載）が可能であった（国内・外 **52** 研究機関と共同研究を展開）。また、サイエンスカフェや高校生への講演・出前講義を通して、国民との対話にも積極的に取り組むことができた。

以上より、当該年度の目標は達成できたと考えられる。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 3 件
計 11 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, Y. Asano, H. Shimoda, M. Akashi, Effects of Angiogenic Factors and 3D-Microenvironments on Vascularization within Sandwich Culture, <i>Biomaterials</i> 35, 4739 (2014). 2. R. Ishiwata, U. Yokoyama, Y. M. Matsusaki, Y. Asano, K. Kadowaki, Y. Ichikawa, M. Umemura, T. Fujita, S. Minamisawa, H. Shimoda, M. Akashi, Y. Ishikawa, Three-dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular Elastic Fiber Formation Studies, <i>Atherosclerosis</i> 233, 590 (2014). 3. M. Matsumoto, M. Matsusaki, M. Akashi, Preparation of Biodegradable Peptide Nanospheres with Hetero PEG Brush Surfaces, <i>Macromol. Biosci.</i> 42, 142-150 (2014). <p>(掲載済み一査読無し) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 松崎典弥, 日本バイオマテリアル学会第8回関西若手研究発表会, バイオマテリアル-生体材料-, 日本バイオマテリアル学会, 32(1), 51 (2014). 2. 松崎典弥, 明石 満, 生体高分子薄膜を用いた細胞表面の修飾による三次元組織体の構築, <i>化学と教育</i>, 62(2), 64-67 (2014).

様式19 別紙1

	<p>3. 松崎典弥, 明石 満, 生体高分子薄膜による細胞表面の機能制御と三次元組織体の構築, 表面, 広信社, 51(4), 159-169 (2014).</p> <p>4. 西口昭広, 松崎典弥, 明石 満, Layer by Layer 細胞コーティング法~マテリアル技術からのアプローチ~, バイオインダストリー, シーエムシー出版, 31(1), 28-36 (2014).</p> <p>5. 松崎典弥, 本物の毛細血管網ができた?, 化学, 化学同人, 68(7), 64-65 (2013).</p> <p>(未掲載) 計 3 件</p> <p>1. M. Matsusaki and M. Akashi, Control of Extracellular Microenvironments Using Polymer/Protein Nanofilms for Development of Three-dimensional Human Tissue Chips, Polymer J., accepted (February 17, accepted). Invited Focus Review に採択された。</p> <p>2. Y. Asano, A. Nishiguchi, D. Okano, T. Fujita, E. Saito, M. Matsusaki, M. Akashi, H. Shimoda, Ultrastructure of Blood and Lymphatic Vascular Networks in Three-dimensional Cultured Tissues Fabricated by ECM nanofilm-based Cell Accumulation Technique, Microscopy, accepted (January 21, 2014).</p> <p>3. M. Matsusaki, C. P. Case, M. Akashi, Three-dimensional Cell Culture Technique and Pathophysiology, Adv. Drug Deliv. Rev., accepted (January 15, 2014). (IF2012=12.888)</p>
<p>会議発表 計 19 件</p>	<p>専門家向け 計15件</p> <p>1. 【招待講演】 M. Matsusaki, M. Akashi, “Control of Cell Surface Microenvironments by LbL Nanofilms for development of 3D-Human Tissue Models”, NanoKorea2013, Korea, July 10, 2013.</p> <p>2. 【招待講演】 松崎典弥、明石満、“高分子化学に基づく細胞操作と三次元生体組織モデルの創製”、第80回高分子若手研究会 [関西]、関西セミナーハウス、2013年7月27日</p> <p>3. 【招待講演】M. Matsusaki, M. Akashi, “3D-Vascularized Human Tissue Models Constructed by Cell Surface Control Using Nano-Meter Sized ECM Films”, 4thSynthetic Immunology Workshop “Engineering in Immunity”, Kyoto, November 14, 2013.</p> <p>4. 【招待講演】 松崎典弥、明石満、“積み木の化学ー細胞の集合・組織化の制御と人工組織体の構築”、平成25年度九州地区高分子若手研究会・冬の講演会、ブルーウェーブイン鹿児島、2013年12月12日</p> <p>5. 【基調講演】 松崎典弥、明石満、“化学的細胞操作と細胞プリンティングによる三次元生体組織チップの創製”、日本金属学会2014年春期大会、東工大、2014年3月22日</p> <p>6. M. Matsusaki, T. Yoshikai, A. Matsuzawa, M. Akashi, “Protection and Functionalization of Cell Surfaces Using Nano-Barrier Films”, SFB2014 Annual Meeting, Boston, 2013年4月10日</p> <p>7. 松崎典弥、明石満、“ナノおよびマイクロ薄膜コーティングによる細胞の三次元組織化制御の創製”、第62回高分子討論会、金沢大学、2013年9月12日</p> <p>8. 松崎典弥、明石満、“ナノ薄膜コーティングによる細胞膜表面の機能制御と三次元ヒト組織モデルの創製”、サントリー生命科学財団生有研セミナー、サントリー研究センター、2013年8月21日</p> <p>9. 松崎典弥、明石満、“化学的細胞操作に基づく三次元生体組織構築”、日本化学会関東支部講演会「再生医療と化学」、化学会館、2013年9月18日</p> <p>10. M. Matsusaki, M. Akashi, “3D-Human Tissue Chips Fabricated by Rapid and Automatic Inkjet Cell Printing for Drug Assessments”, 12thUS-Japan Symposium on DDS, Hawaii, 2013年12月16日</p> <p>11. 松崎典弥、明石満、“動物実験の代替を目指した工学的な三次元組織構築”、日本動物実験代替法学会第26回大会、京都テルサ、2013年12月20日</p> <p>12. 松崎典弥、明石満、“工学的細胞操作による創薬研究のための三次元ヒト生体組織体の構築”、第13回日本再生医療学会総会シンポジウム、国立京都国際会館、2014年3月4日</p> <p>13. 松崎典弥、明石満、“細胞積層・集積法で構築した三次元生体組織の創薬分野への応用”、武田薬品</p>

様式19 別紙1

	<p>工業基盤技術研究所講演会、武田薬品工業湘南研究所、2014年3月5日</p> <p>14. 松崎典弥、明石満、“血管・リンパ管網を持つ組織の構築：バイオマテリアルによる取り組み”、第13回日本再生医療学会総会シンポジウム、国立京都国際会館、2014年3月6日</p> <p>15. 松崎典弥、明石満、“細胞集積法により構築した灌流可能な三次元ヒト毛細血管組織による生体外での物質透過性評価”、日本化学会第94春季年会、名古屋大学、2014年3月26日</p> <p>一般向け 計4件</p> <p>1. 松崎典弥、明石満、“プリンターで臓器モデルをつくる：細胞積層技術”、ライフサイエンスセミナー：研究者と語ろう、エル・おおさか、2013年7月30日</p> <p>2. 松崎典弥、明石満、“細胞積層化による3次元組織構築”、第21回大阪大学医工情報連携シンポジウム、大阪大学、2013年9月18日</p> <p>3. 松崎典弥、明石満、“領域の垣根を越えて（医工連携）：化学的細胞操作技術によるヒト臓器モデルの構築”、鹿児島県立鹿児島鶴丸高等学校出前講義、鹿児島県立鹿児島鶴丸高等学校、2013年10月23日</p> <p>4. 松崎典弥、明石満、“細胞を並べて積み重ねる話の第三話”、カフェ・オンザエッジ・ネクスト、うめきた・グランフロント大阪北館1階ナレッジキャピタルカフェラボ、2014年1月27日</p>
<p>図書 計5件</p>	<p>1. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, The Potential Use of Three-Dimensional Cellular Multilayers as a Blood Vessel Model, <i>M. Matsusaki, T Akagi and M. Akashi Eds., Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application</i>(Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany), (2014), <i>in press</i>.</p> <p>2. 吉田裕安材, 松崎典弥, 明石満, 5-2-10 ハイドロゲルテンプレート法による培養細胞と細胞外マトリックスから構成された三次元組織の構築—合成物フリーな三次元組織体の構築法—, <i>バイオマテリアル研究の最前線</i>, 日本金属学会, <i>in press</i>.</p> <p>3. M. Matsusaki, M. Akashi, LbL Nanofilms through Biological Recognition for 3D-Tissue Engineering, <i>C. Picart, F. Caruso and J.-C. Voegel Eds., Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials</i>(Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany), (2014), <i>in press</i>.</p> <p>4. M. Matsusaki, M. Akashi, Cell Surface Engineering Using a Layer-by-Layer Nanofilm for Biomedical Applications, <i>R. F. Fakhrullin, I. S. Choi and Y. M. Lvov Eds., Cell Surface Engineering: Fabrication of Functional Nanoshells</i>(RSC Publishing, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 0WF, UK), (2014), <i>in press</i>.</p> <p>5. 松崎典弥, 明石満, 第3編第5章細胞積層組織チップへの応用, <i>2014インクジェット技術大全</i>, 電子ジャーナル, 59-63 (2014).</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計8件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計8件</p> <p>1. 出願番号：特願2013-245261 (国内)</p> <p>発明者：明石満・松崎典弥</p> <p>発明の名称：三次元組織体及びその製造方法</p> <p>出願人：国立大学法人大阪大学</p> <p>出願日：2013年11月27日</p> <p>2. 出願番号：特願2013-236046 (国内)</p> <p>発明者：明石満・松崎典弥</p> <p>発明の名称：コラーゲンを含む被膜でコートされた細胞及びその製造方法</p>

様式19 別紙1

	<p>出願人：国立大学法人大阪大学 出願日：2013年11月14日 3. 出願番号：特願2013-212966（国内） 発明者：明石満・松崎典弥・石川義弘・横山詩子 発明の名称：三次元組織体及びその製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学・公立大学法人横浜市立大学 出願日：2013年10月10日 4. 出願番号：特願2013-173745（国内） 発明者：明石満・松崎典弥・澤芳樹・宮川繁 発明の名称：薬剤候補化合物のスクリーニングに用いる心筋組織チップの製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学 出願日：2013年8月23日 5. 出願番号：特願2013-173742（国内） 発明者：明石満・松崎典弥・伊藤浩・中村一文・斎藤幸弘 発明の名称：ペースメーカー組織体の製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学・岡山大学 出願日：2013年8月23日 6. 出願番号：PCT/JP2013/74743（外国） 発明者：明石満・松崎典弥・松澤篤史 発明の名称：三次元培養体の製造方法 出願人：国立大学法人大阪大学・三菱製紙株式会社 出願日：2013年9月13日 7. 出願番号：PCT/JP2013/73833（外国） 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：人工皮膚組織、人工皮膚モデル及びそれらの製造方法 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：2013年9月4日 8. 出願番号：PCT/JP2013/072024（外国） 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：2013年8月16日</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<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>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1. 第6回高校生事業「ライフサイエンスセミナー：研究者と語ろう」にて、高校生・教師に研究内容を紹介した。 「プリンターで臓器モデルをつくる：細胞積層技術」 開催日：2013年7月30日</p>

様式19 別紙1

	<p>場所：エル・おおさか709号室</p> <p>参加人数：68名</p> <p>http://www.senri-life.or.jp/school/school-2-kako.html</p> <p>2. 大阪府立豊中等高等学校の高校生に研究室および研究内容を紹介した。 「大阪府立豊中等学校SSH見学」</p> <p>開催日：2013年7月31日</p> <p>場所：大阪大学吹田キャンパス産学連携本部D棟3階「松崎研究グループ 生体組織モデル創製」</p> <p>参加人数：11名</p> <p>https://www.osaka-c.ed.jp/blog/toyonaka/toyo1/2013/07/30-031611.php</p> <p>3. 鹿児島県立鹿児島鶴丸高等学校の出前講義にて、研究内容を紹介した。 「領域の垣根を越えて（医工連携）：化学的細胞操作技術によるヒト臓器モデルの構築」</p> <p>開催日：2013年10月23日</p> <p>場所：鹿児島県立鹿児島鶴丸高等学校28R教室</p> <p>参加人数：48名</p> <p>4. 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。 「細胞を並べて積み重ねる話の第三話」</p> <p>開催日：2014年1月27日</p> <p>場所：うめきた・グランフロント大阪北館1階ナレッジキャピタルカフェラボ</p> <p>参加人数：約30名</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計1件</p>	<p>1. 「阪大など、ES細胞で拍動促す“ペースメーカー”組織作製」、2014年3月19日、日刊工業新聞1面 http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020140319aaas.html</p>
<p>その他</p>	<p><NHKでの全国放送および関西地区放送></p> <p>1. 「NHK情報まるごとiPS細胞研究最前線②」にて細胞積層技術が全国放送された、2014年1月8日。</p> <p>2. 「NHKニューステラス関西iPS細胞特集②」にて細胞積層技術が関西地区放送された、2013年12月10日。</p> <p><平成26年度科学技術分野の文部科学大臣表彰受賞></p> <p>「脈管構造を有する三次元ヒト生体組織モデルの研究」にて文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞予定（受賞内定：平成26年3月）。</p> <p>※文部科学省の関連HP http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/26/04/1346090.htm</p> <p>※大阪大学の関連HP http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/topics/2014/04/20140408_01</p> <p><日本化学会第94春季年会のハイライトに選定された></p> <p>「交互積層ナノ薄膜形成によるES/iPS細胞由来三次元バイオペースメーカー組織の構築」の発表が日本化学会第94春季年会のハイライト講演に選定され、記者会見を行った、2013年3月12日。</p> <p><学会および研究会のオーガナイズ></p> <p>1. 「35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society」のTheme 7, Track 7.2セッションの共同オーガナイザーを務めた、2013年7月4日。</p> <p>2. 「日本バイオマテリアル学会第8回関西若手研究発表会」の世話人を務めた、2013年8月31日。</p>

様式19 別紙1

4. その他特記事項

特になし。

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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	83,078,000	23,922,000	0	
間接経費	32,100,000	24,923,400	7,176,600	0	
合計	139,100,000	108,001,400	31,098,600	0	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	402,839	23,922,000	254,100	24,578,939	24,578,939	0	
間接経費	6,547,038	7,176,600		13,723,638	13,723,638	0	
合計	6,949,877	31,098,600	254,100	38,302,577	38,302,577	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	10,632,988	リトラーム 他
旅費	3,377,118	学会、シンポジウムへの参加 他
謝金・人件費等	6,111,755	人材派遣 他
その他	4,457,078	学会参加費 他
直接経費計	24,578,939	
間接経費計	13,723,638	
合計	38,302,577	

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
リトラーム	大和光機製 REM-710-SB	1	999,600	999,600	H25. 4.30	大阪大学
超純水製造装置	メルク社製 Direct-Q UV5	1	661,500	661,500	H25. 6. 4	大阪大学
ダクトレスヒューム フード	オリエンタル技研 製 OS321S	1	745,500	745,500	H26. 1.14	大阪大学