

水位差灌流によって生存率を 改善した三次元細胞培養技術

北海道大学 大学院先端生命科学研究院
先端融合科学研究部門

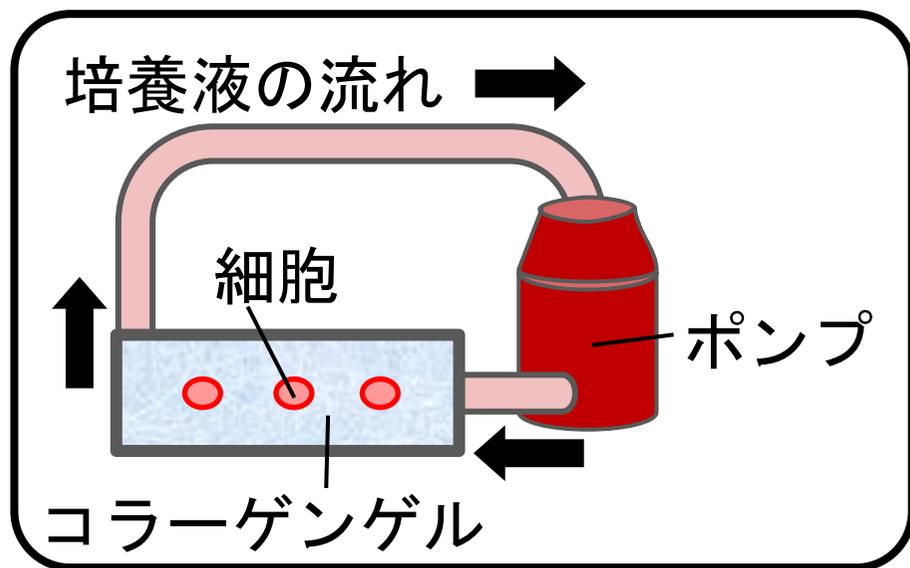
石原 誠一郎、芳賀 永、石原 すみれ

2022年10月4日

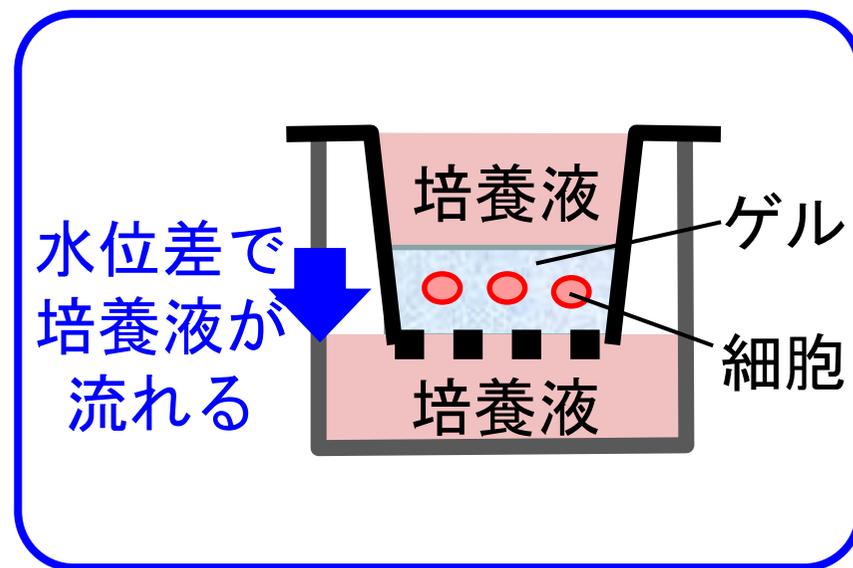
本技術の概要

生体組織を模倣した新規細胞培養システムの創製

従来の灌流培養法：
ポンプを使うため大掛かり



本課題の灌流培養法：
ポンプが不要でスケールダウン可能



簡易化

Tan et al., Biomedical Microdevices, 2003



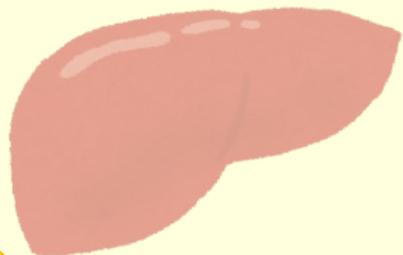
簡便・スケールダウン可能で

「栄養供給が可能」な細胞培養システムを創製し、
産業応用（再生医療、薬剤・健康食品開発）を目指す。

背景

既存の培養技術は生体内を模倣する点で不十分である。

<実際の組織>



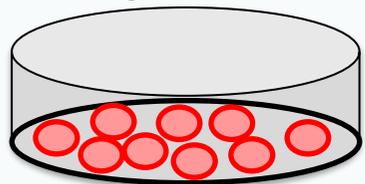
- ・ 厚みがある
- ・ 中心部には血管により栄養が届けられる



既存の足場には、**中心部への栄養の輸送**に大きな課題がある。

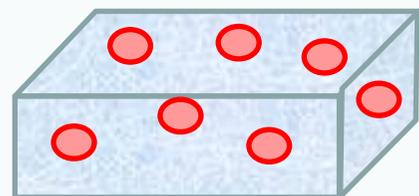
<既存の細胞培養法>

プラスチック
ディッシュ



- ・ 最も一般的な培養法である
- ・ 底面のみに細胞が接着するため、
基本的には一層の細胞しか培養できない（厚みがない）

コラーゲンゲル



- ・ 立体的（三次元的）な培養が可能である
- ・ **栄養が中心部まで届かないため、厚みをもった培養ができない**

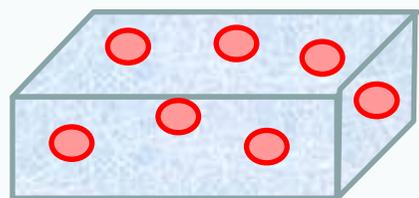
立体的な
培養法の登場

目的

生体組織を模倣した新規細胞培養システムの創製

＜既存の細胞培養法＞

コラーゲンゲル

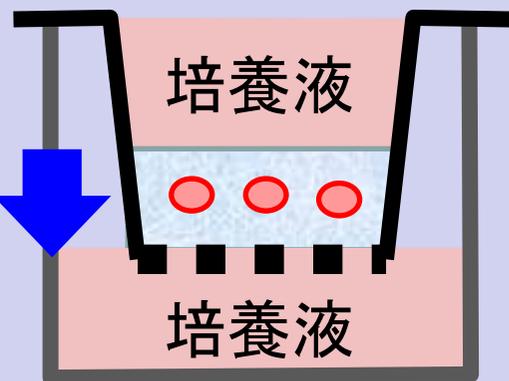


- ・ 立体的(三次元的)な培養が可能である
- ・ 栄養が中心部まで届かないため、厚みをもった培養ができない

↓ 課題を解決

＜本プロジェクトでつくる細胞培養法＞

水位差で
培養液が
流れる

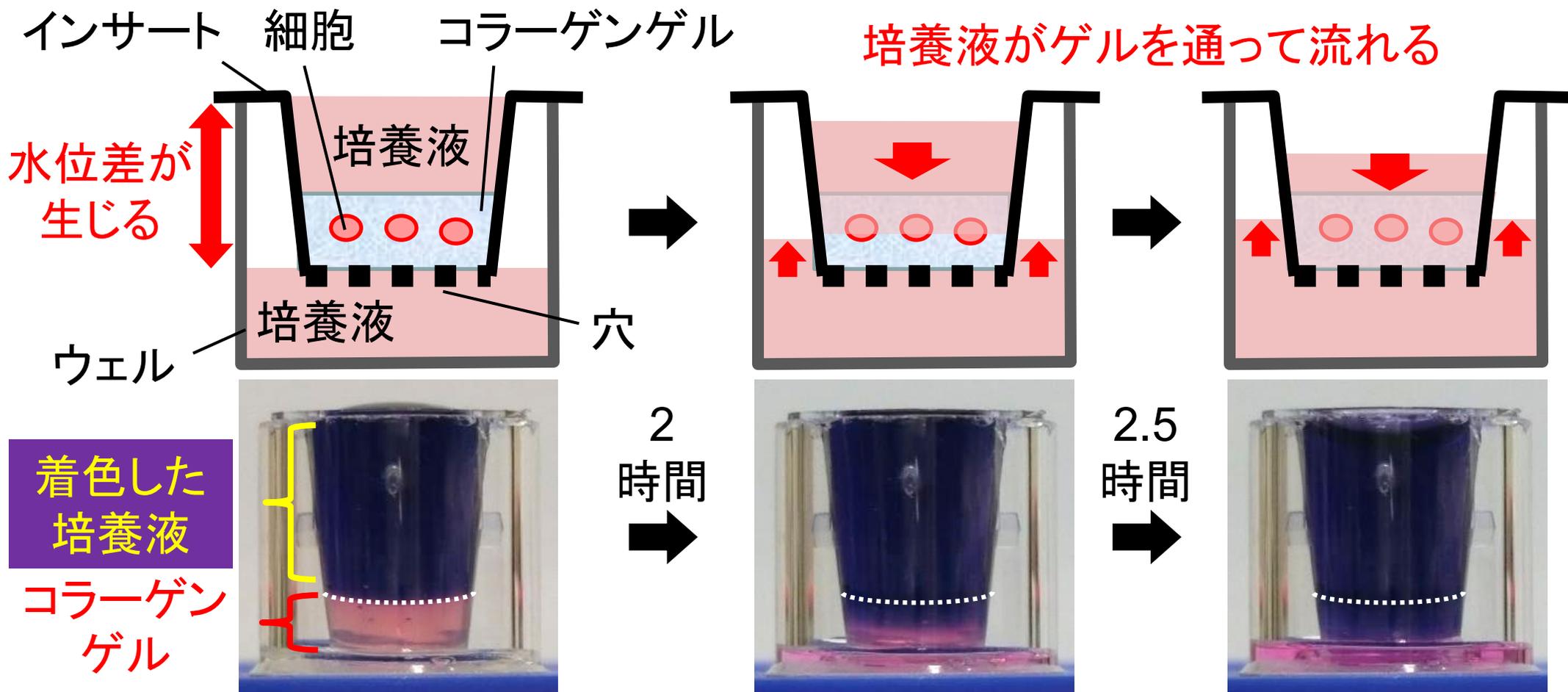


- ・ 立体的(三次元的)な培養が可能である
- ・ 水位差により栄養供給が可能である

「栄養供給が可能」な細胞培養システムを創製し、
産業応用（再生医療、薬剤・健康食品開発）を目指す。

これまでの成果

三次元水位差灌流培養法を確立

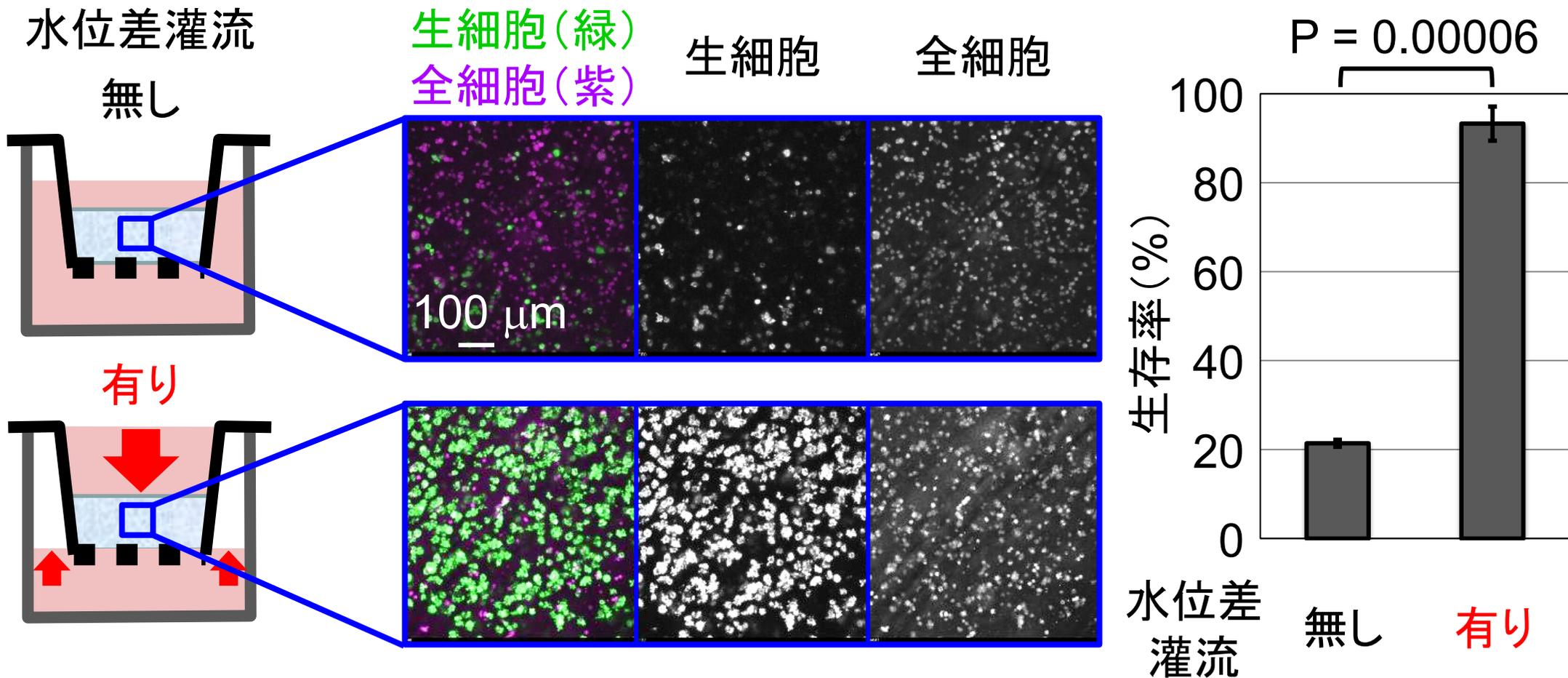


コラーゲンゲル中に培養液を流すことに成功した。

これまでの成果

生存率評価

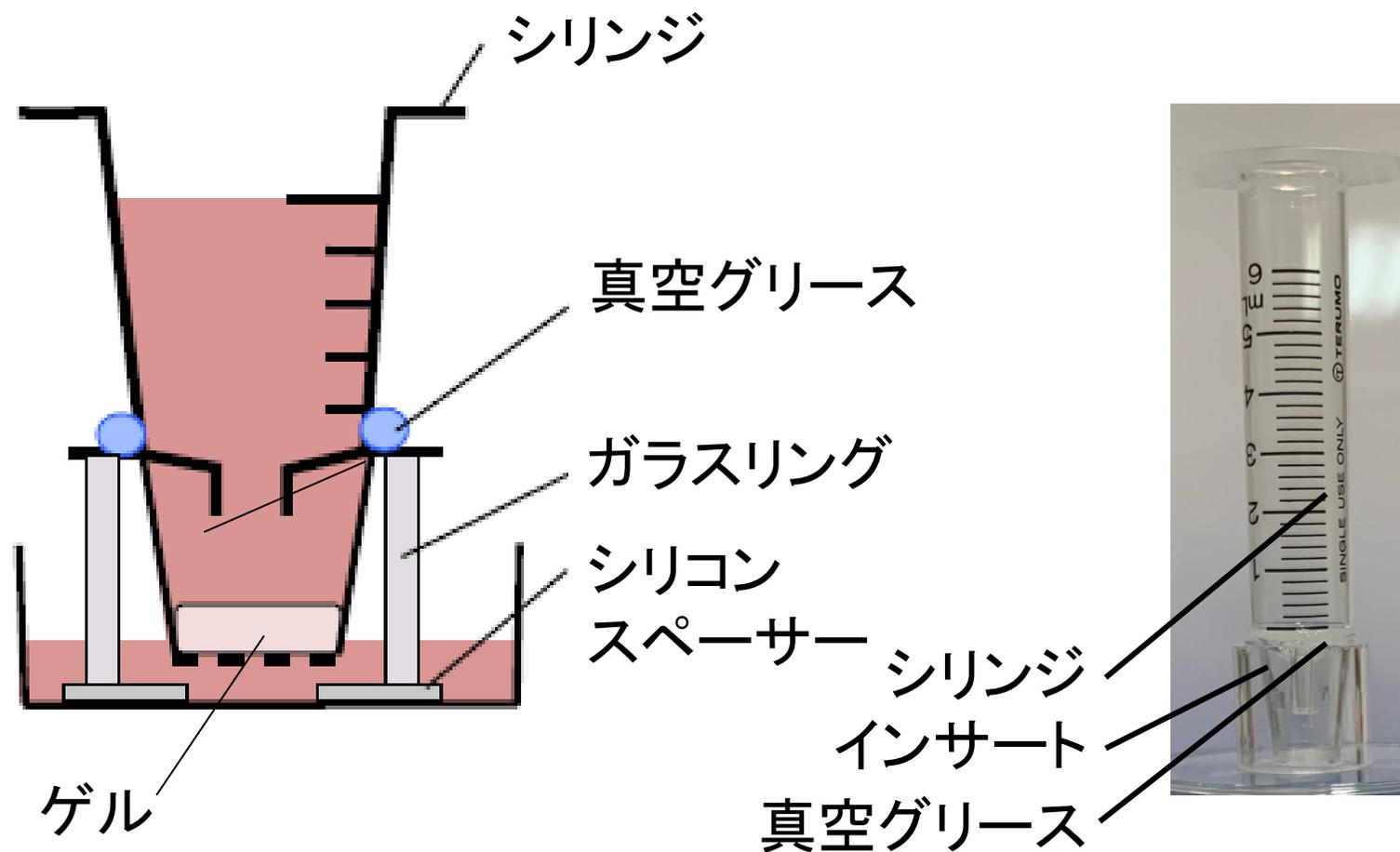
肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用



水位差灌流はゲル中の細胞の生存率を劇的に向上させた。

これまでの成果

培地量を増やした水位差灌流法



0 h

24 h



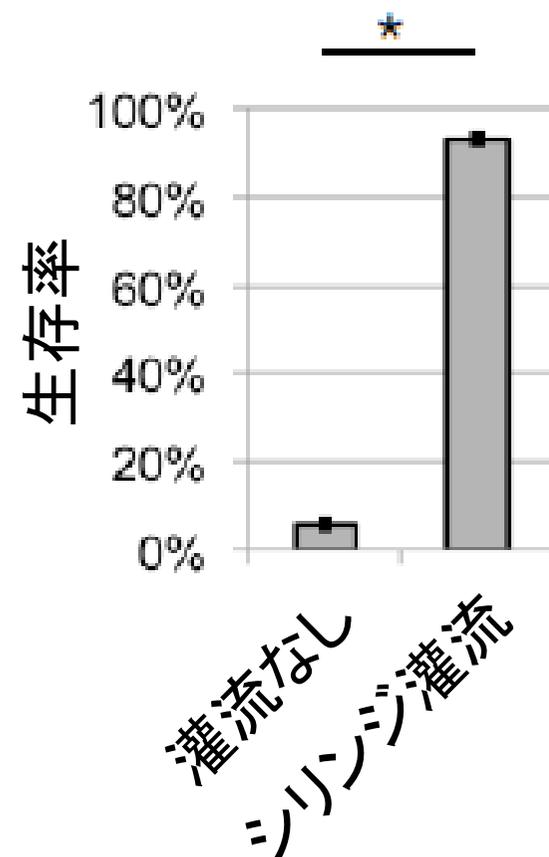
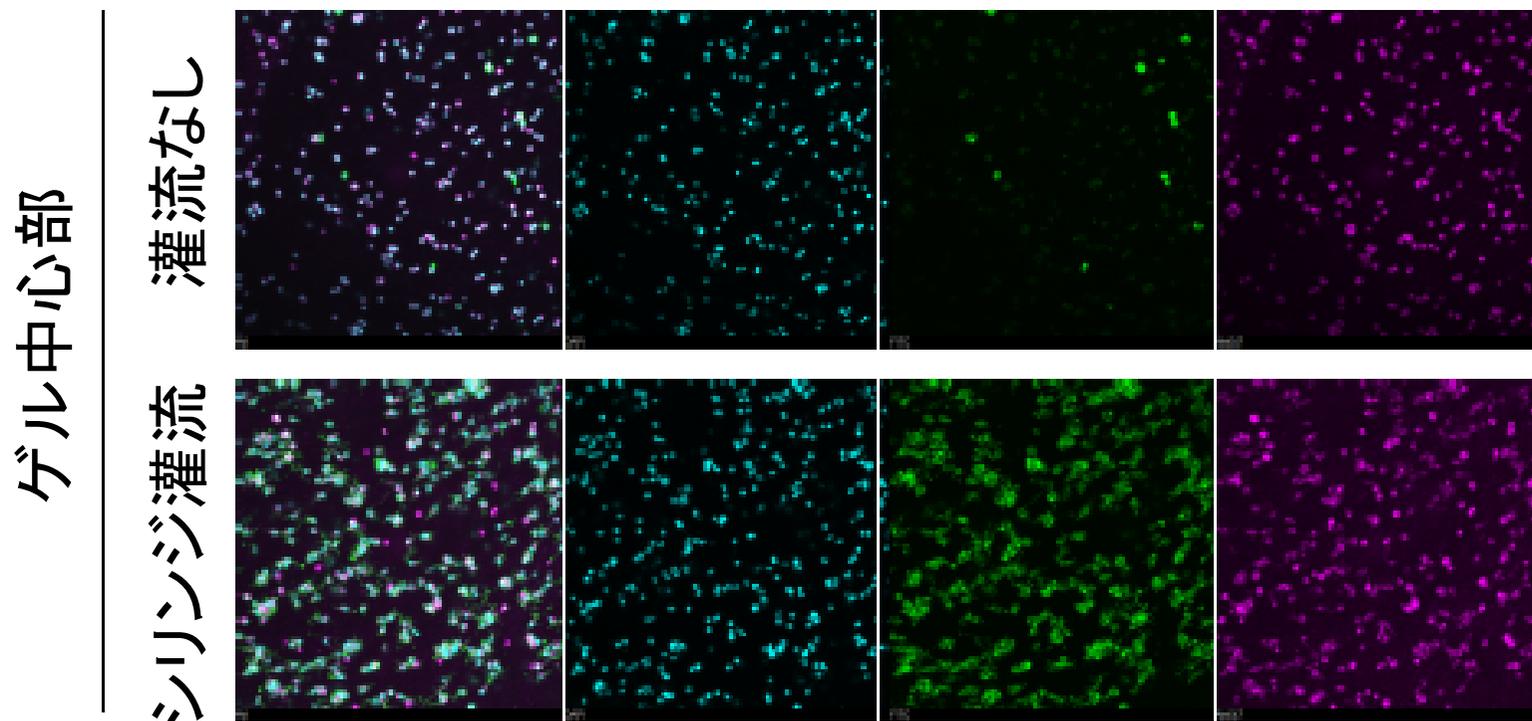
インサートとシリンジを真空グリースで密着させ、
灌流させる培養液量を増やした。

これまでの成果

培地量を増やした水位差灌流法

肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用

生細胞 (緑)
全細胞 (紫/青) 全細胞 生細胞 全細胞

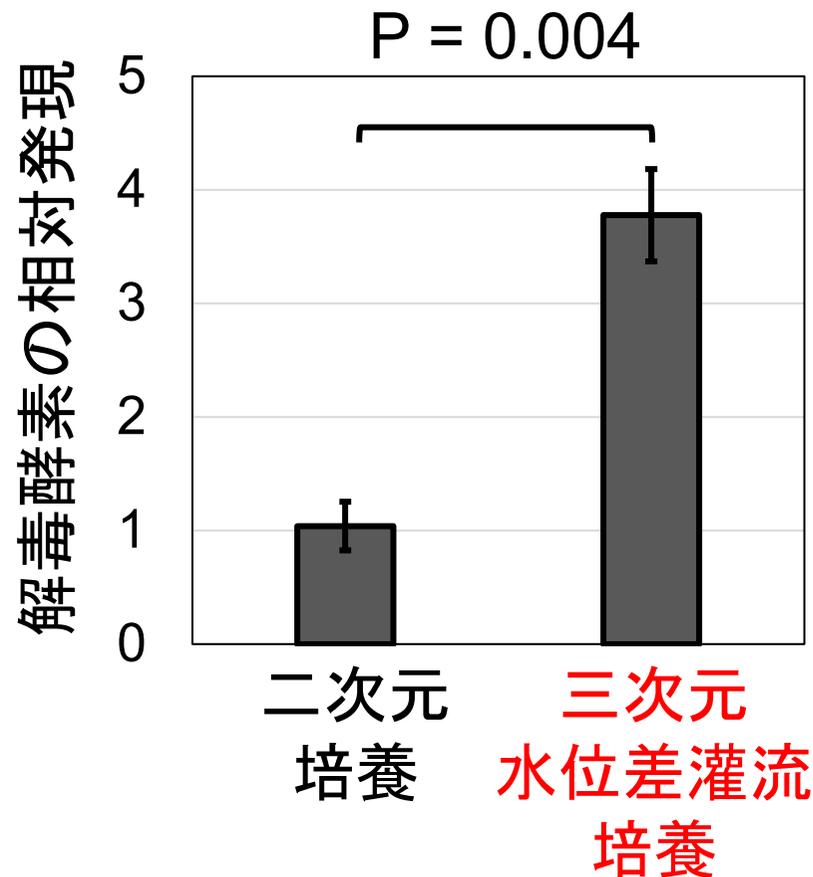
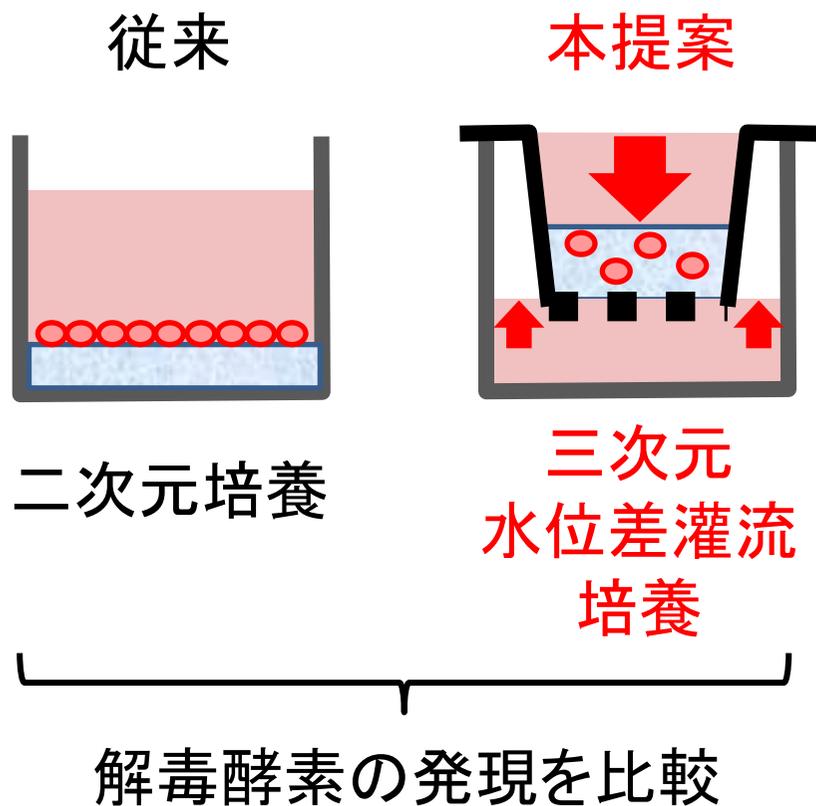


シリンジを用いた灌流により、生存率が大幅に上昇した。

これまでの成果

肝機能評価

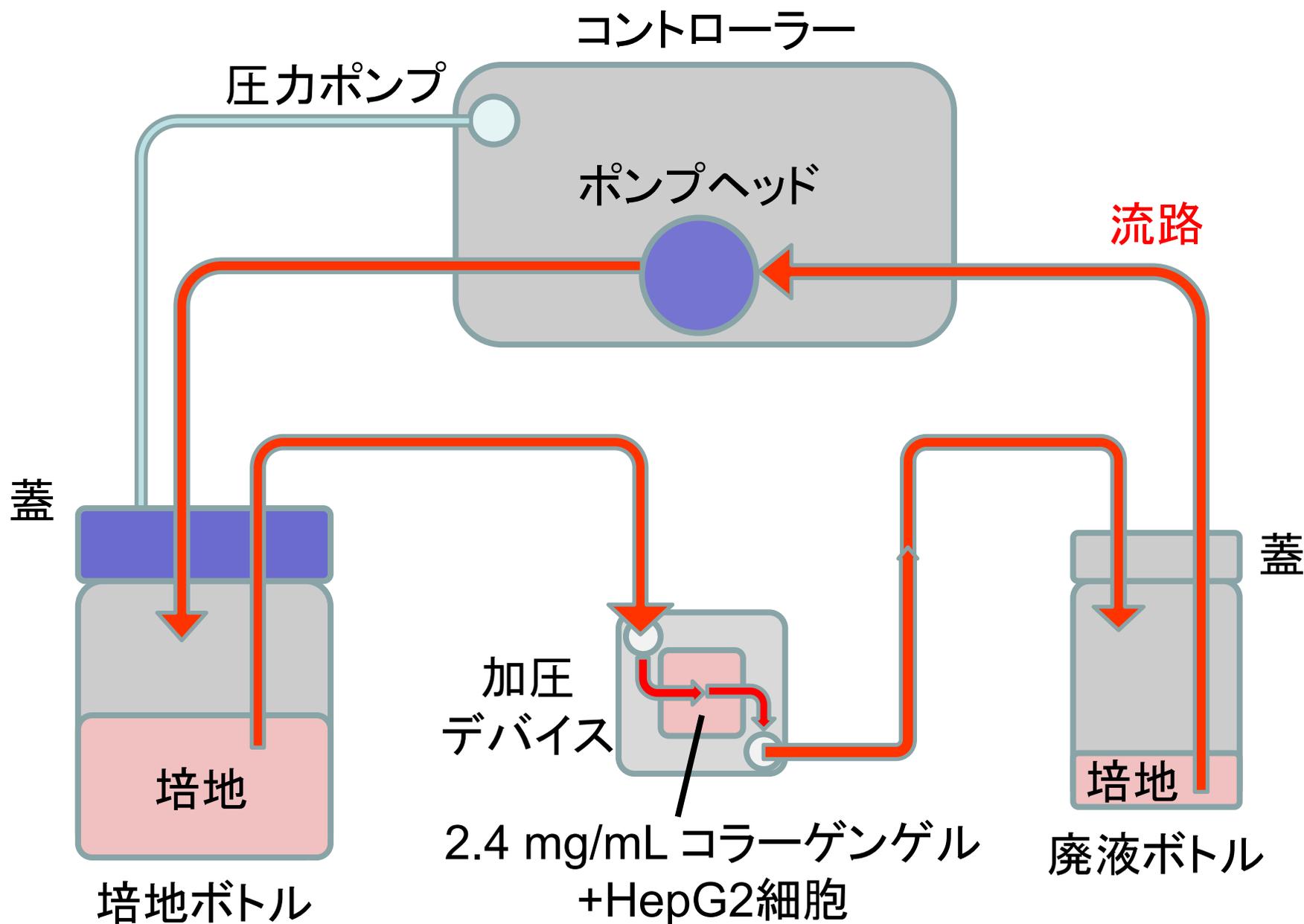
肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用



三次元水位差灌流培養により解毒酵素の発現が上昇した。
➡本方法は生体内を模倣していることを示唆している。

これまでの成果

灌流装置との比較 <灌流装置の概要>



これまでの成果

灌流装置との比較

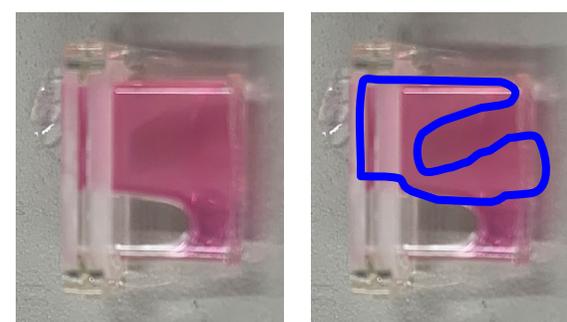
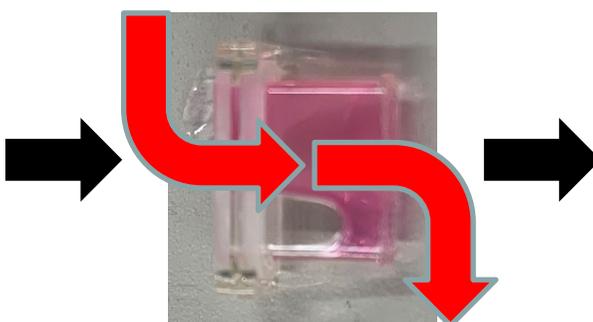
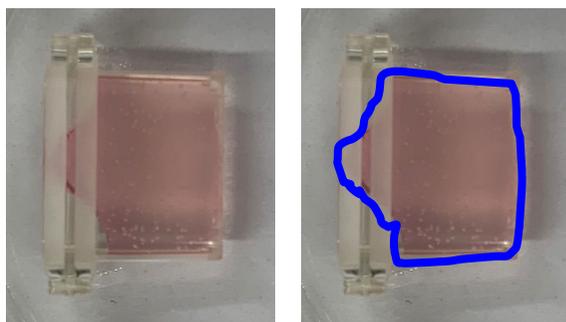
肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用
コラーゲン濃度 2.4 (mg/mL)

灌流前

灌流の方向

灌流三日後

灌流装置
(~3 kPa)



ゲルの輪郭

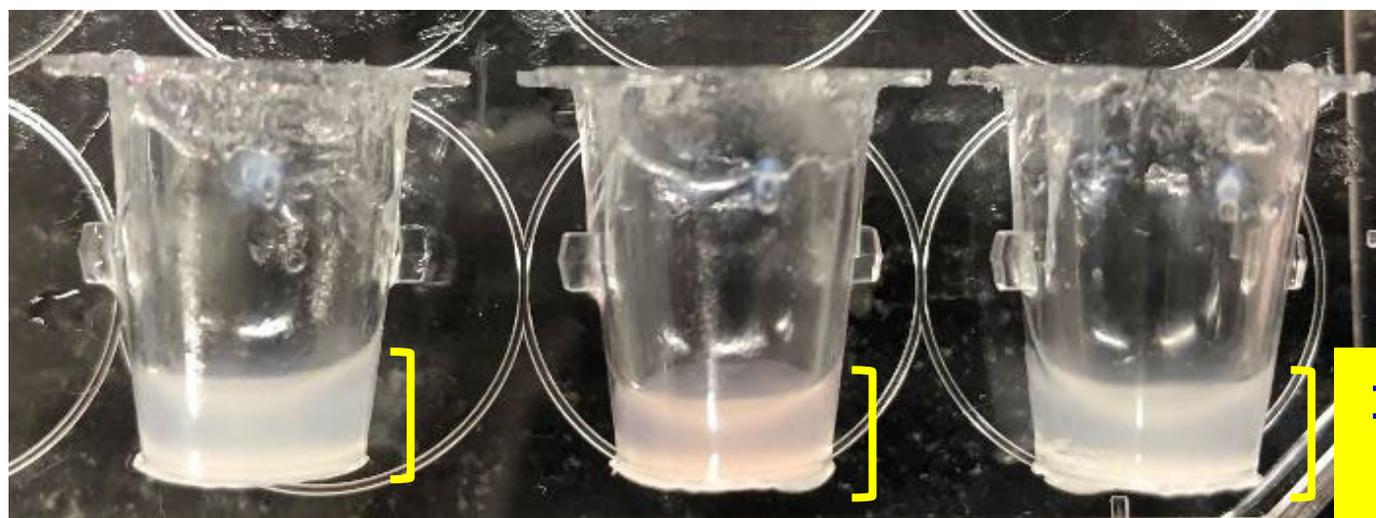
ゲルの輪郭

コラーゲン濃度 (mg/mL) 2.4

1.6

1.2

水位差灌流
(0.1-0.6 kPa)
灌流三日後



コラーゲン
ゲル

灌流装置ではゲルが壊れてしまったが、水位差灌流では壊れなかった。

これまでの成果

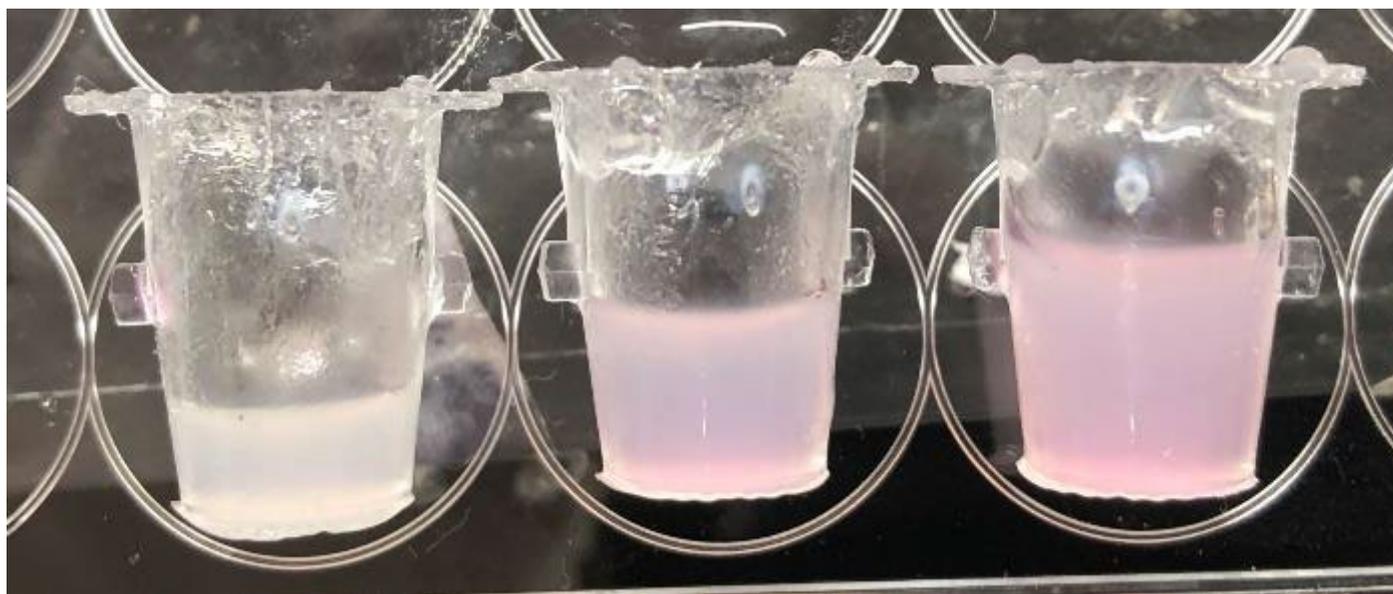
ゲルの厚さを変えた培養

肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用

灌流三日後

体積 (μL)	200	400	600
厚さ (mm)	4.9	7.8	10.0

水位差灌流



厚さ10.0 mmまでのゲルで水位差灌流培養を行うことに成功した。

これまでの成果

ゲルの厚さを変えた際の生存率

肝臓モデル細胞(HepG2細胞)を使用

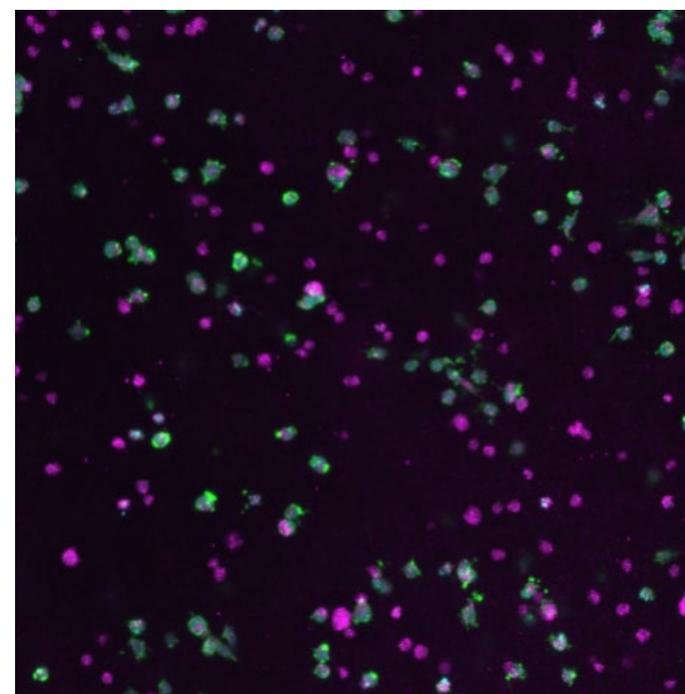
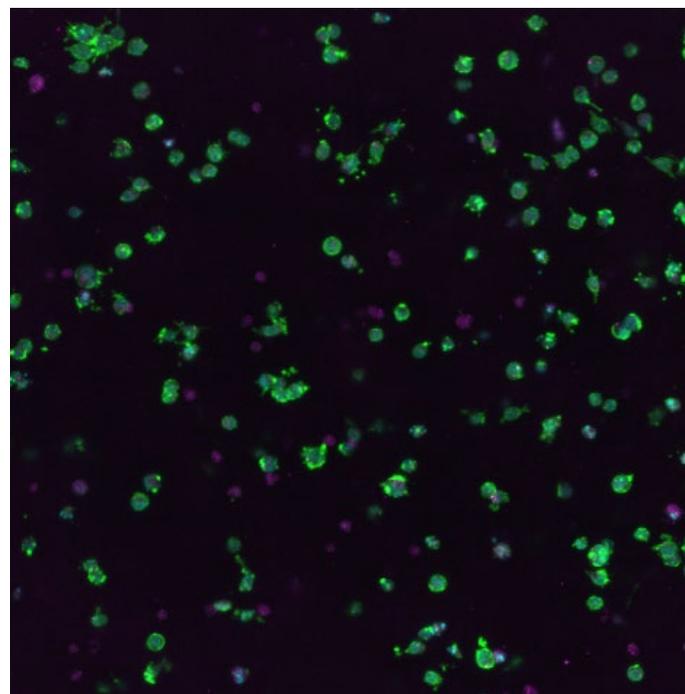
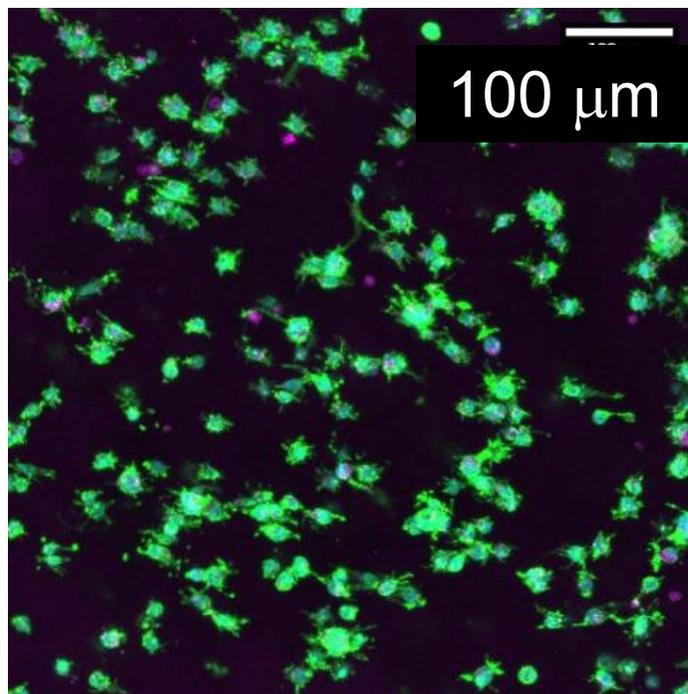
ゲルの厚さ(mm)

生細胞(緑) 全細胞(紫)

4.9

7.8

10.0



生存率 : 99 %

84 %

50 %

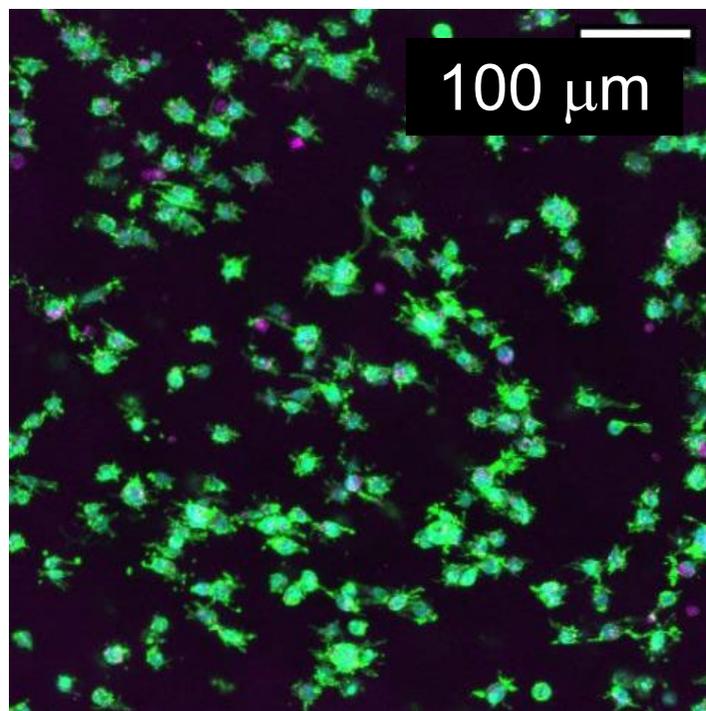
ゲルが厚くなるにつれて生存率は低下したが、
7.8 mmの厚さでも84%、10.0 mmの厚さでも50%の細胞が生存していた。

これまでの成果

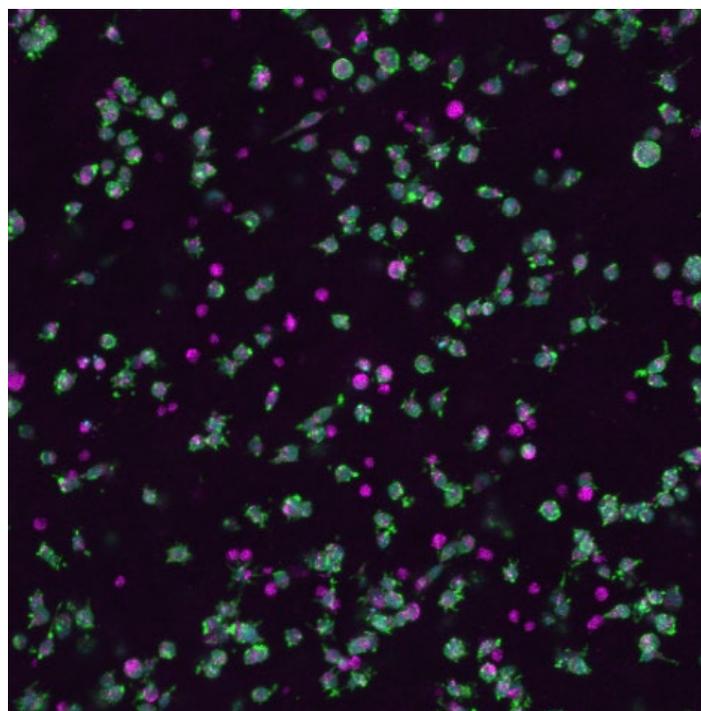
コラーゲン濃度を変えた際の生存率 肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用

コラーゲン濃度 (mg/mL) 生細胞 (緑) 全細胞 (紫)

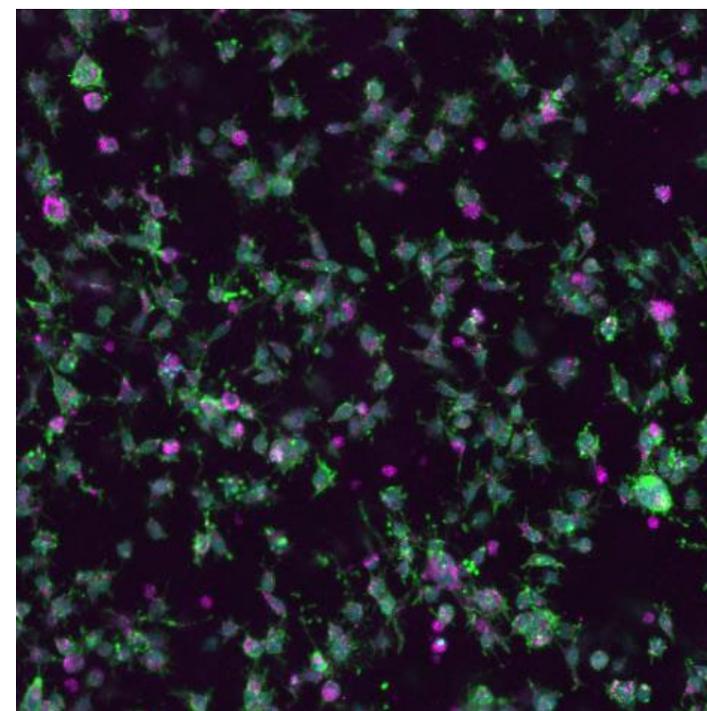
2.4



1.6



1.2



生存率 : 99 %

83 %

94 %

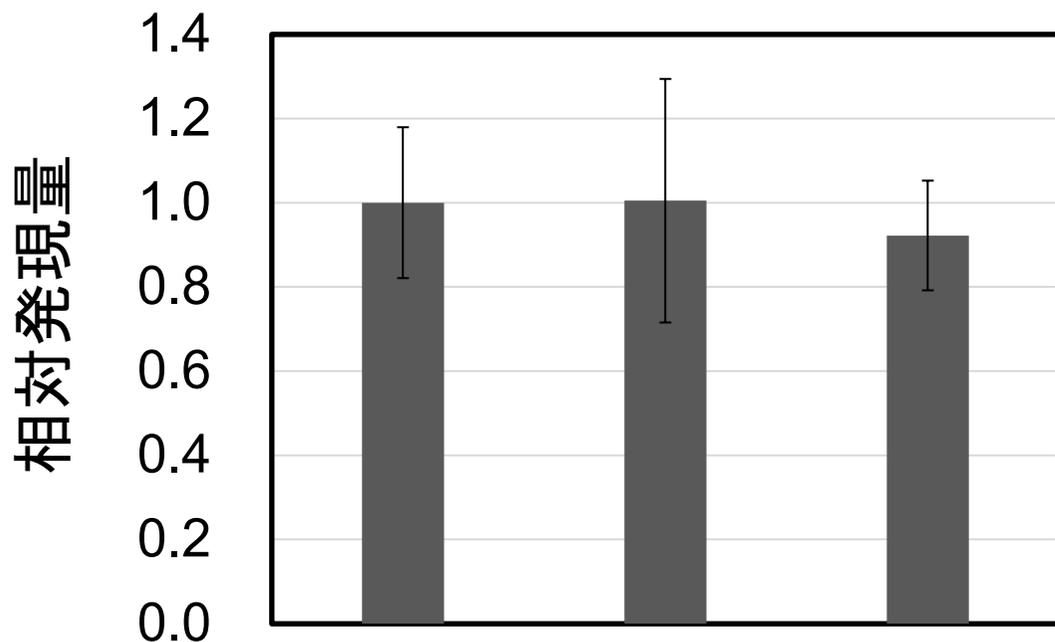
1.2-2.4 mg/mLの濃度のコラーゲングルで細胞は80%以上生存していた。

これまでの成果

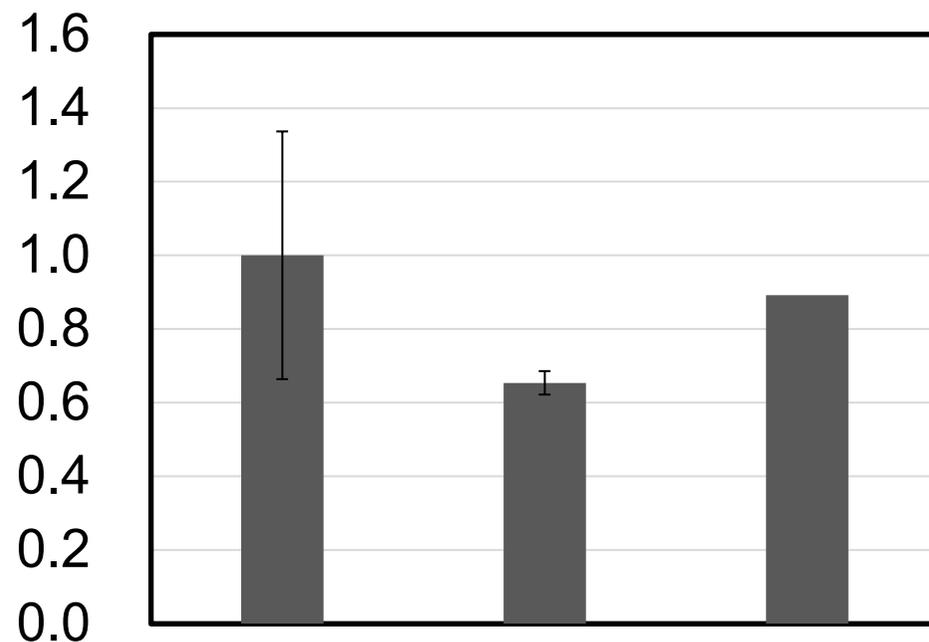
コラーゲン濃度を変えた際の肝機能評価

肝臓モデル細胞 (HepG2細胞) を使用

アルブミン



解毒酵素



コラーゲン濃度 (mg/mL)

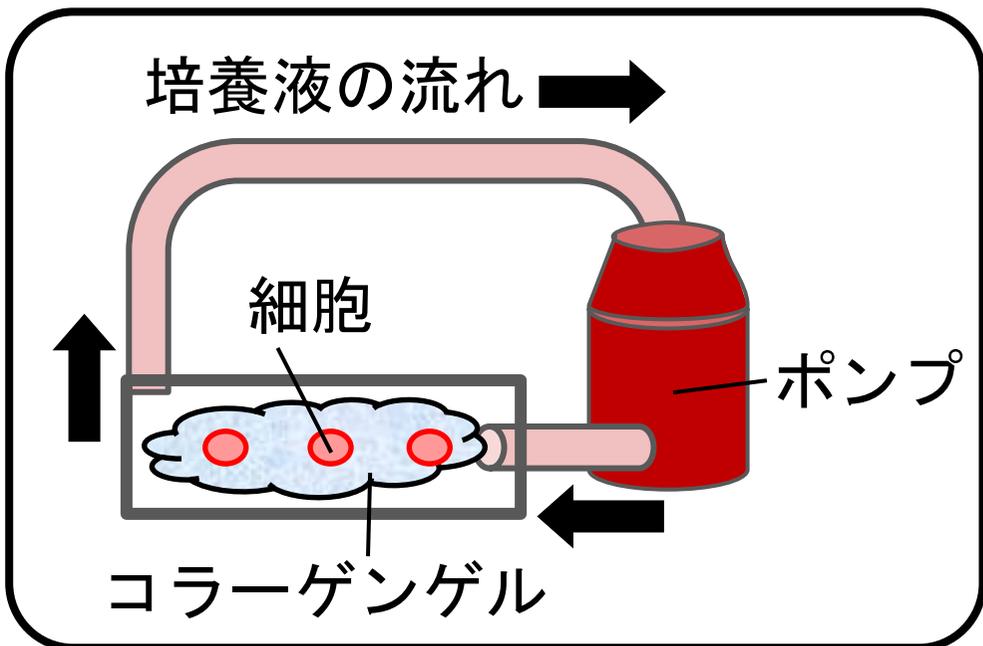
コラーゲン濃度の異なる環境下で肝機能を評価することに成功した。アルブミンの発現に変化はみられなかったが、解毒酵素の発現はコラーゲン濃度が低い環境下で減少した。

本技術のまとめ

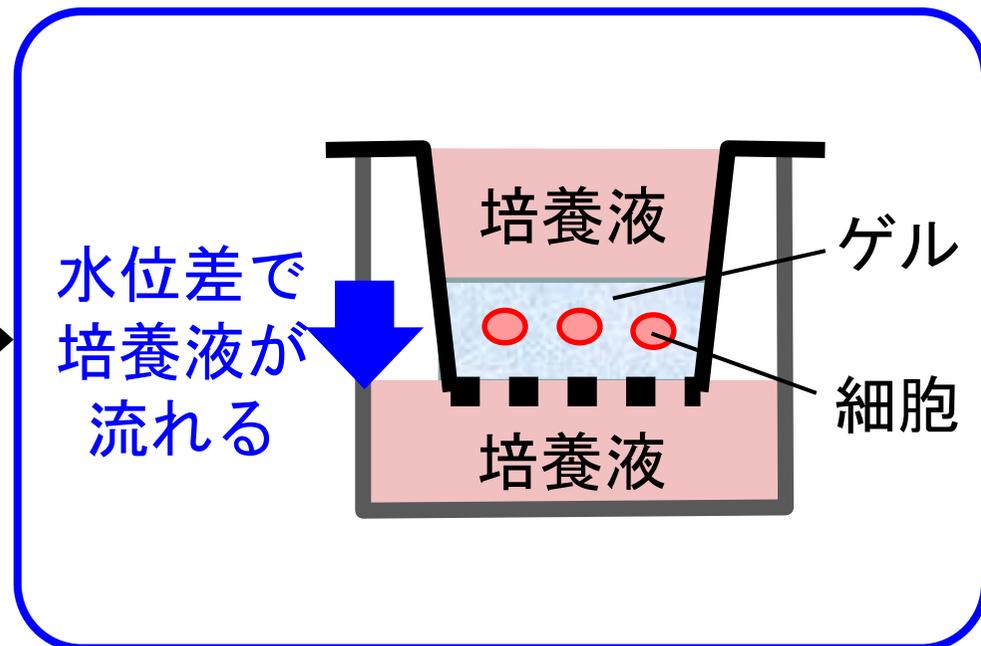
三次元水位差灌流培養法の確立に成功

従来の灌流培養法：
コラーゲンゲルが壊れる

三次元水位差灌流培養法：
コラーゲンゲルが壊れない



簡易化



Tan *et al.*, Biomedical Microdevices, 2003

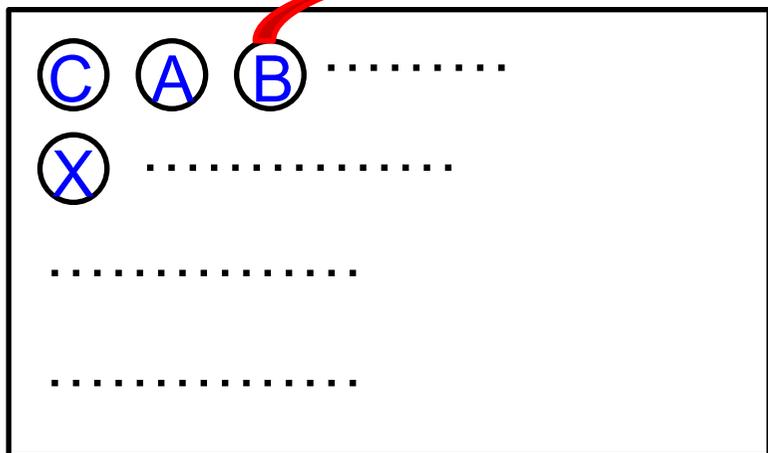


- ・ 10 mmの厚みのゲル中でも50%以上の細胞が生存
- ・ 1.2-2.4 mg/mLのコラーゲン濃度で培養が可能：ゲルが壊れず細胞が生存
- ・ 解毒酵素の発現はコラーゲン濃度が低い環境下で減少することを発見

産業応用の例

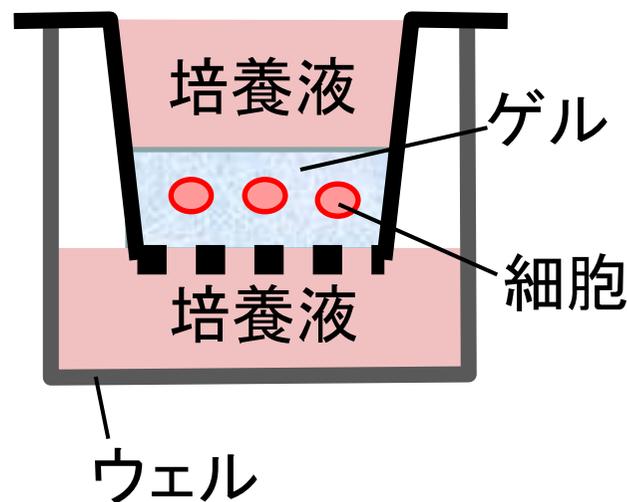
健康食品・薬剤のシーズ物質を同定するスクリーニングシステムの新規デザイン

96ウェルプレート

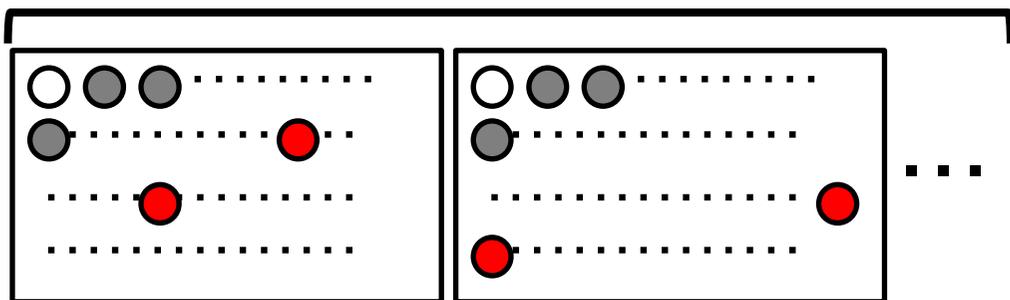


C:コントロール
A:化合物A
B:化合物B
⋮
X:化合物X
⋮

三次元水位差灌流培養



細胞の機能を解析



各ウェルに化合物を
1種類ずつ添加し培養

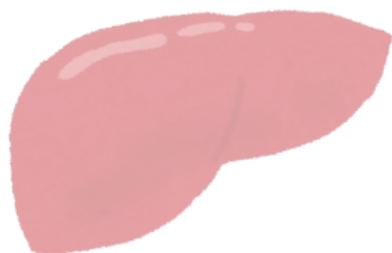
● 機能が上昇したウェル⇒有効なシーズ物質

簡便・低コストなスクリーニングを実現する。

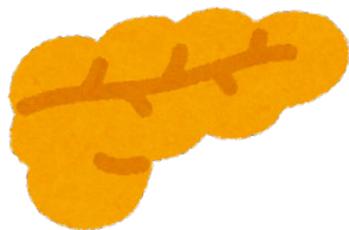
今後の応用

- ・ 現在、日本で**肝疾患をもつ人は約25万人**（厚生労働省Webサイトより）。
- ・ 肝疾患のある人はない人に比べて**新型コロナウイルス感染後の死亡率が3倍程度高い**（Singh *et al.*, Gastroenterology, 2020）。
- ・ 最初に肝臓に着目したが、それ以外の臓器・組織にも応用可能である。

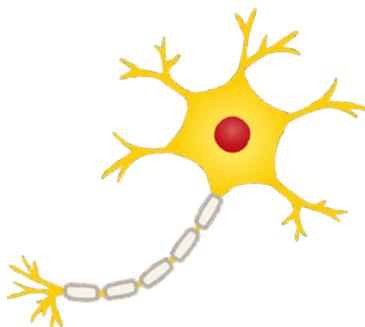
肝臓



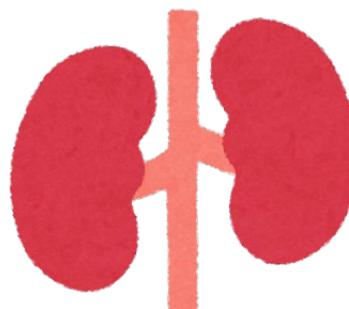
膵臓



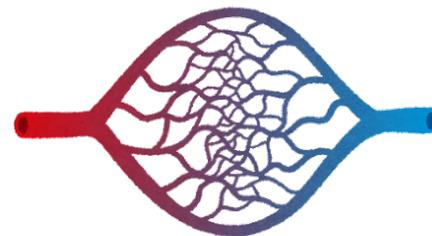
神経



腎臓



血管



<本培養法を用いて>

有効な成分をスクリーニング⇒薬剤開発・健康食品開発
生体に近い環境で培養⇒再生医療

3 すべての人に
健康と福祉を



実用化に向けた課題

- 現在、24ウェルにおける水位差灌流を行う方法を開発済み。
しかし、96ウェルでは成功していない。
今後96ウェルで行うための条件検討を行う。
- 肝臓モデル細胞以外の細胞について
今後検討を行う。

企業への期待

- 水位差灌流培養法のキット開発。
- 再生医療に用いる細胞・組織での培養検討。
- 96ウェルを用いたスクリーニング系の開発。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞の培養方法、細胞の培養方法を用いたスクリーニング方法、培養装置及び培養キット
- 出願番号 : 特願2022-011768
- 出願人 : 北海道大学
- 発明者 : 石原 誠一郎、芳賀 永、石原 すみれ

- 2021年-2022年 JST A-STEP(トライアウトタイプ)
事業に採択
課題名: 生体組織を模倣した
新規三次元細胞培養システムの開発

お問い合わせ先

北海道大学 産学・地域協働推進機構
産学協働マネージャー 藤村 維子

産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口
<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>