

# 博士学位論文

均一なスフェロイドの高効率生産を可能にする  
フッ素樹脂表面特性を利用した低接着培養足場の研究

均一なスフェロイドの高効率生産を可能にするフッ素樹脂表面特性を利用した低接着培養足場の研究

東郷  
秀孝

近畿大学大学院

生物理工学研究科 生体システム工学専攻

東郷 秀孝

# 博士学位論文

均一なスフェロイドの高効率生産を可能にする  
フッ素樹脂表面特性を利用した低接着培養足場の研究

2023年12月30日

近畿大学大学院

生物理工学研究科 生体システム工学専攻

東郷秀孝

## 目次

1. 序論 .....	4
1.1. 背景 .....	4
1.2. 目的 .....	6
1.3. 本論文の構成 .....	7
1.4. 参考文献 .....	7
2. スフェロイドの作製 .....	13
2.1. 既存のスフェロイド作製法とその課題 .....	13
2.1.1. マイクロパターン強制浮遊法 .....	13
2.1.2. ハンギングドロップ法 .....	14
2.1.3. 旋回培養またはスピナーフラスコ法 .....	15
2.1.4. フォースドリブン法 .....	16
2.1.5. 3Dプリンティング法 .....	18
2.2. その他の三次元培養手法 .....	19
2.3. スフェロイド作製手法に求められる仕様 .....	21
2.4. 参考文献 .....	22
3. フッ素樹脂と選択的接着足場としての活用 .....	27
3.1. 細胞外マトリックス(ECM: Extracellular Matrix) .....	28
3.2. 細胞の足場への接着機序 .....	28
3.3. フッ素樹脂の特性 .....	28
3.4. フッ素樹脂表面改質による既存の細胞接着法 .....	29
3.5. フッ素樹脂による選択的細胞接着と細胞の剥離 .....	30
3.6. 基板へのフッ素樹脂加工方法 .....	31
3.7. 撥水性の評価 .....	32
3.8. 考察 .....	33
3.9. 第3章まとめ .....	34
3.10. 参考文献 .....	34
4. マイクロスタンプ法を用いたECMのパターニング .....	37
4.1. マイクロスタンプの作製方法 .....	37
4.1.1. PDMS .....	37
4.1.2. PTFEの鋳型を用いたマイクロスタンプ作製法 .....	38
4.2. マイクロスタンプ法によるECMのパターニング方法 .....	38
4.3. マイクロスタンプ評価 .....	39
4.3.1. マイクロスタンプの鋳型およびスタンプ先端寸法精度 .....	39
4.3.2. ECM転写精度(マイクロスタンプ法) .....	41
4.4. 考察 .....	42

4.5.	第4章まとめ	42
4.6.	参考文献	42
5.	株化細胞を用いたスフェロイド作製	44
5.1.	株化細胞とは	44
5.1.1.	HepG2	44
5.1.2.	MCF-7	45
5.2.	本研究で使用した細胞外マトリックス(ECM)	45
5.2.1.	マトリゲル: Matrigel	45
5.2.2.	iMatrix-511 silk	45
5.2.3.	フィブロネクチン: Fibronectin	46
5.2.4.	ヴィトロネクチン: Vitronectin	46
5.2.5.	コラーゲンタイプIV: Collagen IV	47
5.3.	播種条件	47
5.4.	二次元コロニーおよびスフェロイドの寸法評価(マイクロスタンプ法)	47
5.5.	他の細胞種およびECMにおける挙動	48
5.6.	考察	49
5.7.	第5章まとめ	53
5.8.	参考文献	54
6.	HepG2 スフェロイドを構成する細胞の生存率	56
6.1.	トリパンブルー染色	56
6.2.	HepG2/MCF-7 生存率の評価	56
6.3.	ハンギングドロップ法(既存の手法)との比較	57
6.4.	考察	58
6.5.	第6章まとめ	59
6.6.	参考文献	59
7.	ネガ型樹脂マスクを用いたECMのパターニング	60
7.1.	ネガ型樹脂マスクの作製方法	61
7.1.1.	リソグラフィ技術	61
7.1.2.	紫外線硬化樹脂	61
7.1.3.	ネガ型樹脂マスクによるECMのパターニング方法	62
7.2.	ネガ型樹脂マスクの貫通孔寸法精度評価	62
7.3.	マイクロスタンプ法と樹脂マスク法の比較	63
7.4.	考察	64
7.5.	第7章まとめ	65
7.6.	参考文献	65
8.	幹細胞を用いたスフェロイドの作製	66

8.1.	幹細胞 .....	66
8.2.	播種条件 .....	66
8.3.	二次元コロニーおよびスフェロイドの寸法評価(樹脂マスク法) .....	67
8.4.	考察 .....	68
8.5.	第8章まとめ .....	70
8.6.	参考文献 .....	70
9.	iPS スフェロイドの未分化性/初期胚分化能評価 .....	72
9.1.	生存率の評価 .....	72
9.2.	蛍光免疫染色 .....	73
9.2.1.	DAPI .....	74
9.2.2.	Oct3/4 .....	74
9.2.3.	SOX2 .....	74
9.2.4.	SSEA4 .....	75
9.2.5.	TRA-1-60 .....	75
9.2.6.	TRA-1-81 .....	75
9.2.7.	NANOG .....	75
9.2.8.	OTX2 .....	76
9.2.9.	$\beta$ -TUBULIN .....	76
9.2.10.	PAX2 .....	76
9.2.11.	cTNT .....	76
9.2.12.	SOX17 .....	76
9.2.13.	FOXA2 .....	76
9.3.	二次元コロニー内の iPS 細胞の未分化性の評価方法 .....	77
9.4.	iPS 細胞の未分化性の評価結果 .....	77
9.5.	初期胚(三胚葉)の分化能の評価方法 .....	78
9.6.	初期胚(三胚葉)の分化能の評価結果 .....	79
9.7.	考察 .....	80
9.8.	第9章まとめ .....	81
9.9.	参考文献 .....	81
10.	結論 .....	83
10.1.	まとめ .....	83
10.2.	今後の研究課題・展望 .....	85
	参考文献 .....	86
	研究業績 .....	99
	謝辞 .....	108

## 1. 序論

### 1.1. 背景

細胞培養の手法が確立されてから 100 年以上もの年月が経過し、近年では細胞培養は基礎研究のみならず、医療機器に使用される材料の細胞毒性評価として用いられることや、創薬や再生医療などの前臨床研究において重要な技術となっている。特に創薬プロセスにおいては、生体を用いずに薬理機序を確認できることで、実験動物の数を減らすことができる高い費用対効果が見込まれる手法である。したがって、医薬品開発において候補物質の選定には、細胞培養による *in vitro* 試験、薬効や毒性の確認には動物実験による *in vivo* 試験が不可欠である。また、化学物質の法規制（REACH[1]、CLP[2]、Cosmetics Directive[3]など）では、標準的な *in vitro* 試験では特異性が低く、非遺伝毒性化学物質がしばしば生体内で遺伝毒性を示すことが報告されているため、動物実験が必要とされている。しかしここ数十年、化学物質を用いた動物実験が問題視され、動物愛護の観点から動物実験を禁止するパラダイムシフトがいくつかの国で進行している。その結果、欧州連合では 2009 年から化粧品成分の *in vivo* 追跡調査における実験動物の使用が禁止された[4]。しかしながら、創薬や医療機器開発において、動物実験同等の結果を得られる実験系が確立されていないことから、動物実験が不可欠であることには変わりはない。その結果として医療機器における生体安全性評価として動物実験の結果が用いられる ISO10993-10(皮膚感作性)や ISO10993-11(全身の毒性)の試験においても実施できる国が少なくなっており、試験が集中することにより認証期間の長期化や製造業者のコスト増大を招いている。動物実験の実施数においても規格で要求される以上、各国の規制で動物実験を禁止したとしても実施場所が変わるだけで実施自体は減少しないこととなる。したがって、細胞培養によって組織の動態を模倣する代替技術の需要は、今後ますます高まると予想される。

再生医療という観点においては、古くは実質細胞を用いた研究が行われていたが、胚性幹細胞（ES 細胞: embryonic stem cells）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞: induced pluripotent stem cells）の発見以降、これらの幹細胞を用いた研究が主流となってきた。

通常、培養細胞においてその組織固有の分泌能などの特性を得ようとした場合には、三次元構造を持たなければならないことは広く知られており、三次元培養についての研究が多く行われている。例えば、ディッシュやフラスコを用いた二次元細胞培養では細胞は単層で増殖・成長するため、実際の組織や細胞に存在する細胞-細胞間や細胞外マトリックス（ECM: Extracellular Matrix）の相互作用を欠いている。さらに、細胞は引き伸ばされ、細胞骨格の再配列を受けることにより人工的な極性を獲得し、その際に異常な遺伝子やタンパク質を発現することもある。*in vivo* 環境の組織とは異なり、二次元培養系は複雑でダイナミックな微小環境を細胞に与えることができないため、実際の体組織内と異なる挙動を示す可能性もある [5, 6]。

これらの理由から、創薬中に二次元細胞培養で発見された化合物や、in vitro で得られた細胞動態の知見の多くは臨床時の動態と異なり、臨床試験で失敗する例が散見される[7]。したがって、生体内の細胞の動態をより現実的にシミュレートできる in vitro 細胞培養系を確立することが重要となる。三次元 (3D) 培養系は、胚発生、形態形成、器官形成などの生体内プロセスを模倣できる優れた in vitro モデルである。複雑な細胞間接着を有する細胞集合体では、栄養、ガス、成長因子、シグナル伝達因子の勾配を発生させ、これらの構造体は、実際の組織で観察される細胞微小環境を再現し、in vivo での細胞動態をより現実的にシミュレートすることができる。したがって、オルガノイドと呼ばれるミニ臓器を安定して得るための前段階として、大きさや性能の整ったスフェロイドを大量に安定的に供給できる手法が求められている。

近年では、幹細胞研究は飛躍的に進展し、スフェロイドやオルガノイドの作製に用いられ病態解明や創薬に利用されており、難治性疾患患者から作製した iPS 細胞由来のオルガノイドが、疾患メカニズムの解明に利用されているほか、創薬分野ではヒト iPS 細胞由来のオルガノイドを用いた in vitro 試験の初期段階で薬効を検証することで、臨床試験開始前に候補化合物が失敗する可能性を低減することが期待され、iPS 細胞由来のオルガノイドを用いた薬物試験では、すでに治療に用いられている薬剤と同等の結果が得られている[8, 9]。したがって、スフェロイドやオルガノイドの利用は今後ますます増えることが予想される。

これまでも、治療薬の有効性を検証するためにがん細胞が用いられた研究[10]や骨や軟骨の三次元構造を培養することで、機械的性質を再現する研究[11, 12]が行われてきた。

現在は、ES 細胞や iPS 細胞を用いることにより、複雑な組織を再現する研究も盛んにおこなわれており、脳[13-21]、肺[18]、肝臓[22-25]、腎臓[26-29]、胃[30]、腸[31-35]、網膜[36]などの様々な臓器を模倣するオルガノイドの研究結果や、難病患者から作製された iPS 細胞由来のオルガノイドが、疾患メカニズムの解明[37, 38]に用いられている。創薬においては iPS 細胞由来のオルガノイドを用いた薬剤試験では、すでに治療に用いられている薬剤と同等の結果が得られている[9]など、多くの研究成果が発表されている。また、それに伴いスフェロイドおよびオルガノイドを作製するためのさまざまな三次元培養法が提案されている。

従来のスフェロイドを作製するための三次元培養法は、マイクロパターン強制浮遊法[39, 40]、ハンギングドロップ法[41-43]、旋回培養法またはスピナーフラスコ法[44-52]、フォースドリブン法[53-55]の 4 種類に大別される[56]。マイクロパターン強制浮遊法では、接着性の低いウェルプレートを用い、マイクロウェル内に沈殿した細胞同士が 3 次元的に接着するようにする。ハンギングドロップ法では、培養液の表面張力を利用して液滴を形成し、空気との界面をマイクロウェルとして利用する。スピナーフラスコや旋回培養 (バイオリクター) は、細胞を分散させた培養液を連続的に旋回・攪拌し、細胞が衝突してスフェロイドを形成する方法である。フォースドリブン法は磁力、電界、音響ピンセットな

どの物理的な力により細胞を凝集させる。その他の方法も近年開発されており、例えば 3D プリンティング法では、ゲル状の培養液を充填材として異種細胞をコンピュータ制御で配列させ、3次元形状を人工的に作り出すことができる。

しかし、これらの既存の方法は、スフェロイドの寸法制御、細胞へのダメージや刺激の低減、簡単な手順、高い成功率、大量生産、高いスループット、低コストといった優れた特徴を示すが、これらの要件の全てを同時に満たすものはない。

## 1.2. 目的

前項に示すように、生体組織を模擬した *in vitro* 試験に用いるオルガノイドを作製するためには、大きさ・性質の揃ったスフェロイドを大量に安定的に作製する技術が求められている。また、次項以降で説明をするように、既存の手法において機器の導入コストや、使用する器材のランニングコストなどが高価であること、作業者の技術の習熟度合いによるばらつきが大きいこと、そして使用する細胞毎に必要な条件だしなどそれぞれの手法に課題があると考えられる。これらの多くの課題は多くの研究者が参画するうえでの障害になり得る。これらの課題に鑑み、本研究における手法では安定したスフェロイドの品質以外に工業的な生産性が高く安価な器材かつ、容易な手技で完結する工程を確立することによる汎用性の向上について検討をおこなう。

スフェロイドのサイズコントロールへのアプローチは選択的接着足場によるパターンニングとする。そのパターンニング面積により細胞の数をコントロールすることにより、スフェロイドのサイズコントロールを試みる。スフェロイド化へのプロセスでは、後の分化誘導に対して極性を破壊し影響があると言われる酵素処理を使用せずに、パターンニングした細胞二次元コロニーを容易に剥離できる機能性足場を開発する。

さらに、形成したスフェロイドの品質を評価する。細胞培養では、時間と共に死細胞が発生する。スフェロイドの形成過程において、生きている細胞のみを選択的に凝集させることは困難である。特に酵素処理を用いて細胞を分散させる工程を含む場合には、その酵素処理によって一定数のダメージを負い、死細胞が発生する。生存率の評価では、平面培養の二次元コロニーをコントロールとしてスフェロイドを構成する細胞の生存率を評価する。次に iPS 細胞を用いてスフェロイドを作製するときには未分化性の維持が重要となる。iPS 細胞は全ての細胞への分化能を持つが故に、様々な刺激がトリガーとなり想定外の分化が誘導されてしまう。本手法の過程において、想定外の分化が誘発されていないことを確認するために、スフェロイド化直前の二次元コロニーにおいて、未分化性の評価を行う。最後に、iPS 細胞を用いてスフェロイドを作製し、オルガノイドへと分化誘導を進めるためには、分化能が維持されていることが重要である。組織分化へのファーストステップとしての初期胚における三胚葉それぞれへの分化能を確認することにより、オルガノイドへと繋がるスフェロイド作製手法としての有効性を確認する。



### 1.3. 本論文の構成

本研究では、第 2 章で既存のスフェロイド及び三次元構造の作製手法における課題の分析と新たなスフェロイド作製手法(以降、提案手法)における要求仕様を定義した。第 3 章ではスフェロイド作製基板の材料の選定と性能の検討を行う。第 4 章ではスフェロイド作製基板上への ECM のパターンニング方法としてマイクロスタンプの作製及び精度評価を行った。第 5 章及び第 6 章では株化細胞を用いてスフェロイドの作製を行い、スフェロイドの生存率の評価及び、既存の手法との対比としてハンギングドロップ法と比較検討した。第 7 章から第 9 章ではマイクロスタンプ法の課題を解決するため、ネガ型樹脂マスクの作製及び精度評価を行い、iPS 細胞でのスフェロイド作製および作製したスフェロイドの未分化性を検討した。第 10 章では、本論文の総括と今後の研究課題および展望について述べている。

### 1.4. 参考文献

1. EU (2006) Regulation EC No. 1907/2006 OF The European Parliament and of the Council of concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. .
2. ICH (2011) ICH Guideline, Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1), Approval by the Steering Committee of S2(R1) under Step 4 and recommendation for adoption to the three ICH regulatory bodies (9 November 2011). .
3. SCCS (2014) Addendum to the SCCS's Notes of Guidance (NoG) for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation 8th Revision, SCCS/1501/12. . doi:10.2772/47128.
4. EU (2009) European Union 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast). Official Journal L342, 22.12.2009. .
5. Nath, S.; Devi, G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* 2016, *163*, 94-108, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
6. Hutchinson, L.; Kirk, R. High drug attrition rates--where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 2011, *8*, 189-190, doi:10.1038/nrclinonc.2011.34.
7. Goetz, M.P.; Rae, J.M.; Suman, V.J.; Safgren, S.L.; Ames, M.M.; Visscher, D.W.; Reynolds, C.; Couch, F.J.; Lingle, W.L.; Flockhart, D.A.; Desta, Z.; Perez, E.A.; Ingle, J.N. Pharmacogenetics of

- tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005, *23*, 9312-9318, doi:10.1200/JCO.2005.03.3266.
8. Kurihara, S.; Fujioka, M.; Hirabayashi, M.; Yoshida, T.; Hosoya, M.; Nagase, M.; Kato, F.; Oga wa, K.; Okano, H.; Kojima, H.; Okano, H.J. Otic Organoids Containing Spiral Ganglion Neuron -like Cells Derived from Human-induced Pluripotent Stem Cells as a Model of Drug-induced Neuropathy. *Stem Cells Transl Med* 2022, *11*, 282-296, doi:10.1093/stcltm/szab023.
  9. Crespo, M.; Vilar, E.; Tsai, S.Y.; Chang, K.; Amin, S.; Srinivasan, T.; Zhang, T.; Pipalia, N.H.; Chen, H.J.; Witherspoon, M.; Gordillo, M.; Xiang, J.Z.; Maxfield, F.R.; Lipkin, S.; Evans, T.; Chen, S. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nature medicine* 2017, *23*, 878-884, doi:10.1038/nm.4355.
  10. Nii, T.; Makino, K.; Tabata, Y. Three-Dimensional Culture System of Cancer Cells Combined with Biomaterials for Drug Screening. *Cancers (Basel)* 2020, *12*, doi:10.3390/cancers12102754.
  11. Gomez, S.; Vlad, M.D.; Lopez, J.; Fernandez, E. Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2016, *42*, 341-350, doi:10.1016/j.actbio.2016.06.032.
  12. Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K.M.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem* 2007, *46*, 73-84, doi:10.1042/BA20060134.
  13. Lancaster, M.A.; Renner, M.; Martin, C.A.; Wenzel, D.; Bicknell, L.S.; Hurles, M.E.; Homfray, T.; Penninger, J.M.; Jackson, A.P.; Knoblich, J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013, *501*, 373-379, doi:10.1038/nature12517.
  14. Mariani, J.; Coppola, G.; Zhang, P.; Abyzov, A.; Provini, L.; Tomasini, L.; Amenduni, M.; Szekely, A.; Palejev, D.; Wilson, M.; Gerstein, M.; Grigorenko, E.L.; Chawarska, K.; Pelphrey, K.A.; Howe, J.R.; Vaccarino, F.M. FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* 2015, *162*, 375-390, doi:10.1016/j.cell.2015.06.034.
  15. Pasca, A.M.; Sloan, S.A.; Clarke, L.E.; Tian, Y.; Makinson, C.D.; Huber, N.; Kim, C.H.; Park, J.Y.; O'Rourke, N.A.; Nguyen, K.D.; Smith, S.J.; Huguenard, J.R.; Geschwind, D.H.; Barres, B.A.; Pasca, S.P. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods* 2015, *12*, 671-678, doi:10.1038/nmeth.3415.
  16. Gabriel, E.; Albanna, W.; Pasquini, G.; Ramani, A.; Josipovic, N.; Mariappan, A.; Schinzel, F.; Karch, C.M.; Bao, G.; Gottardo, M.; Suren, A.A.; Hescheler, J.; Nagel-Wolfrum, K.; Persico, V.; Rizzoli, S.O.; Altmuller, J.; Riparbelli, M.G.; Callaini, G.; Goureau, O.; Papantonis, A.; Busskamp, V.; Schneider, T.; Gopalakrishnan, J. Human brain organoids assemble functionally integrated bilateral optic vesicles. *Cell Stem Cell* 2021, *28*, 1740-1757 e1748, doi:10.1016/j.stem.2021.07.010.

17. Camp, J.G.; Badsha, F.; Florio, M.; Kanton, S.; Gerber, T.; Wilsch-Brauninger, M.; Lewitus, E.; Sykes, A.; Hevers, W.; Lancaster, M.; Knoblich, J.A.; Lachmann, R.; Paabo, S.; Huttner, W.B.; Treutlein, B. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, *112*, 15672-15677, doi:10.1073/pnas.1520760112.
18. Dye, B.R.; Hill, D.R.; Ferguson, M.A.; Tsai, Y.H.; Nagy, M.S.; Dyal, R.; Wells, J.M.; Mayhew, C.N.; Nattiv, R.; Klein, O.D.; White, E.S.; Deutsch, G.H.; Spence, J.R. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 2015, *4*, doi:10.7554/eLife.05098.
19. Kagan, B.J.; Kitchen, A.C.; Tran, N.T.; Parker, B.J.; Bhat, A.; Rollo, B.; Razi, A.; Friston, K.J. In vitro neurons learn and exhibit sentience when embodied in a simulated game-world. *BioRxiv Preprint* 2021, doi:10.1101/2021.12.02.471005.
20. Raja, W.K.; Mungenast, A.E.; Lin, Y.T.; Ko, T.; Abdurrob, F.; Seo, J.; Tsai, L.H. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* 2016, *11*, e0161969, doi:10.1371/journal.pone.0161969.
21. Garcez, P.P.; Loiola, E.C.; Costa, R.M.d.; Higa, L.M.; Trindade, P.; Delvecchio, R.; Nascimento, J.M.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Rehen, S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *SCIENCE* 2016, *352*, 816-818, doi:10.1126/science.aaf6116.
22. Narayan, N.J.C.; Requena, D.; Lalazar, G.; Ramos-Espiritu, L.; Ng, D.; Levin, S.; Shebl, B.; Wang, R.; Hammond, W.J.; Saltsman, J.A., 3rd; Gehart, H.; Torbenson, M.S.; Clevers, H.; LaQuaglia, M.P.; Simon, S.M. Human liver organoids for disease modeling of fibrolamellar carcinoma. *Stem Cell Reports* 2022, *17*, 1874-1888, doi:10.1016/j.stemcr.2022.06.003.
23. Tomofuji, K.; Fukumitsu, K.; Kondo, J.; Horie, H.; Makino, K.; Wakama, S.; Ito, T.; Oshima, Y.; Ogiso, S.; Ishii, T.; Inoue, M.; Hatano, E. Liver ductal organoids reconstruct intrahepatic biliary trees in decellularized liver grafts. *Biomaterials* 2022, *287*, 121614, doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121614.
24. Sampaziotis, F.; de Brito, M.C.; Madrigal, P.; Bertero, A.; Saeb-Parsy, K.; Soares, F.A.C.; Schrupf, E.; Melum, E.; Karlsen, T.H.; Bradley, J.A.; Gelson, W.T.; Davies, S.; Baker, A.; Kaser, A.; Alexander, G.J.; Hannan, N.R.F.; Vallier, L. Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nat Biotechnol* 2015, *33*, 845-852, doi:10.1038/nbt.3275.
25. Ogawa, M.; Ogawa, S.; Bear, C.E.; Ahmadi, S.; Chin, S.; Li, B.; Grompe, M.; Keller, G.; Kamath, B.M.; Ghanekar, A. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2015, *33*, 853-861, doi:10.1038/nbt.3294.
26. Nunez-Nescolarde, A.B.; Nikolic-Paterson, D.J.; Combes, A.N. Human Kidney Organoids and Tubuloids as Models of Complex Kidney Disease. *Am J Pathol* 2022, *192*, 738-749, doi:10.1016/j.ajpath.2022.01.009.

27. Tekguc, M.; Gaal, R.C.V.; Uzel, S.G.M.; Gupta, N.; Riella, L.V.; Lewis, J.A.; Morizane, R. Kidney organoids: a pioneering model for kidney diseases. *Transl Res* 2022, doi:10.1016/j.trsl.2022.06.012.
28. Trush, O.; Takasato, M. Kidney organoid research: current status and applications. *Curr Opin Genet Dev* 2022, *75*, 101944, doi:10.1016/j.gde.2022.101944.
29. Takasato, M.; Er, P.X.; Chiu, H.S.; Maier, B.; Baillie, G.J.; Ferguson, C.; Parton, R.G.; Wolvetang, E.J.; Roost, M.S.; Chuva de Sousa Lopes, S.M.; Little, M.H. Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015, *526*, 564-568, doi:10.1038/nature15695.
30. McCracken, K.W.; Cata, E.M.; Crawford, C.M.; Sinagoga, K.L.; Schumacher, M.; Rockich, B.E.; Tsai, Y.H.; Mayhew, C.N.; Spence, J.R.; Zavros, Y.; Wells, J.M. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature* 2014, *516*, 400-404, doi:10.1038/nature13863.
31. Allam-Ndoul, B.; Begin, F.; Houde, A.; Di Marzo, V.; Veilleux, A.; Silvestri, c.; Flamand, N.; Tino co-Mar, B.A. Su1124 SMALL INTESTINE EPITHELIAL ORGANOIDS AS A MODEL TO INVESTIGATE THE ROLE OF THE ENDOCANNABINOIDOME ON INTESTINAL PARACELLULAR PERMEABILITY DURING INFLAMMATION. *Gastroenterology* 2020, *158*, doi:10.1016/s0016-5085(20)31975-2.
32. Hou, X.; Barthel, E.R.; Speer, A.L.; Levin, D.E.; Grant, C.N.; Spurrier, R.G.; Garcia, S.; Grikscheit, T.C. Small Intestine Organoid Units Can Be Maintained in Long-Term Culture without Exogenous Growth Factors, with Subsequent Formation of Tissue-Engineered Small Intestine. *Journal of Surgical Research* 2014, *186*, doi:10.1016/j.jss.2013.11.680.
33. Isani, M.A.; Schlieve, C.R.; Fowler, K.L.; Nucho, L.-M.A.; Grikscheit, T.C. Scaffold-Free Delivery of Organoid Units Forms Tissue-Engineered Intestine. *Journal of the American College of Surgeons* 2018, *227*, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2018.08.522.
34. Watson, C.L.; Mahe, M.M.; Munera, J.; Howell, J.C.; Sundaram, N.; Poling, H.M.; Schweitzer, J.I.; Vallance, J.E.; Mayhew, C.N.; Sun, Y.; Grabowski, G.; Finkbeiner, S.R.; Spence, J.R.; Shroyer, N.F.; Wells, J.M.; Helmrath, M.A. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* 2014, *20*, 1310-1314, doi:10.1038/nm.3737.
35. Spence, J.R.; Mayhew, C.N.; Rankin, S.A.; Kuhar, M.F.; Vallance, J.E.; Tolle, K.; Hoskins, E.E.; Kalinichenko, V.V.; Wells, S.I.; Zorn, A.M.; Shroyer, N.F.; Wells, J.M. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011, *470*, 105-109, doi:10.1038/nature09691.
36. Tucker, B.A.; Solivan-Timpe, F.; Roos, B.R.; Anfinson, K.R.; Robin, A.L.; Wiley, L.A.; Mullins, R.F.; Fingert, J.H. Duplication of TBK1 Stimulates Autophagy in iPSC-derived Retinal Cells from a Patient with Normal Tension Glaucoma. *J Stem Cell Res Ther* 2014, *3*, 161, doi:10.4172/2

157-7633.1000161.

37. Shimizu, T.; Mae, S.I.; Araoka, T.; Okita, K.; Hotta, A.; Yamagata, K.; Osafune, K. A novel ADP KD model using kidney organoids derived from disease-specific human iPSCs. *Biochemical and biophysical research communications* 2020, *529*, 1186-1194, doi:10.1016/j.bbrc.2020.06.141.
38. Shiihara, M.; Ishikawa, T.; Saiki, Y.; Omori, Y.; Hirose, K.; Fukushige, S.; Ikari, N.; Higuchi, R.; Yamamoto, M.; Morikawa, T.; Nakagawa, K.; Hayashi, H.; Mizuma, M.; Ohtsuka, H.; Motoi, F.; Unno, M.; Okamura, Y.; Kinoshita, K.; Furukawa, T. Development of a system combining comprehensive genotyping and organoid cultures for identifying and testing genotype-oriented personalized medicine for pancreaticobiliary cancers. *Eur J Cancer* 2021, *148*, 239-250, doi:10.1016/j.ejca.2021.01.047.
39. Yoshii, Y.; Waki, A.; Yoshida, K.; Kakezuka, A.; Kobayashi, M.; Namiki, H.; Kuroda, Y.; Kiyono, Y.; Yoshii, H.; Furukawa, T.; Asai, T.; Okazawa, H.; Gelovani, J.G.; Fujibayashi, Y. The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation. *Biomaterials* 2011, *32*, 6052-6058, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.076.
40. Yamazaki, H.; Gotou, S.; Ito, K.; Kohashi, S.; Goto, Y.; Yoshiura, Y.; Sakai, Y.; Yabu, H.; Shimomura, M.; Nakazawa, K. Micropatterned culture of HepG2 spheroids using microwell chip with honeycomb-patterned polymer film. *J Biosci Bioeng* 2014, *118*, 455-460, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.03.006.
41. Hurrell, T.; Ellero, A.A.; Masso, Z.F.; Cromarty, A.D. Characterization and reproducibility of HepG2 hanging drop spheroids toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro* 2018, *50*, 86-94, doi:10.1016/j.tiv.2018.02.013.
42. Snyman, C.; Elliott, E. An optimized protocol for handling and processing fragile acini cultured with the hanging drop technique. *Anal Biochem* 2011, *419*, 348-350, doi:10.1016/j.ab.2011.08.024.
43. Sun, B.; Zhao, Y.; Wu, W.; Zhao, Q.; Li, G. A superhydrophobic chip integrated with an array of medium reservoirs for long-term hanging drop spheroid culture. *Acta Biomater* 2021, doi:10.1016/j.actbio.2021.08.006.
44. Souza, G.R.; Molina, J.R.; Raphael, R.M.; Ozawa, M.G.; Stark, D.J.; Levin, C.S.; Bronk, L.F.; Ananta, J.S.; Mandelin, J.; Georgescu, M.M.; Bankson, J.A.; Gelovani, J.G.; Killian, T.C.; Arap, W.; Pasqualini, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 2010, *5*, 291-296, doi:10.1038/nnano.2010.23.
45. Yabe, S.G.; Fukuda, S.; Nishida, J.; Takeda, F.; Nashiro, K.; Okochi, H. Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture. *Regen Ther* 2019, *10*, 69-76, doi:10.1016/j.reth.2018.11.003.

46. Qian, X.; Nguyen, H.N.; Song, M.M.; Hadiono, C.; Ogden, S.C.; Hammack, C.; Yao, B.; Hamersky, G.R.; Jacob, F.; Zhong, C.; Yoon, K.J.; Jeang, W.; Lin, L.; Li, Y.; Thakor, J.; Berg, D.A.; Zhang, C.; Kang, E.; Chickering, M.; Nauen, D.; Ho, C.Y.; Wen, Z.; Christian, K.M.; Shi, P.Y.; Maher, B. J.; Wu, H.; Jin, P.; Tang, H.; Song, H.; Ming, G.L. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 2016, *165*, 1238-1254, doi:10.1016/j.cell.2016.04.032.
47. Hsiao, A.Y.; Torisawa, Y.S.; Tung, Y.C.; Sud, S.; Taichman, R.S.; Pienta, K.J.; Takayama, S. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 2009, *30*, 3020-3027, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.047.
48. Sebastian, A.; Buckle, A.M.; Markx, G.H. Tissue engineering with electric fields: immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnol Bioeng* 2007, *98*, 694-700, doi:10.1002/bit.21416.
49. Chen, K.; Wu, M.; Guo, F.; Li, P.; Chan, C.Y.; Mao, Z.; Li, S.; Ren, L.; Zhang, R.; Huang, T.J. Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab Chip* 2016, *16*, 2636-2643, doi:10.1039/c6lc00444j.
50. Aguilar, I.N.; Olivos, D.J., 3rd; Brinker, A.; Alvarez, M.B.; Smith, L.J.; Chu, T.G.; Kacena, M.A.; Wagner, D.R. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation. *Bioprinting* 2019, *15*, doi:10.1016/j.bprint.2019.e00050.
51. Daly, A.C.; Kelly, D.J. Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers. *Biomaterials* 2019, *197*, 194-206, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.12.028.
52. Awaja, F.; Gilbert, M.; Kelly, G.; Fox, B.; Pigram, P.J. Adhesion of polymers. *Progress in Polymer Science* 2009, *34*, 948-968, doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.007.
53. Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011, *29*, 739-767, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
54. Roina, Y.; Auber, F.; Hocquet, D.; Herlem, G. ePTFE functionalization for medical applications. *Materials Today Chemistry* 2021, *20*, doi:10.1016/j.mtchem.2020.100412.
55. Wang, H.; Kwok, D.T.; Wang, W.; Wu, Z.; Tong, L.; Zhang, Y.; Chu, P.K. Osteoblast behavior on polytetrafluoroethylene modified by long pulse, high frequency oxygen plasma immersion ion implantation. *Biomaterials* 2010, *31*, 413-419, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.066.
56. Cui, X.; Hartanto, Y.; Zhang, H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 2017, *14*, doi:10.1098/rsif.2016.0877.

## 2. スフェロイドの作製

本章では既存のスフェロイド作製手法の説明と、その課題を述べる。また、今後の創薬・再生医療の発展を目指し行われるスフェロイド・オルガノイド研究におけるスフェロイドに対する要求仕様を定義する。

### 2.1. 既存のスフェロイド作製法とその課題

従来の 3 次元培養法は、マイクロパターン強制浮遊法[39, 40]、ハンギングドロップ法[41-43]、旋回培養またはスピナーフラスコ法[44-52]、力駆動法[53-55]の 4 種類に大別される[56]。その他に、近年急速に発達している 3D プリンタを用いた技術や、温度応答性高分子を用いて細胞シートを回収し積層する手法もある。これらの既存の方法は、スフェロイドの寸法制御、細胞へのダメージや刺激の低減、簡単な手順、高い成功率、大量生産、高いスループット、低コストなどのそれぞれ優れた特徴を有するが、各要求事項に対し一長一短であり、これらの要件をすべて同時に満たすものは知られていない。

#### 2.1.1. マイクロパターン強制浮遊法

マイクロパターン強制浮遊法では、器材表面に形成したマイクロウェル内に播種した細胞が沈降し、その細胞が互いに接着することにより 3 次元的に接着するウェルプレート[20, 57, 58] (Figure 2-1 a)や、器材表面に微細な構造を形成することにより自発的に 3 次元的な細胞の接着を促すもの[59] (Figure 2-1b)、細胞の凝集を防ぐ低接着プレート[60]などが用いられている。これらを複合的に用いる機能性足場も多くみられる。マイクロ流体システムでは、マイクロパターンニングされた流路を用いた強制浮遊の一種で、標的細胞とマトリックス成分の両方を組み合わせ灌流させることで安定した培養が維持される[47, 61]。また、流速や液流の経路のデザインにより様々な試みが行われている。文献によってはバイオリアクターに分類されることもあり、スフェロイドを 1 つずつカスタムメイドするバイオリアクターとも言える(Figure 2-1c)。

これらの手法は加工されたプレートを用いるのみで簡便ではあるが、マイクロウェルでは底面の形状から顕微鏡での光学的な観察に影響があることや、低接着性のプレートでは 1 つのスフェロイドに対する細胞数がコントロールし難いなどが欠点と言える。

また、基板上へ細胞の接着/非接着面を形成する手法もある。代表的なものとして、大日本印刷株式会社の開発した CytoGraph®は国立成育医療研究センターとの共同研究においてミニ腸のオルガノイドの作製に成功している[62-65]。これは接着面上で増殖しコンフルエント状態になった後に鉛直方向へと三次元的に成長し、ある程度成長したところで自発的に千切れる形で細胞塊を形成する(Figure 2-1 d)。

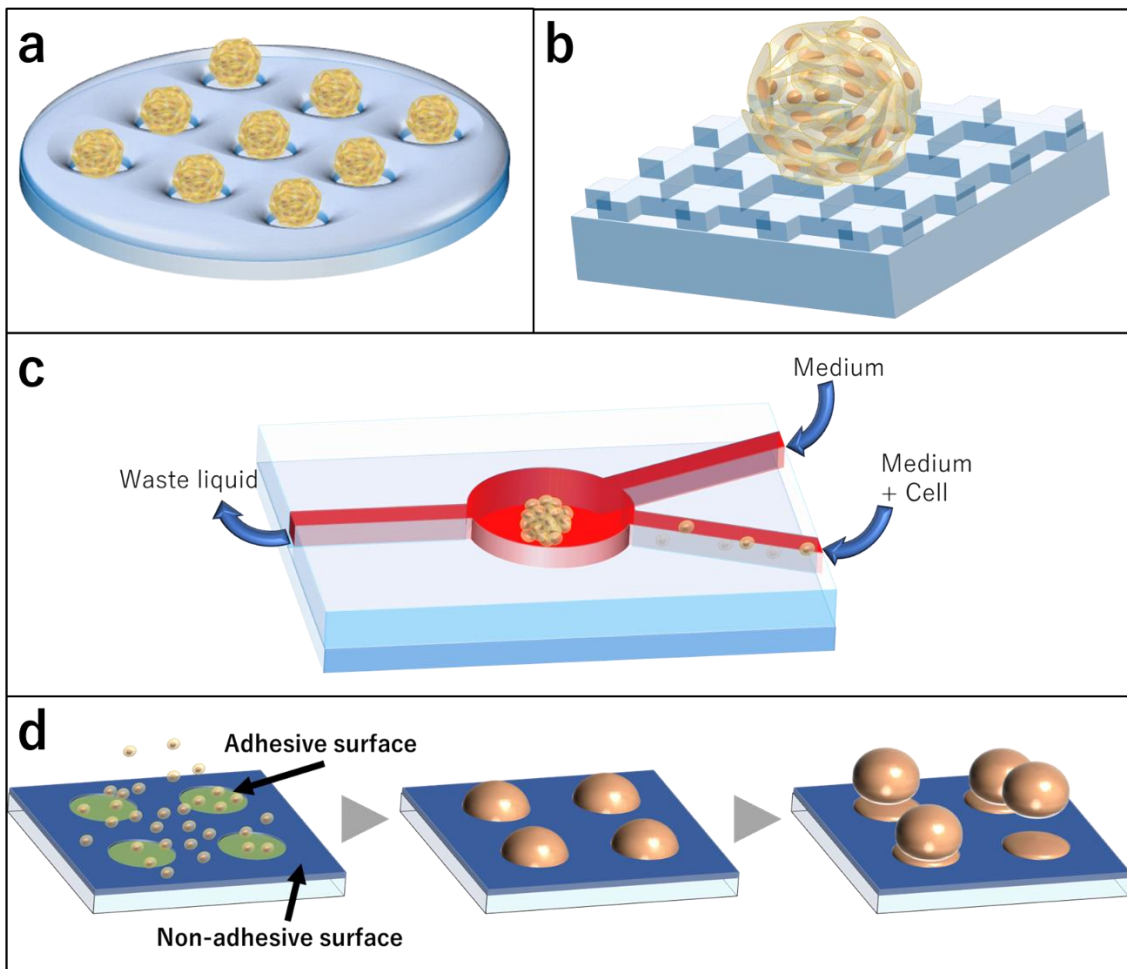


Figure 2-1: マイクロパターン強制浮遊法模式図 a: マイクロウェル、b: マイクロパターン、c: マイクロ流路、d: 選択的接着面

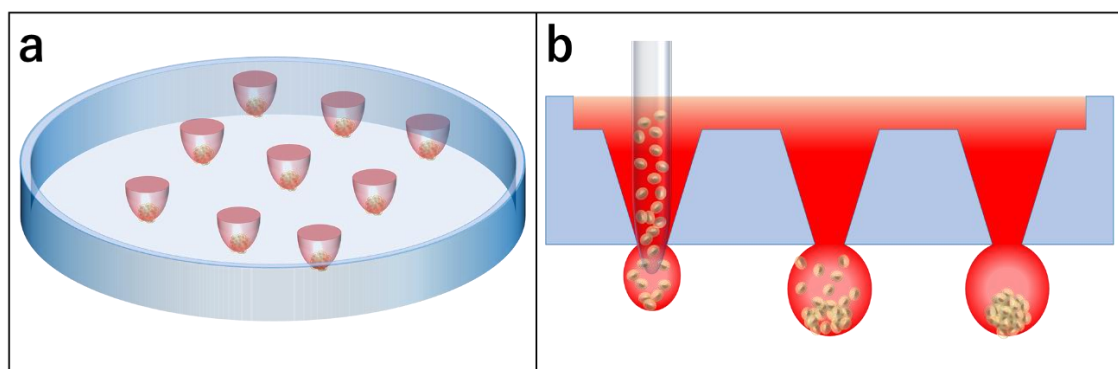
### 2.1.2. ハンギングドロップ法

ハンギングドロップ法は、培養液の表面張力を利用して液滴を形成し、気液界面をウェルとして利用するものである[43]。この手法では、酵素処理により分散した細胞懸濁液のドットを1つずつマイクロピペットを用いて培養ディッシュの蓋の内面に手作業で打っていくことにより作製する。器材として通常の培養ディッシュの蓋を活用することから、新たな設備導入は必要とせず、コスト面では有意な手法である。一方、このドットを打つ作業や、ドットを打った蓋を裏返す際の手技が非常に煩雑な作業であり、大量にスフェロイドを得ることが困難である。また、ドットには少量の培養液しかないので、細胞の長期培養には向かず、培養途中での分化誘導因子の添加などは困難である (Figure 2-2 a)。

近年ではこのような欠点を解消するために自動培養装置での使用を想定した貫通孔を有



するハンギングドロップ用培養プレートも研究されている[66, 67](Figure 2-2 b)。これらのプレートは、ピペットやニードルの先が貫通孔を突き抜けた状態で細胞懸濁液のドロップレットを形成し、そのまま貫通孔から引き抜くことによりプレートの天面にドロップレットが付着する。プレートを裏返す操作も無く、貫通孔を有するため培養液や成長因子の追加も想定されている。また、貫通孔の位置が決まっているため自動機の使用も可能なことから、高いスループットが可能になるため今後ハンギングドロップ法でのスフェロイドの大量生産技術として期待されるが、手軽な導入コストや汎用性などの従来のハンギングドロップ法として特筆されるメリットは無くなる。



**Figure 2-2:** ハンギングドロップ法模式図 a: シャーレ蓋を用いたハンギングドロップ法 b: ハンギングドロップ用貫通孔プレート

### 2.1.3. 旋回培養またはスピナーフラスコ法

スピナーフラスコや旋回培養（バイオリアクター）は、細胞を分散させた培養液を連続的に旋回・攪拌し、細胞同士の衝突・接触・凝集によりスフェロイド化する方法である。この方法では、予め細胞培養によって増やしておいた細胞を酵素処理によって分散し、大量の培養液を旋回している中に浮遊させる。この浮遊している細胞同士が接触することにより接着し、それを繰り返すことにより球状へと成長する。マイクロ流路[68]はマイクロパターン強制浮遊法でも取り上げたが、この方法もより小規模なバイオリアクターとして分類しても良いと考える(Figure 2-3)。

この手法では、簡便に大量のスフェロイドを得られるという利点がある。一方、培養液の旋回速度や細胞の播種密度によってある程度スフェロイドの径をコントロールできるとされている[69, 70]が、細胞の接触は確率的なものであり、播種した細胞が全て均一にスフェロイド化できるわけではなく、スフェロイド径のばらつきが最も小さな条件においても約 30%のばらつきと示されていることから[69]、ばらつきは大きいと考えられる。また、大量の培養液を要することや、培養液の灌流・旋回する器材が必要となるため、ランニングコスト・導入コスト面では高価となる傾向がある。

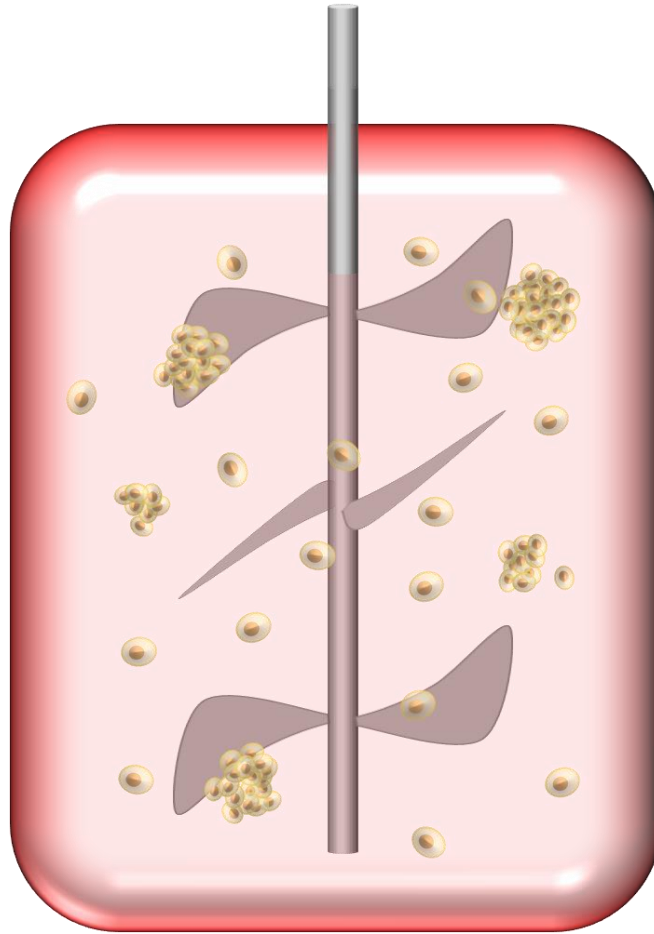


Figure 2-3: 旋回培養またはスピナーフラスコ法(バイオリアクタ模式図)

#### 2.1.4. フォースドリブン法

力駆動方式には、酸化鉄、金、ポリ-L-リジンなどのナノ粒子を細胞表面に付着させ、磁力によってスフェロイドを形成する磁気方式、電場などの外力を加える電気方式、音響ピンセット方式がある。

磁気方式は酸化鉄、金、ポリ-L-リジンなどのナノ粒子を細胞に付着させた状態で平面培養を行い、その後に永久磁石を用いて細胞を浮遊させた状態で培養を継続することにより細胞が自発的にスフェロイド化するというものである[44](Figure 2-4 a)。

電界方式は誘電泳動という方法を用いて電極の配置された特定の場所に細胞が集まるというものである。正の誘電泳動によって細胞が引き寄せられると互いに接着する傾向があると報告されている。[48](Figure 2-4 b)。

音響ピンセット方式[49]は、工業的にアクチュエータやセンサーとして使用される圧電素子の用途のうち、高周波用のフィルタとして利用される表面弾性波を用いて直交する音

波によって分散した細胞を局所的にとどめスフェロイド化する。マイクロ流路内に形成し、スフェロイド化しつつ流路を搬送し回収するという仕組みも見られる。現在は小規模なシステムのようなのであるが、工業的にスフェロイドを量産するという観点では注目される技術である(Figure 2-4 c)。

これらは工学的なアプローチとしてユニークで興味深いのが、装置自体のコストが高価になることや、それぞれの方式に用いているナノ粒子・電界・超音波力場の影響は明確ではなく、特に不要な分化を誘発する可能性のある iPS 細胞のスフェロイド化においては適さない可能性がある。

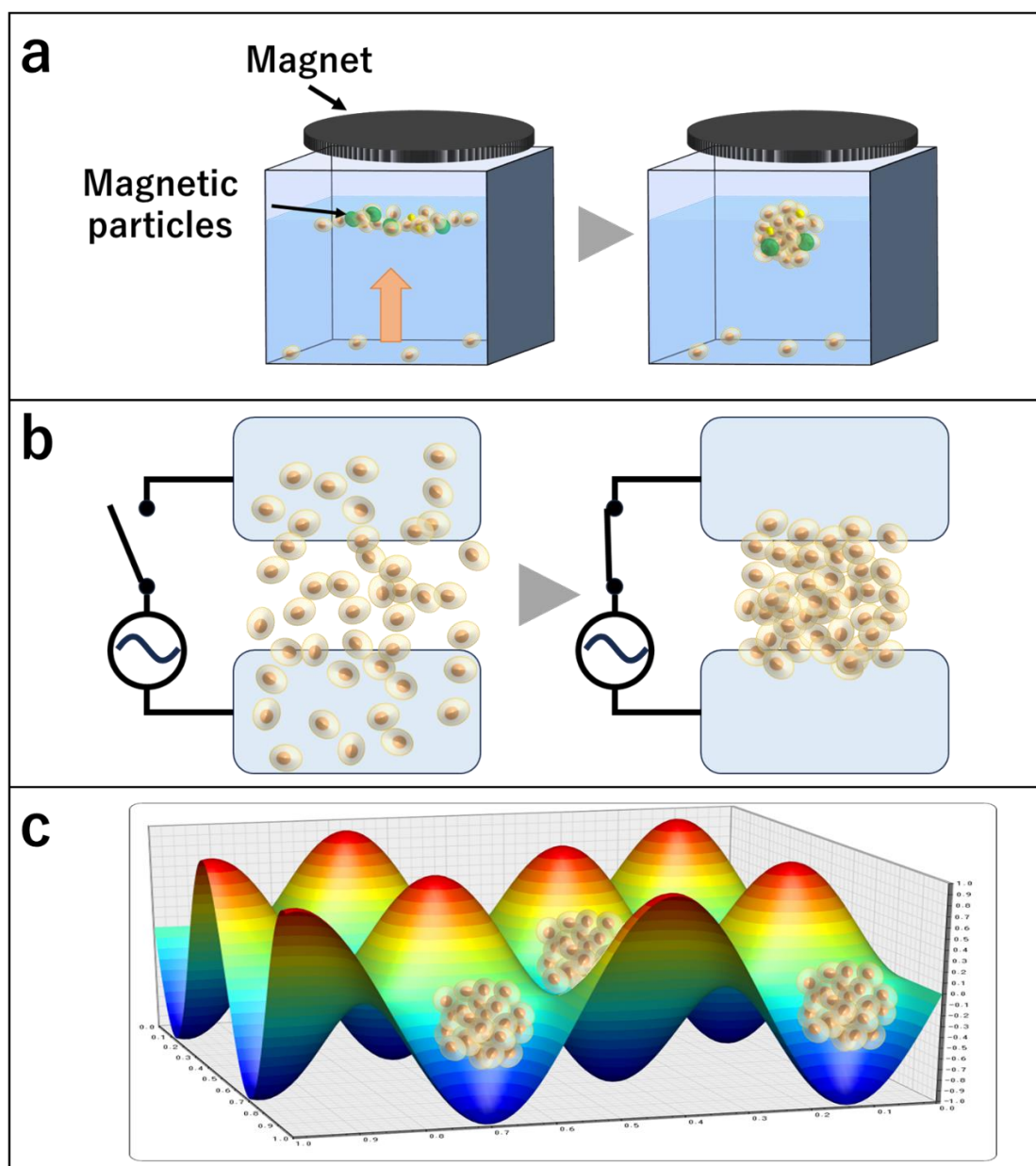


Figure 2-4: フォースドリブン法模式図 a: 磁気方式、b: 電界方式、c: 音響ピンセット方式

### 2.1.5. 3D プリンティング法

3D プリンティング技術は近年発達が目覚ましい技術である。培養の分野においても3D プリンティングは、組織工学のための強力なツールとして台頭してきている。複雑な3次元生体模倣構造内での3次元細胞培養を可能にすることで組織工学のための強力なツールになりつつあり、その手法は多岐にわたる。大きな分類として、インクジェット方式・光アシストバイオプリンティング方式・血管3Dプリンティング方式と分けられる[71]。

インクジェット方式は、3Dプリンティングにおいて最も一般的な手法である。主にゲル状の培養液に分散した細胞を混ぜたものをバイオインクとし、ハイドロゲル内にコンピュータ制御により射出し配列させる[72]。この手法では複数種の細胞を混在させ任意の場所に配置することも可能である。心臓の形状に印刷した例も報告されている[73](Figure 2-5 a)。

光アシストバイオプリンティング方式は、細胞を立体的に配置するための足場や細胞を内包したハイドロゲルを感光性の材料を用いて光で硬化させ形成する手法である[74, 75]。この手法は半導体加工に使用されるリソグラフィ技術の応用である。硬化に用いる波長はエネルギーの高い365nmや405nmの紫外波長を用いることが多いことから、この波長を用いての細胞入りのハイドロゲルを射出しながら硬化する手法は、細胞への影響が懸念される。しかし、立体的な足場を構成する手法としては、これらの技術を応用した光アシストバイオプリンティング方式は高速に微細な形状が実現可能になることが想定されるため更なる発展が期待される(Figure 2-5 b)。

ハイドロビーズ方式は、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ などの多価陽イオンによりゲル化する海藻から抽出された陰イオン性多糖類であるアルギン酸塩を用いてハイドロゲルのビーズを形成する[76]。この材料は天然のECMに類似していることから、アルギン酸ハイドロゲルは組織工学のための三次元細胞-ハイドロゲル足場や、アルギン酸ハイドロゲルビーズへの移植(同種または異種)細胞の封入に使用されている。マイクロ流路を用いてハイドロビーズの大きさを制御する検討が行われており、寸法制御されたハイドロビーズ内で細胞が増殖することにより、安定した寸法のスフェロイドの形成が期待される。

3Dプリンティングは手法・材料など様々なアプローチがされており、今後も注目される技術である。特に、CADでデザインした通りに組織化できることから、オーダーメイドの組織化が期待できる点では期待が高い。一方、タクトタイムが長いことから、バイオプリンティングには時間がかかり、射出圧やプリンティング・リザーバー内で細胞がストレスを受ける可能性があることが課題となる。また、器材の導入/ランニングコストは非常に高価なものになる。

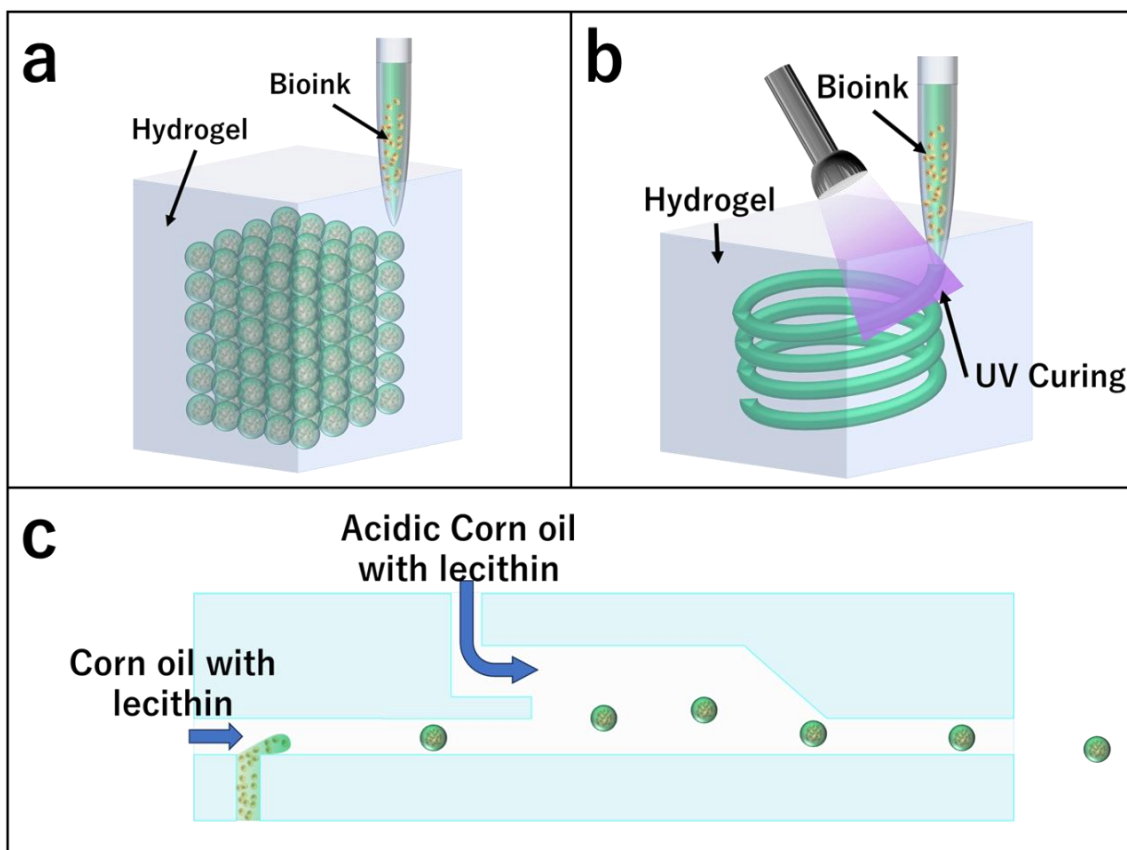


Figure 2-5: 3D プリンティング方式 a: インクジェット方式、b: 光アシストバイオプリンティング方式 c: ハイドロビーズ方式

## 2.2. その他の三次元培養手法

上記の様々な手法で作製したスフェロイドを用いてより大きな三次元構造を作製する実用例としてはKenzan 法[77]がある。この手法はオルガノイド作製のための手法であるが、剣山のように並んだ針にスフェロイドを刺し、3 次元的に配置していくことで組織化を目指す手法である。この手法は日本では 2020 年より国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)の委託事業治験も始まっており既に実用的な技術となりつつある(Figure 2-6)。

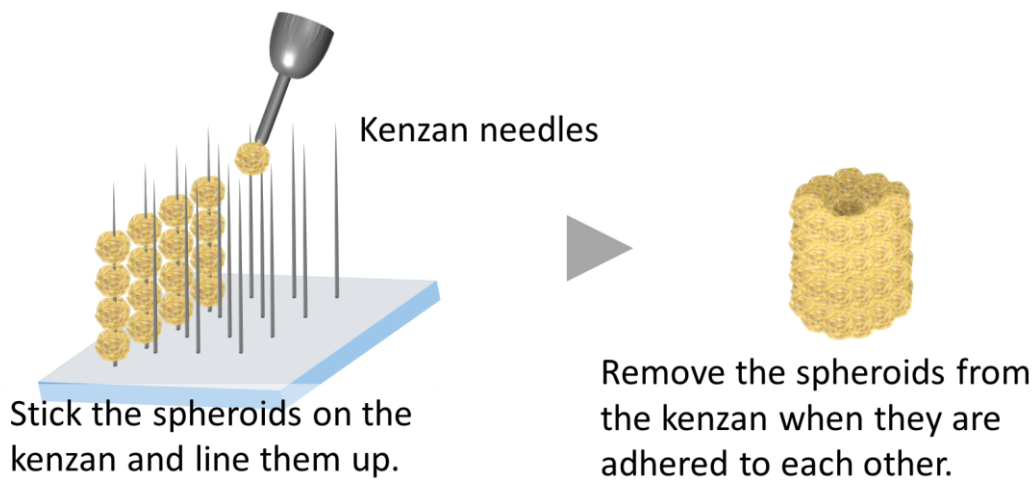


Figure 2-6: Kenzan 法による三次元構造作製の模式図

3D プリンティング方式では、血管網の作製に関する研究もおこなわれている。細胞の三次元化する中で課題となるスフェロイドやオルガノイドなどの内部への酸素の供給に対するアプローチである。生体内の酸素分布と性能を向上させるための手法として組織バイオプリンティングで、必要な位置に直接印刷する方法や、足場上に新生血管の形成を刺激する蛋白質である血管内皮増殖因子を添加または修飾することで血管の新生を促すものがよく見られる。他の方法としては、所望の血管網を犠牲的な構造体として形成し、その構造体を除去することで中空構造を形成する。培養液等に可溶性水溶性の構造材料として糖ガラスを用いて血管網を形成し、ハイドロゲル内で溶かすことにより形成した中空構造の内壁に細胞を接着し血管を形成する方法も報告されている[78](Figure 2-7)。

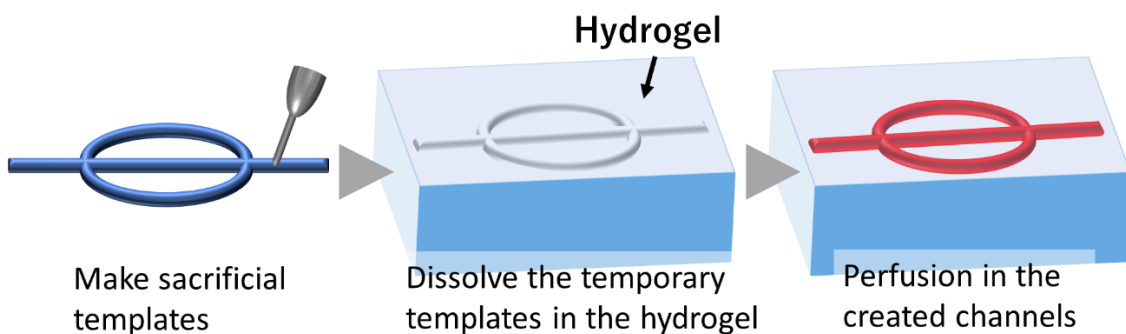


Figure 2-7: 血管の 3D プリンティング

温度応答性高分子による細胞シートの作製では、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) が用いられており、32°C以上の温度環境下では器材表面のポリマー鎖が凝縮し、疎水性の性質が強くなる。一方、32°C以下の温度環境下では表面のポリマー鎖は水分子と水和し、32°C以上の温度の時と比較して親水性を示す[79-82]。一般的に細胞は適度な

疎水性表面に付着しやすく、親水性表面に付着しないため、酵素を使用せずに温度により細胞の接着性をコントロールする方法である。一時的に温度を 32°C以下に低下することにより、細胞の接着する基板表面状態が変化し、親水性へと変化する (Figure 2-8)ため、細胞が剥離する。温度のコントロールのみで細胞の剥離が可能であるため、非常に簡便な方法ではあるが、細かなパターンニングなどは不向きであることから、細胞シートなど、大面積の平面培養向きと言えるだろう。

また、32°Cという温度は、容積の小さなディッシュを用いて行う培養において、培地交換などの際にインキュベータから取り出すと容易に到達してしまう温度でもある。そのため、灌流装置での培地交換システムや、ハンドリング時の温度のケアが必要となる点で初期の導入コストが高くなる。

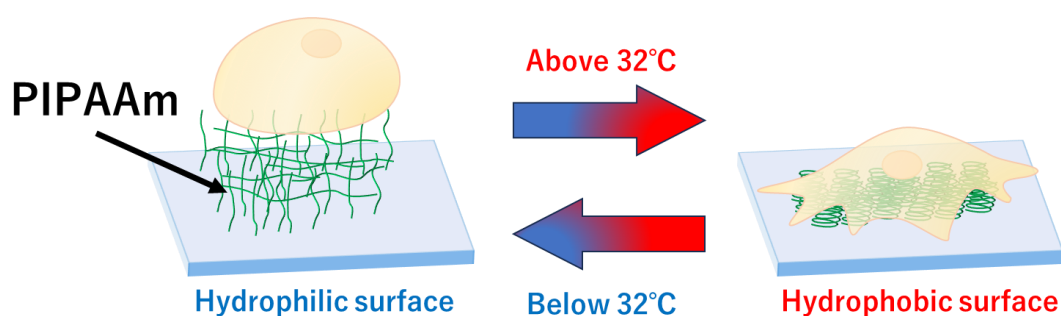


Figure 2-8: 温度応答性高分子による培養

### 2.3. スフェロイド作製手法に求められる仕様

前節に挙げた多くの手法は便宜的に分類しているが、これらの多くはそれぞれの手法の利点を複合的に活用し、効率的にスフェロイドを得ようと試みている。しかしながら、Table 2-1 に示すように大量に均質のスフェロイドを量産しようとした場合に、全ての要件を満たす手法は無かった。これらの多くの手法ではスフェロイド化への工程において、ディッシュで増殖した細胞に対して酵素処理を行い、一旦分散した細胞を各手法により凝集させるプロセスとなっている。そのため、酵素処理により細胞表面のタンパクが破壊された状態での凝集となる。通常の二次元細胞培養においては、酵素処理による分散は継代するうえで欠かせず、問題になることは少ない。しかし、分化誘導を伴う実験系においては、誘導因子により形成されつつある極性が破壊されると考えられ、分化誘導の成功率が低くなる一因と考えられている。一方、スフェロイドの状態で行った場合、内部の細胞へ誘導因子の影響が及ばず、均一な分化誘導が出来ないという課題がある [83]。したがって、iPS 細胞などの幹細胞においては、平面状態で分化誘導を行った後に、酵素処理を用いずにスフェロイドを形成するプロセスが望ましいと考える。

また、iPS 細胞においては温度・化学物質・細胞の密度など様々な刺激が分化誘導のトリガーとなり得る。そのため、未分化性の維持が確立されている細胞培養プロセスに存在

しない刺激を排除することにより不用意な分化誘導を防ぐこともスフェロイドの作製手法に求められる重要な要素となる。

高額専用機器の導入の必要性や、ランニングコストの増大も研究への新規参入や臨床応用を妨げる大きな障壁となると考えられる。

また既存の工法では、スフェロイドの寸法制御、細胞へのダメージや刺激の低減、手技の簡便さ、高い成功率、大量生産、高いスループット、低コストなどの優れた特徴を示すが、これらの要件の全てを同時に満たすものは確認できていない。これらの仕様は全てスフェロイド/オルガノイド研究においては重要な仕様である。したがって、我々はスフェロイドの寸法制御、細胞へのダメージや刺激の低減、手技の簡便さ、高い成功率、大量生産、高いスループット、低コストを全て満たす新たなスフェロイド培養手法を開発する。

Table 2-1: 各培養手法におけるメリット/デメリット

手法	手技の簡便さ	コスト		再現性 (サイズコントロール性)	生産性		刺激	
		設備導入	消耗品		培養工数	回収数		
マイクロパターン 強制浮遊法 ※マイクロ流路を除く	○	◎	○	○	○	△	△ ・酵素処理	
ハンギングドロップ法 ※プレートを除く	×	◎	◎	△	○	△	△ ・酵素処理	
旋回培養または スピナーフラスコ法	○	×	×	○	△	◎	△ ・酵素処理	
フォースドリブン法	○	×	△	○	△	△	×	・酵素処理 ・電界 ・圧力変化
3Dプリンティング	○	×	×	◎	×	×	×	・酵素処理 ・射出圧 ・成形時間

## 2.4. 参考文献

20. Raja, W.K.; Mungenast, A.E.; Lin, Y.T.; Ko, T.; Abdurrob, F.; Seo, J.; Tsai, L.H. Self-Organizing 3 D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* 2016, *11*, e0161969, doi:10.1371/journal.pone.0161969.
39. Yoshii, Y.; Waki, A.; Yoshida, K.; Kakezuka, A.; Kobayashi, M.; Namiki, H.; Kuroda, Y.; Kiyono, Y.; Yoshii, H.; Furukawa, T.; Asai, T.; Okazawa, H.; Gelovani, J.G.; Fujibayashi, Y. The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation. *Biomaterials* 2011, *32*, 6052-6058, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.076.
40. Yamazaki, H.; Gotou, S.; Ito, K.; Kohashi, S.; Goto, Y.; Yoshiura, Y.; Sakai, Y.; Yabu, H.; Shimomura, M.; Nakazawa, K. Micropatterned culture of HepG2 spheroids using microwell chip with



- honeycomb-patterned polymer film. *J Biosci Bioeng* 2014, *118*, 455-460, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.03.006.
41. Hurrell, T.; Ellero, A.A.; Masso, Z.F.; Cromarty, A.D. Characterization and reproducibility of Hep G2 hanging drop spheroids toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro* 2018, *50*, 86-94, doi:10.1016/j.tiv.2018.02.013.
  42. Snyman, C.; Elliott, E. An optimized protocol for handling and processing fragile acini cultured with the hanging drop technique. *Anal Biochem* 2011, *419*, 348-350, doi:10.1016/j.ab.2011.08.024.
  43. Sun, B.; Zhao, Y.; Wu, W.; Zhao, Q.; Li, G. A superhydrophobic chip integrated with an array of medium reservoirs for long-term hanging drop spheroid culture. *Acta Biomater* 2021, doi:10.1016/j.actbio.2021.08.006.
  44. Souza, G.R.; Molina, J.R.; Raphael, R.M.; Ozawa, M.G.; Stark, D.J.; Levin, C.S.; Bronk, L.F.; Ananta, J.S.; Mandelin, J.; Georgescu, M.M.; Bankson, J.A.; Gelovani, J.G.; Killian, T.C.; Arap, W.; Pasqualini, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 2010, *5*, 291-296, doi:10.1038/nnano.2010.23.
  45. Yabe, S.G.; Fukuda, S.; Nishida, J.; Takeda, F.; Nashiro, K.; Okochi, H. Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture. *Regen Ther* 2019, *10*, 69-76, doi:10.1016/j.reth.2018.11.003.
  46. Qian, X.; Nguyen, H.N.; Song, M.M.; Hadiono, C.; Ogden, S.C.; Hammack, C.; Yao, B.; Hamersky, G.R.; Jacob, F.; Zhong, C.; Yoon, K.J.; Jeang, W.; Lin, L.; Li, Y.; Thakor, J.; Berg, D.A.; Zhang, C.; Kang, E.; Chickering, M.; Nauen, D.; Ho, C.Y.; Wen, Z.; Christian, K.M.; Shi, P.Y.; Maher, B. J.; Wu, H.; Jin, P.; Tang, H.; Song, H.; Ming, G.L. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 2016, *165*, 1238-1254, doi:10.1016/j.cell.2016.04.032.
  47. Hsiao, A.Y.; Torisawa, Y.S.; Tung, Y.C.; Sud, S.; Taichman, R.S.; Pienta, K.J.; Takayama, S. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 2009, *30*, 3020-3027, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.047.
  48. Sebastian, A.; Buckle, A.M.; Markx, G.H. Tissue engineering with electric fields: immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnol Bioeng* 2007, *98*, 694-700, doi:10.1002/bit.21416.
  49. Chen, K.; Wu, M.; Guo, F.; Li, P.; Chan, C.Y.; Mao, Z.; Li, S.; Ren, L.; Zhang, R.; Huang, T.J. Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab Chip* 2016, *16*, 2636-2643, doi:10.1039/c6lc00444j.
  50. Aguilar, I.N.; Olivos, D.J., 3rd; Brinker, A.; Alvarez, M.B.; Smith, L.J.; Chu, T.G.; Kacena, M.A.; Wagner, D.R. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation. *Bioprinting* 2019, *15*, doi:10.1016/j.

bprint.2019.e00050.

51. Daly, A.C.; Kelly, D.J. Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers. *Biomaterials* 2019, *197*, 194-206, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.12.028.
52. Awaja, F.; Gilbert, M.; Kelly, G.; Fox, B.; Pigram, P.J. Adhesion of polymers. *Progress in Polymer Science* 2009, *34*, 948-968, doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.007.
53. Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011, *29*, 739-767, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
54. Roina, Y.; Auber, F.; Hocquet, D.; Herlem, G. ePTFE functionalization for medical applications. *Materials Today Chemistry* 2021, *20*, doi:10.1016/j.mtchem.2020.100412.
55. Wang, H.; Kwok, D.T.; Wang, W.; Wu, Z.; Tong, L.; Zhang, Y.; Chu, P.K. Osteoblast behavior on polytetrafluoroethylene modified by long pulse, high frequency oxygen plasma immersion ion implantation. *Biomaterials* 2010, *31*, 413-419, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.066.
56. Cui, X.; Hartanto, Y.; Zhang, H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 2017, *14*, doi:10.1098/rsif.2016.0877.
57. Nakayama, T.; Otsuka, S.; Kobayashi, T.; Okajima, H.; Matsumoto, K.; Hagiya, Y.; Inoue, K.; Shuin, T.; Nakajima, M.; Tanaka, T.; Ogura, S.I. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Sci Rep* 2016, *6*, 36478, doi:10.1038/srep36478.
58. Fukuda, J.; Khademhosseini, A.; Yeo, Y.; Yang, X.; Yeh, J.; Eng, G.; Blumling, J.; Wang, C.F.; Kohane, D.S.; Langer, R. Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. *Biomaterials* 2006, *27*, 5259-5267, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.044.
59. Kim, S.J.; Park, J.; Byun, H.; Park, Y.W.; Major, L.G.; Lee, D.Y.; Choi, Y.S.; Shin, H. Hydrogels with an embossed surface: An all-in-one platform for mass production and culture of human adipose-derived stem cell spheroids. *Biomaterials* 2019, *188*, 198-212, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.10.025.
60. Takeoka, Y.; Yurube, T.; Morimoto, K.; Kunii, S.; Kanda, Y.; Tsujimoto, R.; Kawakami, Y.; Fukase, N.; Takemori, T.; Omae, K.; Kakiuchi, Y.; Miyazaki, S.; Kakutani, K.; Takada, T.; Nishida, K.; Fukushima, M.; Kuroda, R. Reduced nucleotomy-induced intervertebral disc disruption through spontaneous spheroid formation by the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCOL). *Biomaterials* 2020, *235*, 119781, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119781.
61. Marrazzo, P.; Pizzuti, V.; Zia, S.; Sargenti, A.; Gazzola, D.; Roda, B.; Bonsi, L.; Alviano, F. Microfluidic Tools for Enhanced Characterization of Therapeutic Stem Cells and Prediction of Their Potential Antimicrobial Secretome. *Antibiotics (Basel)* 2021, *10*, doi:10.3390/antibiotics10070

750.

62. Sasaki, K.; Inoue, M.; Machida, M.; Kawasaki, T.; Tsuruta, S.; Uchida, H.; Sakamoto, S.; Kasahara, M.; Umezawa, A.; Akutsu, H. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as a Model of Intestinal Xenobiotic Metabolism. *StemJournal* 2021, *3*, 1-10, doi:10.3233/stj-200001.
63. Tsuruta, S.; Uchida, H.; Akutsu, H. Intestinal Organoids Generated from Human Pluripotent Stem Cells. *JMA J* 2020, *3*, 9-19, doi:10.31662/jmaj.2019-0027.
64. Inoue, M.; Tanaka, Y.; Matsushita, S.; Shimozaki, Y.; Ayame, H.; Akutsu, H. Xenogeneic-Free Human Intestinal Organoids for Assessing Intestinal Nutrient Absorption. *Nutrients* 2022, *14*, doi:10.3390/nu14030438.
65. Uchida, H.; Machida, M.; Miura, T.; Kawasaki, T.; Okazaki, T.; Sasaki, K.; Sakamoto, S.; Ohuchi, N.; Kasahara, M.; Umezawa, A.; Akutsu, H. A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight* 2017, *2*, e86492, doi:10.1172/jci.insight.86492.
66. Hsiao, A.Y.; Tung, Y.C.; Qu, X.; Patel, L.R.; Pienta, K.J.; Takayama, S. 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol Bioeng* 2012, *109*, 1293-1304, doi:10.1002/bit.24399.
67. Aijian, A.P.; Garrell, R.L. Digital microfluidics for automated hanging drop cell spheroid culture. *J Lab Autom* 2015, *20*, 283-295, doi:10.1177/2211068214562002.
68. Miwa, T.; Idiris, A.; Kumagai, H. A novel cardiac differentiation method of a large number and uniformly-sized spheroids using microfabricated culture vessels. *Regen Ther* 2020, *15*, 18-26, doi:10.1016/j.reth.2020.04.008.
69. Borys, B.S.; Le, A.; Roberts, E.L.; Dang, T.; Rohani, L.; Hsu, C.Y.; Wyma, A.A.; Rancourt, D.E.; Gates, I.D.; Kallos, M.S. Using computational fluid dynamics (CFD) modeling to understand murine embryonic stem cell aggregate size and pluripotency distributions in stirred suspension bioreactors. *J Biotechnol* 2019, *304*, 16-27, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.08.002.
70. Martin, Y.; Vermette, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 2005, *26*, 7481-7503, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.057.
71. Zhu, W.; Ma, X.; Gou, M.; Mei, D.; Zhang, K.; Chen, S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2016, *40*, 103-112, doi:10.1016/j.copbio.2016.03.014.
72. Heid, S.; Boccaccini, A.R. Advancing bioinks for 3D bioprinting using reactive fillers: A review. *Acta Biomater* 2020, *113*, 1-22, doi:10.1016/j.actbio.2020.06.040.
73. Noor, N.; Shapira, A.; Edri, R.; Gal, I.; Wertheim, L.; Dvir, T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci* 2019, *6*, 1900344, doi:10.1002/advs.201900344.
74. Zhu, W.; Holmes, B.; Glazer, R.I.; Zhang, L.G. 3D printed nanocomposite matrix for the study of

- f breast cancer bone metastasis. *Nanomedicine* 2016, *12*, 69-79, doi:10.1016/j.nano.2015.09.010.
75. Guillaume, O.; Kopinski-Grunwald, O.; Weisgrab, G.; Baumgartner, T.; Arslan, A.; Whitmore, K.; Van Vlierberghe, S.; Ovsianikov, A. Hybrid spheroid microscaffolds as modular tissue units to build macro-tissue assemblies for tissue engineering. *Acta Biomater* 2023, *165*, 72-85, doi:10.1016/j.actbio.2022.03.010.
76. Tan, W.H.; Takeuchi, S. Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. *Advanced Materials* 2007, *19*, 2696-2701, doi:10.1002/adma.200700433.
77. Aguilar, I.N.; Smith, L.J.; Olivos, D.J., 3rd; Chu, T.G.; Kacena, M.A.; Wagner, D.R. Scaffold-free Bioprinting of Mesenchymal Stem Cells with the Regenova Printer: Optimization of Printing Parameters. *Bioprinting* 2019, *15*, doi:10.1016/j.bprint.2019.e00048.
78. Bégin-Drolet, A.; Dussault, M.-A.; Fernandez, S.A.; Larose-Dutil, J.; Leask, R.L.; Hoesli, C.A.; Ruel, J. Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications. *Additive Manufacturing* 2017, *15*, 29-39, doi:10.1016/j.addma.2017.03.006.
79. 秋山義勝; 岡野光夫. 細胞シート工学を支える温度応答性細胞培養表面の設計と特性. *高分子論文集* 2018, *75*, 174-186, doi:10.1295/koron.2017-0078.
80. Tang, L.; Wang, L.; Yang, X.; Feng, Y.; Li, Y.; Feng, W. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications. *Progress in Materials Science* 2021, *115*, doi:10.1016/j.pmatsci.2020.100702.
81. Takahashi, H.; Shimizu, T.; Nakayama, M.; Yamato, M.; Okano, T. The use of anisotropic cell sheets to control orientation during the self-organization of 3D muscle tissue. *Biomaterials* 2013, *34*, 7372-7380, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.033.
82. Kim, S.J.; Byun, H.; Lee, S.; Kim, E.; Lee, G.M.; Huh, S.J.; Joo, J.; Shin, H. Spatially arranged encapsulation of stem cell spheroids within hydrogels for the regulation of spheroid fusion and cell migration. *Acta Biomater* 2022, *142*, 60-72, doi:10.1016/j.actbio.2022.01.047.
83. Takeuchi, H.; Nakatsuji, N.; Suemori, H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep* 2014, *4*, 4488, doi:10.1038/srep04488.

### 3. フッ素樹脂と選択的接着足場としての活用

選択的接着足場の研究は細胞の挙動を理解するための基礎研究から、意図した場所に細胞を配置し、機能性を得ようとするもの、また三次元的な細胞の増殖成長を目論むものなど、多岐にわたる研究が行われてきた。我々も過去に電子サイクロトロン共鳴(ECR: Electron Cyclotron Resonance)を用いてポリテトラフルオロエチレン(PTFE: polytetrafluoroethylene)の表面改質を行い、神経回路網や血管パターンの形成を試みている[84, 85]。当時は我々も他の手法同様に PTFE の表面改質により接着性を向上し、細胞の選択的吸着面の形成を行っていた。その過程で ECM を用いることにより、本来細胞が接着しないと想定していた非改質面にも細胞が接着することを確認し、フッ素樹脂上に成膜された ECM はフッ素樹脂に対し弱い細胞接着性を示すことを見出した。後述する PTFE の物性からその接着機序はファンデルワールス力によるものと推定された。また、この際に使用したのがマウス胎児脳の実質細胞であったが、樹状細胞軸索の成長は確認できたが、グリア細胞などの支持細胞が確認できなかった。この結果より、細胞間接着の張力が強いと PTFE との接着力を上回り自発的に剥がれるという仮説に至った。

PTFE の弱い細胞接着性は、足場上に細胞を保持し続けられないという点で、足場上へ播種後増殖成長する過程で様々な機能性を目論む細胞培養足場研究において致命的な欠陥と言える。しかし、我々はこの『弱い接着』を逆手に取り、接着・増殖後に剥がすという利用方法の可能性を見出だした。

フッ素樹脂は PTFE に代表されるフッ素原子を含むプラスチック原料の総称である。分子構造の違いにより特徴が異なるが、総じて耐熱耐寒性・低摩擦性・撥水撥油性・非粘着性・耐薬品性・電気絶縁性などの機械的/化学的に多岐にわたる優れた特性を有していることから、一般的なフライパンの焦げ付き防止から、工学的には摺動部の滑り改善や金型の剥離性向上など多くの分野で広く使用されている。

また、生物学的分野では一般的に細胞接着が接着しない材料として認知されている。生体適合性が高く不活性であるため非常に安定であり、生体内で使用する材料としては無毒で安全なことから、フッ素樹脂は体内に留置する人工血管[86-90]にも使用されている。しかし、その高い不活性な性質が細胞接着を妨げ、生体材料との親和性が低い原因となっている。

医療や細胞培養の分野では高い生体適合性と不活性な性質を利用するために、欠点となる生体親和性を向上する様々な表面改質が研究されてきた [54]。フッ素樹脂表面への接着性を向上させるために、プラズマ処理 [86, 90, 91]、UV 照射[92-94]、 $\gamma$  線照射[95, 96]、イオン導入[97-99]、ポリドーパミン処理[100-102]、レーザー照射[103-105]など様々な試みが行われている。

我々は既存の手法とは異なり、フッ素樹脂の表面改質を行わずにその特性を活かし、細胞を長期的に保持するのではなく、ある一定期間で剥離・回収するという用途で使用する

ことで、自発的な凝集を促しスフェロイドを作製する基板として利用する方法を提案する。

本章では、細胞の選択的接着と剥離に寄与する ECM とフッ素樹脂の特性について説明する。

### 3.1. 細胞外マトリックス(ECM: Extracellular Matrix)

ECM は動物/植物を問わず、細胞の外に存在する不溶性の糖とタンパク質の複合物質である。細胞間の隙間を埋める物質で、物理的に組織を支持するなど、細胞を取り囲むことにより細胞が生存するための環境を形成している。特に結合組織においては組織と組織を結び付け生体組織を支持する役割を果たすことから、細胞間を大量の細胞外マトリックスが埋めている。また、接着以外にも ECM 分子は移動、増殖、分化、生存などの主要な細胞事象の制御において重要な機能的役割を示す。[106]

### 3.2. 細胞の足場への接着機序

細胞が足場へ接着するためには、ECM が重要な役割を果たす。細胞膜表面にはインテグリンと呼ばれるレセプターが存在する。インテグリンには多くの種類が存在し、その型によって特異的に ECM と接着するため、細胞の種類ごとに ECM との相性が発生する。インテグリンにフィブロネクチンやラミニンなどの ECM が接着し、さらにこれらの ECM がプラズマ等で表面処理を施されたプラスチックディッシュ表面へ接着する。細胞接着では一般的に親水性に偏っても、疎水性に偏っても、ともに細胞の接着性は低下すると言われており、水の接触角において 60~70 度の表面が最も細胞の接着性が良いとされる。細胞培養に用いられるポリスチレン製のディッシュ表面では 100 度以上の接触角を示す高い疎水性表面であることから、プラズマ処理が施され、細胞の接着性が向上されている。このように、細胞の接着においては足場となる器材表面性情が接着性を制御する重要な要素となる。

### 3.3. フッ素樹脂の特性

フッ素樹脂の特徴として高い撥水・撥油性、低摩擦性、耐薬品性、非粘着性がある。フッ素樹脂の特徴である C-F 結合エネルギーは 116kcal/mol と非常に高い値を示す。これは C-H 結合エネルギーの 99kcal/mol, C-O 結合エネルギーの 88kcal/mol と比較しても高いことに加え、特に PTFE の分子では、炭素原子が螺旋状に並んだフッ素原子に密に覆われた構造となるため水素結合・イオン結合・共有結合といった化学的な結合が起こりにくいことに由来する。(Figure 3-1)

化学的に安定な性質を持ち、細胞が接着しないと一般的に認識されるフッ素樹脂であるが、我々の先行研究において ECM を介することにより細胞を弱く接着させることができ

ることを確認している[84]。

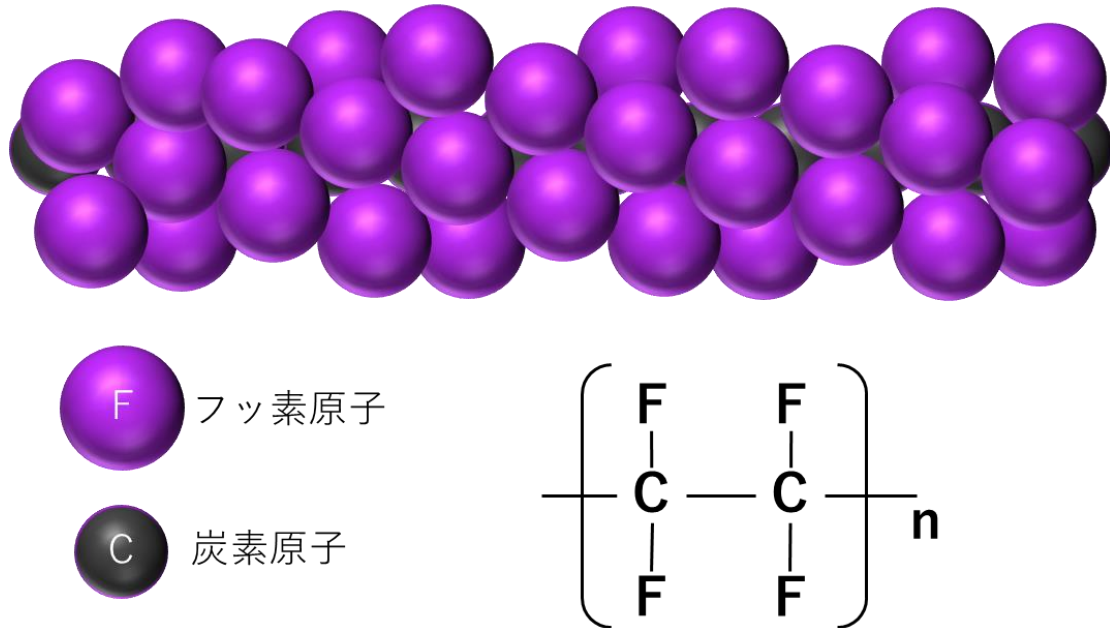


Figure 3-1: PTFE の分子構造模式図

#### 3.4. フッ素樹脂表面改質による既存の細胞接着法

フッ素樹脂はその優れた化学的性質よりもたらされる生体適合性を有し、その性質を活用するために、細胞培養足場の研究においては様々な表面改質によるアプローチが取られてきた。プラズマ処理 [86, 90, 91]、UV 照射[92-94]、 $\gamma$  線照射[95, 96]、イオン導入[97-99]、ポリドーパミン処理[100-102]、レーザー照射[103-105]などの様々な手法が研究されている。これらの手法の多くは一部表面形状による濡れ性へのアプローチ[98, 104, 105]はあるが、それ以外の多くは、高エネルギーを印加することにより強力な C-F 結合を切断し接着性を向上させる官能基を付加する (Figure 3-2)。ヒドロキシ基(-OH)やアミノ基(-NH<sub>2</sub>)など、処理時の雰囲気ガスや塗布する薬品によって様々な官能基が付加される。これによって、親水性や結合エネルギーの低下により化学的な結合が可能になるため細胞の接着性が向上する。

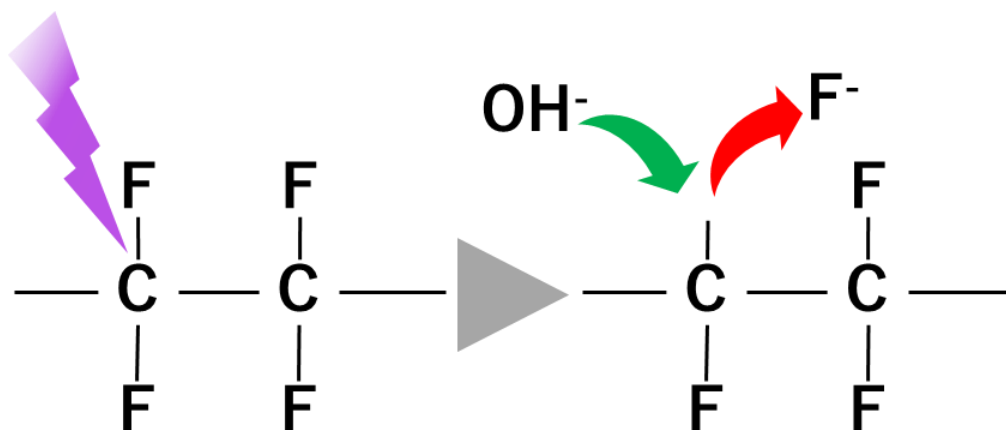


Figure 3-2: フッ素原子置換の模式図

### 3.5. フッ素樹脂による選択的細胞接着と細胞の剥離

スフェロイド形成において重要なスフェロイド径のコントロールには、そのスフェロイドを形成する細胞の数を制御することが効果的である。既存のスフェロイド作製手法においては酵素処理を行い分散した細胞を播種する。そのため、細胞膜表面の基質に一時的なダメージを負う。その過程で死ぬ細胞が生じ混入することや、iPS 細胞等の幹細胞においては分化誘導し極性を生じ始めている細胞の極性を破壊する可能性も示唆されている。

また、スフェロイド化した状態から分化誘導を行った場合においては内部まで誘導の影響が及ばず、意図した分泌能が得られないことも示唆されている[83]。

したがって、本研究ではスフェロイド化する細胞の数をコントロールするために、要求仕様として 2 つの機能を定義した。①選択的な接着面を構成し平面培養を行い、その面積で細胞数をコントロールする。②平面培養した二次元コロニーを酵素処理無く剥離し、スフェロイド化する。この 2 つの機能を両立する基板としてフッ素樹脂の表面に ECM をパターンニングしたスフェロイド作製のための新たな細胞培養足場を開発する。

このフッ素樹脂基板では、前項で示したようなフッ素樹脂の表面改質は行わない。フッ素樹脂上に表面改質を行うと恒久的に細胞が接着可能な面が形成され、細胞が強固に接着する。通常接着性の細胞培養においては細胞の接着強度は高い方が良いが、本手法では二次元コロニーまで成長させたのちに剥離することに重点を置いているため、高い接着強度はデメリットとなる。過去の我々の検討結果から、ECM を用いることにより、表面改質未処理のフッ素樹脂表面でも細胞を弱く接着させることが可能であることを確認できている[84]。細胞は一旦接着した後、ECM をパターンニングした領域で増殖するが、ECM とフッ素樹脂間の接着は非常に弱いため、ピペッティングなどの弱い水流や、細胞同士の張力が基板との接着力を上回ることにより、容易に剥離可能と想定した。



### 3.6. 基板へのフッ素樹脂加工方法

本研究における基板としては、PTFE ではなく、ガラス基板に非晶質のフッ素樹脂をコートして用いる。結晶性樹脂の PTFE はその結晶性に由来する光学的特性により透明性が低い。そのため、一般的に細胞培養に用いられる透過型の顕微鏡では播種後の経過観察ができない。この課題は細胞の挙動・成長を確認し分化誘導など様々な操作において多くの不都合を生じる。この課題に対して、PTFE には劣るが 높은撥水性や化学的な安定性を有しつつ、非晶質であることから得られる透明性に着目し、非晶質フッ素樹脂を採用した。

非晶質フッ素樹脂には CYTOP™ (CTL-107MK; AGC Chemicals, Japan)を使用する。CYTOP™には器材へ接着する官能基・分子量・コーティング方法により様々なラインナップがあるが、本研究で使用した CTL-107MK はガラス基板に対して接着可能なカルボニル基を有する M タイプ、かつ同時に複数枚処理できコーティングのスループットが高いデ IPPコート用を採用した。

コーティング方法は CYTOP™とシンナー溶液 (CT-Solv.100 ; AGC Chemicals) を混合したデ IPP液に浸漬し、ガラス基板にコーティングした。引き抜きと硬化の条件は、メーカーが推奨する通りとした。材料は約 1mm/s の速度で引き抜き、100°C のオーブンで 90 分間加熱し硬化させた (Figure 3-4)。

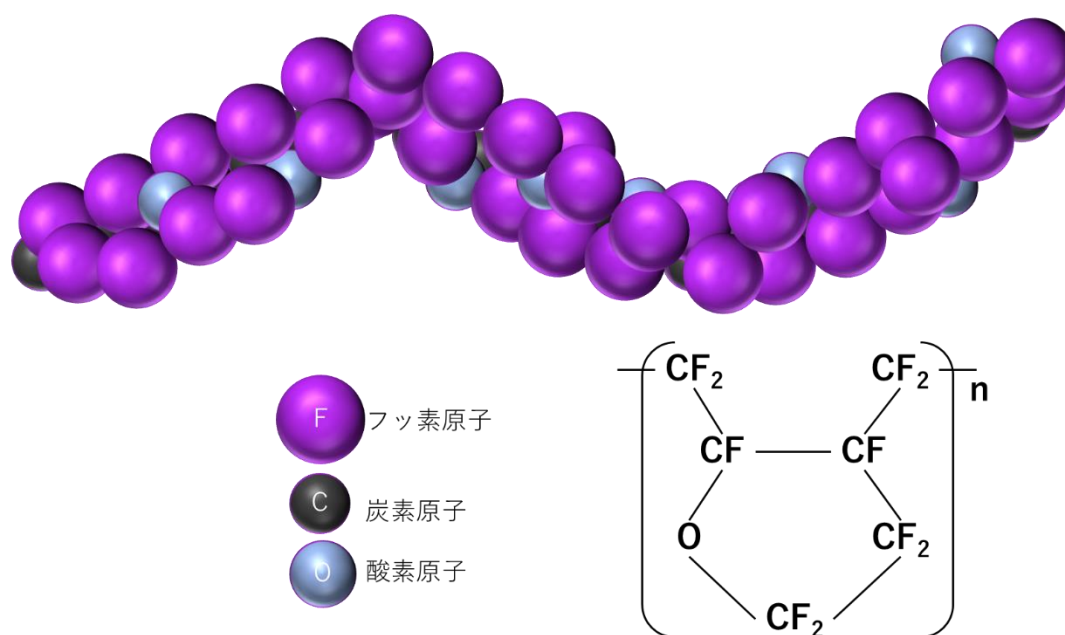


Figure 3-3: CYTOP™分子構造模式図

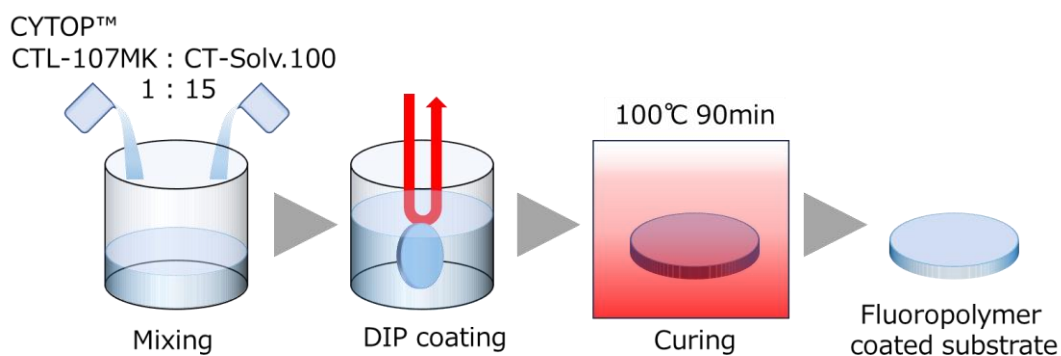




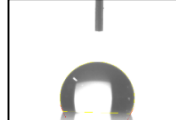

Figure 3-4: フッ素樹脂のコーティング方法

### 3.7. 撥水性の評価

CYTOP™を使用するにあたり、適切な溶液濃度を検証した。本研究ではフッ素樹脂の撥水・撥油性、耐薬品性、非粘着性に注目している。これらの性質は表面エネルギーの低さとして現れると考えられ、表面エネルギーの評価には、P-200A Phoenix-Alpha(メイワフォーシス株式会社)を用い水に対する撥水性を評価した。

CYTOP™の原液に対して、シンナー液を用いて2倍、4倍、8倍、16倍と薄め、コーティングした表面の撥水性を評価したところ、最も薄い16倍希釈においても高い撥水性を有しており、経済性を考慮し16倍希釈を標準希釈倍率とした(Table 3-1)。

**Table 3-1: Contact angle measurement results for the different CYTOP™ dilutions**

Characteristic	2X	4X	8X	16X
Contact angle [degree]	113.36	115.00	114.31	112.58
Left angle [degree]	114.09	115.18	114.53	112.51
Right angle [degree]	112.62	114.81	114.09	112.65
Height from top to base [mm]	3.97	3.98	4.00	4.03
Base line length [mm]	5.48	5.30	5.48	5.61
Base area [mm <sup>2</sup> ]	23.60	22.03	23.60	24.67
Drop volume [μl]	60.06	55.21	60.74	63.64
Wetting energy [mN/m]	-28.86	-30.76	-29.97	-27.95
Spreading coefficient [mN/m]	101.66	103.56	102.77	100.75
Work of adhesion [mN/m]	43.94	42.04	42.83	44.85
Photos				

### 3.8. 考察

CYTOP™の濃度は変化させても撥水性に影響は無かった。CYTOP™のMタイプはガラス基板の表面に並ぶアミノ基に対して、共有結合により強く結合するカルボニル基を有する。今回、コーティング溶液を16倍まで薄めたにも関わらず良好な撥水性を示した。撥水の原理は基板表面エネルギーと接する液体の表面張力の差を大きくすることにより発生する。表面エネルギーを小さくする方法には微細構造により液体に触れる表面積を小さくする方法もある[107]が、今回使用したのは、ごく普通のガラス基板にCYTOP™をコーティングしたものであり、微細な凹凸形状を形成したとは考え難い。したがって、コーティング溶液中にガラス基板表面のアミノ基に対して十分なCYTOP™の分子が存在していたと考えられ、撥水性以外の特性についても同等の性能が得られていると推察される。

### 3.9. 第3章まとめ

通常、PTFE などのフッ素樹脂は粉体の焼付や圧縮成形・押出成形が一般的であるが、近年では射出成型やブロー成型が可能な材料も出てきている。CYTOP™のようにディスプレイの形態でコーティングに使用できるものも出てきており、フッ素樹脂の活用において自由度が非常に高くなっている。

非晶質フッ素樹脂を採用することにより、PTFE に類似した高い撥水性や耐薬品性を有しつつ、細胞培養において課題であった透明性の課題を解決できた(Figure 3-5)。

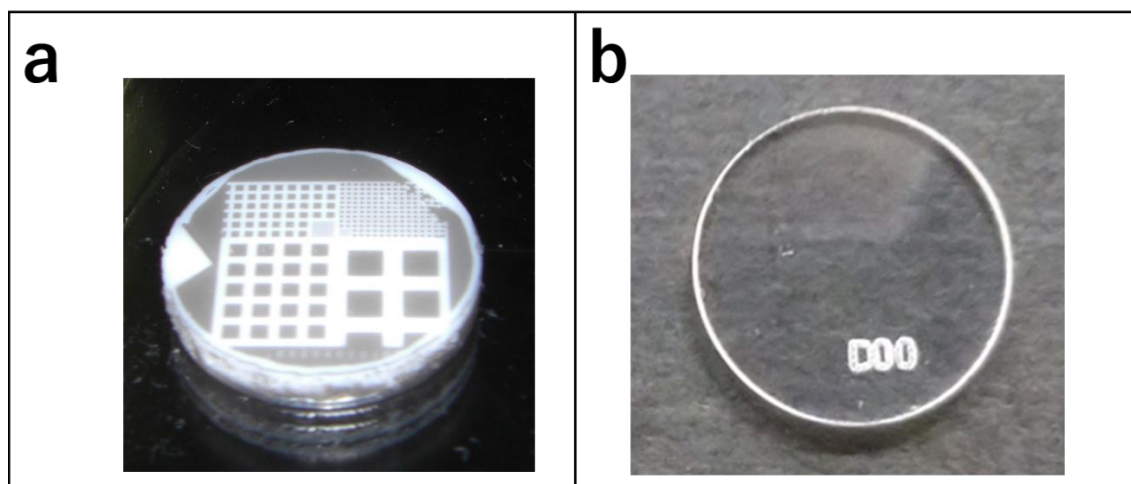


Figure 3-5: 作製した基板の透明性比較 a: PTFE 基板, b: CYTOP™コート基板

### 3.10. 参考文献

54. Roina, Y.; Auber, F.; Hocquet, D.; Herlem, G. ePTFE functionalization for medical applications. *Materials Today Chemistry* 2021, *20*, doi:10.1016/j.mtchem.2020.100412.
83. Takeuchi, H.; Nakatsuji, N.; Suemori, H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep* 2014, *4*, 4488, doi:10.1038/srep04488.
84. Masanobu Kusunoki; Yoshitaka Togo; Takuto Wada; Yoshiya Hashimoto; Yoshiya Hashimoto; Hiroaki Nishikawa; Hontsu, S. Nerve Cell Patterning Using Polytetrafluoroethylene and Poly-D-Lysine. *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems* 2009, *129*, 2014-2018, doi:10.1541/ieejieiss.129.2014.
85. KUSUNOKI MASANOBU; WADA TAKUTO; KANDA HIROTAKE; TOGO HIDETAKA; HAYAMI TAKASHI; HASHIMOTO YOSHIYA; NISHIKAWA HIROAKI; SHIGEKI, H. Micro-patterning technique for capillary blood vessels on Polytetrafluoroethylene substrate. *Mem Fac Biol Oriented Sci Technol Kinki Univ* 2010, *25*, 1-5.

86. Liu, Y.; Munisso, M.C.; Mahara, A.; Kambe, Y.; Yamaoka, T. Anti-platelet adhesion and in situ capture of circulating endothelial progenitor cells on ePTFE surface modified with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) and hemocompatible peptide 1 (HCP-1). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020, *193*, 111113, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111113.
87. Kondyurina, I.; Shardakov, I.; Nechitailo, G.; Terpugov, V.; Kondyurin, A. Cell growing on ion implanted polytetrafluoroethylene. *Applied Surface Science* 2014, *314*, 670-678, doi:10.1016/j.apusc.2014.07.057.
88. Larsen, C.C.; Kligman, F.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R.E. The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function. *Biomaterials* 2006, *27*, 4846-4855, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.009.
89. Hajian, H.; Wise, S.G.; Bax, D.V.; Kondyurin, A.; Waterhouse, A.; Dunn, L.L.; Kielty, C.M.; Yu, Y.; Weiss, A.S.; Bilek, M.M.; Bannon, P.G.; Ng, M.K. Immobilisation of a fibrillin-1 fragment enhances the biocompatibility of PTFE. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, *116*, 544-552, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.042.
90. Crombez, M.; Chevallier, P.; Gaudreault, R.C.; Petitclerc, E.; Mantovani, D.; Laroche, G. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials* 2005, *26*, 7402-7409, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.051.
91. Yasushi Tamada, Y.I. Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces. *Polymer* 1993, *34*, 2208-2212, doi:10.1016/0032-3861(93)90752-V.
92. Gumpenberger, T.; Heitz, J.; Bäuerle, D.; Kahr, H.; Graz, I.; Romanin, C.; Svorcik, V.; Leisch, F. Adhesion and proliferation of human endothelial cells on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 2003, *24*, 5139-5144, doi:10.1016/s0142-9612(03)00460-5.
93. Mikulikova, R.; Moritz, S.; Gumpenberger, T.; Olbrich, M.; Romanin, C.; Bacakova, L.; Svorcik, V.; Heitz, J. Cell microarrays on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 2005, *26*, 5572-5580, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.010.
94. Svorcık, V. Cell proliferation on UV-excimer lamp modified and grafted polytetrafluoroethylene. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2004, *217*, 307-313, doi:10.1016/j.nimb.2003.09.036.
95. Pérez-Calixto, M.; Diaz-Rodriguez, P.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Burillo, G. Amino-functionalized polymers by gamma radiation and their influence on macrophage polarization. *Reactive and Functional Polymers* 2020, *151*, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104568.
96. Rosado, D.; Meléndez-Ortiz, H.I.; Ortega, A.; Gallardo-Vega, C.; Burillo, G. Modification of poly(tetrafluoroethylene) with polyallylamine by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry* 2020, *172*, doi:10.1016/j.radphyschem.2020.108766.
97. Sommani, P.; Tsuji, H.; Kojima, H.; Sato, H.; Gotoh, Y.; Ishikawa, J.; Takaoka, G.H. Irradiation effect of carbon negative-ion implantation on polytetrafluoroethylene for controlling cell-adhesion.

- ion property. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2010, *268*, 3231-3234, doi:10.1016/j.nimb.2010.05.096.
98. Gao, A.; Hang, R.; Li, W.; Zhang, W.; Li, P.; Wang, G.; Bai, L.; Yu, X.F.; Wang, H.; Tong, L.; Chu, P.K. Linker-free covalent immobilization of heparin, SDF-1alpha, and CD47 on PTFE surface for antithrombogenicity, endothelialization and anti-inflammation. *Biomaterials* 2017, *140*, 201-211, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.06.023.
  99. Colwell, J.M.; Wentrup-Byrne, E.; Bell, J.M.; Wielunski, L.S. A study of the chemical and physical effects of ion implantation of micro-porous and nonporous PTFE. *Surface and Coatings Technology* 2003, *168*, 216-222, doi:10.1016/s0257-8972(03)00204-4.
  100. Song, H.; Yu, H.; Zhu, L.; Xue, L.; Wu, D.; Chen, H. Durable hydrophilic surface modification for PTFE hollow fiber membranes. *Reactive and Functional Polymers* 2017, *114*, 110-117, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.010.
  101. Cheng, B.; Ishihara, K. Formation of stable polydopamine layer on polytetrafluoroethylene substrate by hybrid process involved plasma treatment and spontaneous chemical reactions. *Materials Today Communications* 2020, *22*, doi:10.1016/j.mtcomm.2019.100774.
  102. Talon, I.; Schneider, A.; Ball, V.; Hemmerle, J. Functionalization of PTFE Materials Using a Combination of Polydopamine and Platelet-Rich Fibrin. *J Surg Res* 2020, *251*, 254-261, doi:10.1016/j.jss.2019.11.014.
  103. Ahad, I.U.; Butruk, B.; Ayele, M.; Budner, B.; Bartnik, A.; Fiedorowicz, H.; Ciach, T.; Brabazon, D. Extreme ultraviolet (EUV) surface modification of polytetrafluoroethylene (PTFE) for control of biocompatibility. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2015, *364*, 98-107, doi:10.1016/j.nimb.2015.08.093.
  104. Riveiro, A.; Abalde, T.; Pou, P.; Soto, R.; del Val, J.; Comesaña, R.; Badaoui, A.; Boutinguiza, M.; Pou, J. Influence of laser texturing on the wettability of PTFE. *Applied Surface Science* 2020, *515*, doi:10.1016/j.apsusc.2020.145984.
  105. Falah Toosi, S.; Moradi, S.; Kamal, S.; Hatzikiriakos, S.G. Superhydrophobic laser ablated PTFE substrates. *Applied Surface Science* 2015, *349*, 715-723, doi:10.1016/j.apsusc.2015.05.026.
  106. Jarvelainen, H.; Sainio, A.; Koulu, M.; Wight, T.N.; Penttinen, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2009, *61*, 198-223, doi:10.1124/pr.109.001289.
  107. NAKAJIMA, A. Surface Wettability Control~ Superhydrophilicity, Superhydrophobicity and Dynamic Hydrophobicity~. *J. Vac. Soc. Jpn.* 2015, *58*.

## 4. マイクロスタンプ法を用いた ECM のパターンニング

前章で作製した基板に対して、選択的に細胞を接着させるために ECM をパターンニングする。過去の検討では、PTFE の表面改質により表面を炭化し、細胞の張力により炭化層に接着した ECM は細胞ごと剥離したと考えている。今回は細胞培養において光学観察が容易という利便性を考慮し CYTOP™によるコーティングとしたため、PTFE と分子構造が異なり同じ挙動を示すとは限らない。また、ECR での加工は一度に加工できる枚数が少なく、かつ真空プロセスのため、スループットが非常に悪い。

さらに炭化層での剥離プロセスが不明確であることや、細胞/ECM の種類による影響も考えられる。様々な細胞/ECM の種類に対応するため、ECM のパターンニングについては、後から剥離するプロセスではなく、予めパターンを形成するプロセスへと変更する必要がある。

したがって、本章では前章で作製したフッ素樹脂基板に対して、ECM のパターンを形成する試みとしてマイクロスタンプを用いた転写を検討する。

### 4.1. マイクロスタンプの作製方法

マイクロスタンプの作製には PTFE で作製した鋳型に樹脂を流し込み、硬化させることで形状を転写するマイクロモールド法で作製する [108]。パターンになるドット部以外に ECM の溶液が付着することや、ドット間での溶液のブリッジを防ぐために、適度に撥水性を有し、かつ弾力を備える素材として、ポリジメチルシロキサン (PDMS: polydimethyl siloxane) を採用した。

#### 4.1.1. PDMS

PDMS は化学式  $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  で表され、 $n$  は括弧内の繰り返し構造を持つシリコーン樹脂の一種である。用途は多様で、コンタクトレンズや医療機器の部品、防水用のコーキング材、潤滑油、耐熱タイルという工業用途から、髪に艶を出すためや、食品の消泡剤といった理美容から食品添加物まで幅広く使用されている。

またその性質は、透明性があり自家蛍光が低いことから、顕微鏡での観察に向いている。他にも、化学的、生理学的不活性、非毒性、不燃性、柔軟性、疎水性、耐熱性、ガス透過性といった性質を有しており、安価で化学的に安定かつ型取り性にも優れている。PDMS においても、フッ素樹脂同様にプラズマ処理による表面処理で表面にシラノール基が付与できることから、親水化し細胞接着性を向上できる [108, 109] ため、マイクロ流路などのバイオデバイスや生体材料へもよく利用されている。

#### 4.1.2. PTFE の鋳型を用いたマイクロスタンプ作製法

PDMS を用いたマイクロスタンプは、鋳型に流し込みその形を転写するマイクロモールド法で作製する。スタンプ先端のピラーが細いため、離型性を考慮し、PTFE を切削にて加工し鋳型とした。

PDMS の材料は SYLGARD™184(Dow Toray Co., Ltd., Japan )を用いた。配合はメーカー推奨の通り、主剤：硬化剤=10：1 の割合での混合とした。混合した溶液を真空チャンバーにて脱泡し、鋳型に流し込みピラーの先端まで樹脂が回り込むように再び脱泡の後、90℃で90分の加熱硬化を行った。硬化後は鋳型を分割し成型品を取り出すことによりマイクロスタンプを作製した(Figure 4-1)。

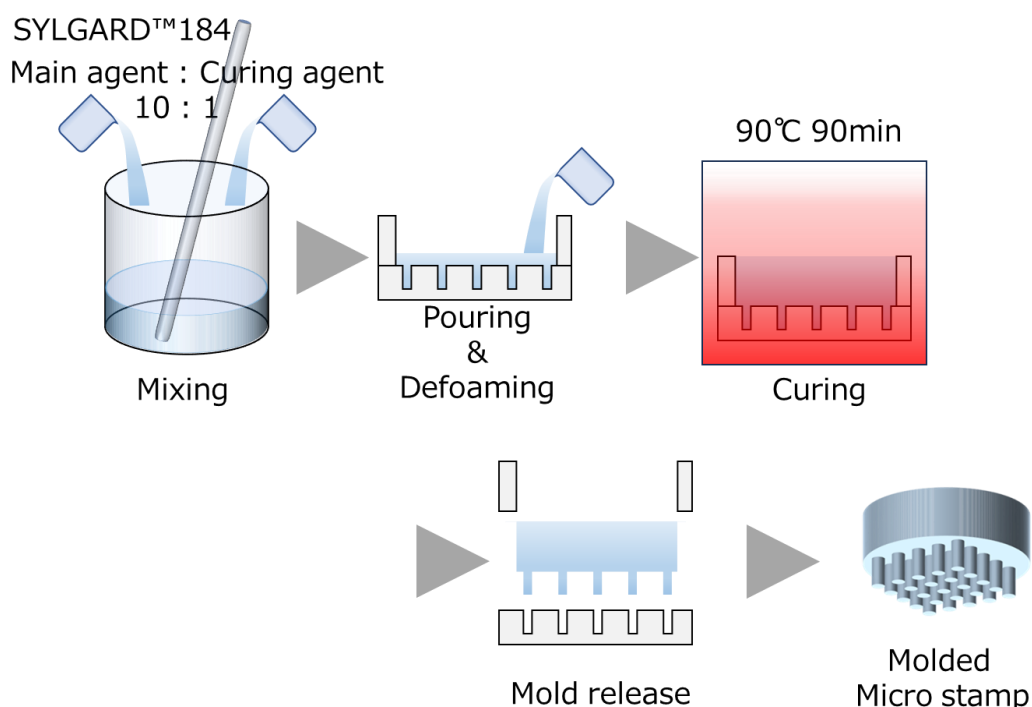


Figure 4-1: マイクロスタンプ作製方法

#### 4.2. マイクロスタンプ法による ECM のパターニング方法

作製したマイクロスタンプを用いてフッ素コート基板の上に ECM のパターニングを行う。マトリゲル(Matrigel Growth Factor Reduced, 354230; Corning Inc.), iMatrix(iMatrix-511 silk, 892021; Nippi Inc.), フィブロネクチン(Fibronectin, 33016015; Life Technologies), ヴァイトロネクチン(Vitronectin, A31804; Life Technologies), コラーゲンタイプIV(Collagen IV, ASC-4-104-01; Nippi Inc.)を RPMI1640 (30264-56; Nacalai Tesque)で希釈した。ECM 希釈液に浸した PDMS マイクロスタンプを基板にスタンプし、ECM をフッ素樹脂表面に転



写し、形成されたパターンが乾燥しないように、37°C、5% CO<sub>2</sub>で1時間インキュベートした。

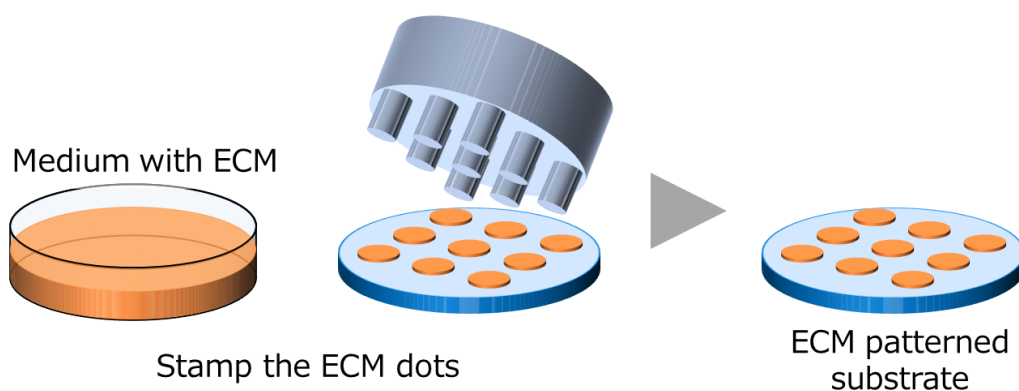


Figure 4-2: マイクロスタンプによる ECM 転写

#### 4.3. マイクロスタンプ評価

マイクロスタンプによるパターンの寸法精度は鋳型・スタンプ・ECMパターンの順にばらつきが大きくなると考えられる。ECMのパターンによって二次元コロニー面積を制御し、スフェロイド化する細胞数を決定づけるため、ECMのパターニング精度は重要である。したがって、PTFE製の鋳型の穴底面径・PDMS製のマイクロスタンプ先端径・ECMの転写径を測定し、各工程におけるばらつきを確認する。

##### 4.3.1. マイクロスタンプの鋳型およびスタンプ先端寸法精度

作製した鋳型及びスタンプの先端径をレーザー顕微鏡(OLS-5000: Olympus)を用いて写真撮影および寸法計測を行った。直径は粒子解析の機能を用いて円相当径を算出した。PTFE鋳型(Figure 4-3)、マイクロスタンプ(Figure 4-4)ともに微細な切削痕は見られるものの、先端は概ね平滑に加工できている。直径は各測定面の面積より円相当径を算出した。平均値±標準偏差(%)で表したそれぞれの寸法は PTFE鋳型:  $797.1\mu\text{m} \pm 0.9\%$  (N=49)、マイクロスタンプ:  $841.1\mu\text{m} \pm 1.2\%$  (N=49)と非常に小さなばらつきとなった。(Table 4-1)。

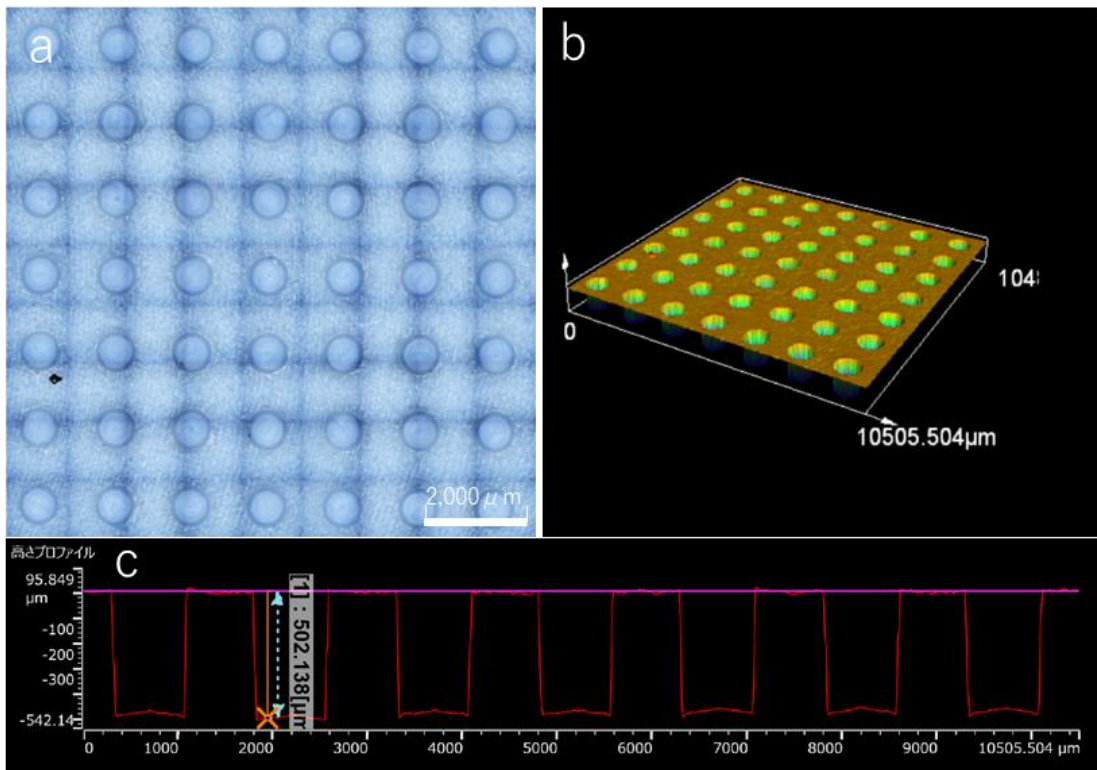


Figure 4-3: PTFE 鋳型の 3D 観察像

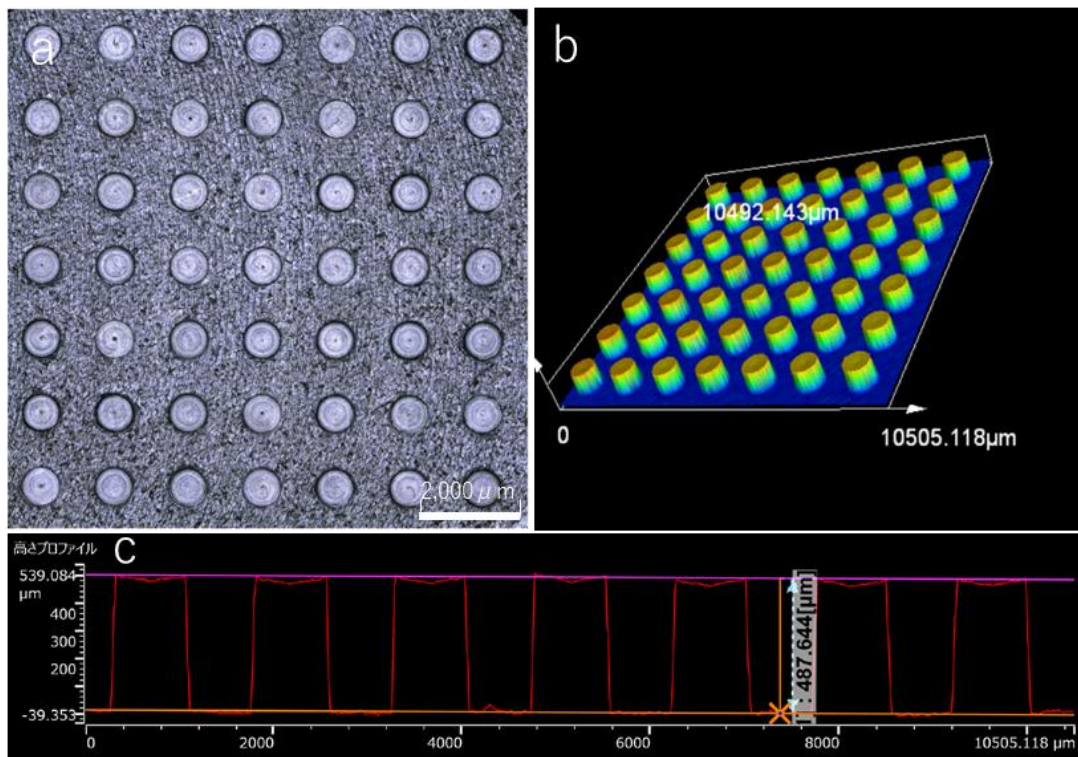


Figure 4-4: マイクロスタンプの 3D 観察像

Table 4-1: スタンプの作製精度

	AVG	SD	AVG $\pm$ SD(%)
Mold	797.1 $\mu$ m	7.3 $\mu$ m	797.1 $\mu$ m $\pm$ 0.9%
Stamp	841.1 $\mu$ m	10.3 $\mu$ m	841.1 $\mu$ m $\pm$ 1.2%

#### 4.3.2. ECM 転写精度(マイクロスタンプ法)

次に、基板へ転写された ECM の寸法を確認する。培養には様々な ECM を使用するが、本検討では多くの基礎実験で用いられるマトリゲルの転写パターンを測定した(Figure 4-5)。

測定は位相差顕微鏡で観察し、FLOYD-4K (Wraymer 社製) を用いて写真撮影および寸法計測を行った。ECM の直径を測定したが、完全な円を形成しないため、スタンプ先端径同様にコーティングされた ECM の面積から円相当径を算出した。

測定の結果、ECM の寸法は 850.1 $\mu$ m  $\pm$  18.7% となり、スタンプの先端径に対してばらつきが増える結果となった(Table 4-2)。



Figure 4-5: 転写した ECM

Table 4-2: ECM の転写精度

	AVG	SD	AVG $\pm$ SD(%)
ECM	850.1 $\mu$ m	158.6 $\mu$ m	850.1 $\mu$ m $\pm$ 18.7%

#### 4.4. 考察

PTFE 鋳型の径・マイクロスタンプ径それぞれ、非常に小さなばらつきに抑えられており、マイクロスタンプ作製における先端径の再現性は高い。しかしながら、想定外に PTFE 鋳型の径に対して、スタンプの径が全体的に大きくなる現象が確認された。これは、加熱硬化時に、PDMS が硬化収縮したことに起因すると考えられる。加熱硬化時には PTFE に囲まれている先端に対して、開口し外気と接する鋳型上部の樹脂が先に硬化し、先端に向かって硬化が進行する。そのため、硬化時には鋳型上部に向かって引っ張られる応力が働く。PDMS は弾性を持つ材料であるため、離型し鋳型の摩擦による拘束が無くなったことにより、縮み、全体的に太くなったと考えられる。レーザー顕微鏡測定での高さプロファイルでも天面のエンドミルによる加工痕が転写されているにもかかわらず、15 $\mu\text{m}$  程度長さが縮んでいることが確認できる (Figure 4-3, Figure 4-4)。PTFE 鋳型に対してマイクロスタンプの径のばらつきは大きくなく、再現性もあるため、膨張分をあらかじめ考慮して PTFE 鋳型を作製することにより、寸法の狙い値とマイクロスタンプ先端径の差はゼロに近づけることができると考える。

ECM の転写精度は平均値に対して 18.7% と大きな誤差となった。これは、スタンプの押圧や傾き、ECM 定着時の乾燥及び ECM 希釈液の先端への付着量等、多くの手技によるばらつき要素が影響したと考えられる。

#### 4.5. 第 4 章まとめ

マイクロスタンプによるフッ素樹脂コート基板上への ECM の転写を確認した。マイクロスタンプ作製までの工程においてはばらつきも少なく再現性は高い。しかしながら、転写精度においては人の手を介するため、ばらつきが大きくなる傾向がみられた。これは、スフェロイド化前の二次元コロニーサイズに影響すると考えられる。また、スタンプを基板上に置いたままインキュベーションという工程は工業的に大量生産を考慮すると、このスループットの低さは課題となる。ECM は基本的に乾燥により変質・失活するため、乾燥を防ぐ工程改善が必要である。

#### 4.6. 参考文献

108. Anada, T.; Fukuda, J.; Sai, Y.; Suzuki, O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* 2012, *33*, 8430-8441, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.040.
109. Yadhuraj, S.R.; Babu Gandla, S.; Omprakash, S.S.; Sudarshan, B.G.; Prasanna Kumar, S.C. Design and Development of Micro-channel using PDMS for Biomedical Applications. *Material*

s Today: Proceedings 2018, 5, 21392-21397, doi:10.1016/j.matpr.2018.06.545.

## 5. 株化細胞を用いたスフェロイド作製

3章でフッ素樹脂コーティング基板を作製し、4章でECMのパターニング方法としてPDMSのマイクロスタンプを作製した。

本章では、3, 4章で作製した基板とマイクロスタンプを用いて、我々の提案するスフェロイド作製の提案手法が原理的に可能であるかを検証する。細胞培養では、比較的簡単に培養が可能な癌細胞由来の株化細胞2種と、代表的なECMを用いて組み合わせて実施した。ECMパターン上に細胞を播種し、スフェロイド化することの確認と、複数種の細胞・複数種のECMにて、本手法の有効性を確認した。

### 5.1. 株化細胞とは

株化細胞とは、培養細胞株として確立された細胞のことである。株化細胞は不死化している細胞で、癌細胞から採取・増殖したものと、iPS細胞のような幹細胞がある。これらの細胞はヘイフリック限界が無いため培養により細胞分裂を無限に繰り返し増殖が可能であり、また冷凍保存が可能であるため研究における再現性を確保できる。WHOの発行しているTechnical Report Series 978のAnnex 3 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks[110]には、“Cell line: type of cell population with defined characteristics that originates by serial subculture of a primary cell population that can be banked.”と記載されており、保管できることが要件として明記されている。

癌細胞から採取されたものには、その組織固有の分泌能を有するものもあり、様々な研究用途で使用されている。しかし、株化細胞には株化する過程で採取した組織の実質細胞と性質が異なることある。そのため、創薬の研究においてこれらの株化細胞に対して有効性が見いだせたとしても、実質細胞では反応が異なることも珍しくはない。

本研究では、細胞株の違いによる影響を確認するために、HepG2とMCF-7の2種類の細胞株を使用した。

#### 5.1.1. HepG2

HepG2はヒト肝癌由来の細胞株で、15歳の白人男性肝癌患者の肝細胞癌から分離され、肝臓の代謝モデルとして多くの研究で用いられている[111-113]。2009年に肝芽腫由来との報告[114]はあるものの、HepG2細胞とその誘導体は様々な血漿タンパクの分泌能から、肝臓代謝と生体異物の毒性の研究、細胞毒性、肝癌の発生機序の研究、および薬物標的研究に使用される。

### 5.1.2. MCF-7

MCF-7はヒト乳癌細胞株で、69歳の白人女性の胸水から分離された[115]。MCF-7細胞は、乳腺上皮に特有の特性を保持する細胞株として乳癌研究に使用されている。

## 5.2. 本研究で使用した細胞外マトリックス(ECM)

本研究では、ECMの違いによる影響を確認するために、フッ素樹脂上にパターンニングするECMは代表的な5種類を選択した。

### 5.2.1. マトリゲル: Matrigel

マトリゲルは、細胞外基質タンパク質を多く含む Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫を原料としており、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン/ナイドジェンや多様な成長因子を含む可溶性基底膜製品である。マトリゲルを溶かしたハイドロゲルは、*in vitro* における二次元および三次元細胞培養に広く使われている。足場依存性の正常および形質転換上皮細胞などの細胞接着および分化を促進するため、二次元および三次元細胞培養のアプリケーションとして、より *in vivo* に近い環境を作り出す。

マトリゲルは温度が上がると急速に重合する。10°Cでゲルを形成し始め 22°C以上になると急速にゲル化するため、作業環境・時間に注意が必要である。

標準濃度のマトリゲルは、4°C~10°Cで粘性のある透明な液状である。高濃度マトリゲルでは非常に粘性が高く透明性はない。

また、マウスの腫瘍から抽出するため、ロット間の成分ばらつきがあり、かつその由来から、再生医療などには使用できないため、排除されていく傾向にある。本研究においても提案手法の原理を実証するための実験のみに使用した。

### 5.2.2. iMatrix-511 silk

従来、ES細胞やiPS細胞の培養には、マウス線維芽細胞などのフィーダー細胞やマトリゲルなどの培養基材が用いられてきたが、異種動物由来のものや構成成分が不明な基材を用いて培養した細胞は、細胞治療や再生医療などに使うことはできない。

iMatrix-511は、ヒト多能性幹細胞を長期間培養保持できることが報告されているラミニン-511の活性部位のみを断片化したものであり、これを使用することにより、フィーダーフリーの条件下でヒト多能性幹細胞を培養することが可能である。

iMatrix-511 silkはカイコ繭由来となっている。カイコの糸はシルクには抗菌性を持つ

様々な機能性タンパク質が含まれている。この性質によりシルクは将来の医療応用が期待される素材であり、機能性シルク研究が盛んに行われている。例えば、多様な絹繊維や絹タンパク質を利用したバイオフィルム、ハイドロゲル、縫合糸、培養足場、その他の生体材料が挙げられる、無菌状態で飼育が他の生物と比較して容易である[120-122]。今後細胞治療・再生医療に使用するにあたり、動物由来である FBS やその他添加剤は排除していく必要があり、現状ではカイコの繭由来の iMatrix-511 silk の使用が最も現実的な選択であると考えられる。

### 5.2.3. フィブロネクチン: Fibronectin

フィブロネクチンは高分子量糖タンパク質の一種であり、細胞接着や細胞拡散、細胞移動、細胞形態の制御、分化、癌化などの脊椎動物における様々な細胞接着プロセスにおいて重要な役割を担っている。これらの生物学的活性はすべて、フィブロネクチンが細胞や細胞外物質と相互作用することを意味している。

フィブロネクチンは、機能的にも構造的にも、これまでに知られている中で最も多用途なタンパク質の一つであると言われている。

細胞性フィブロネクチンは、線維芽細胞の ECM である 繊維芽細胞や他の細胞種の ECM の繊維状成分として存在する。

血漿 フィブロネクチンは血漿中に高濃度で存在する可溶性分子であり、創傷治癒、止血に関与していると言われている[116]。

### 5.2.4. ヴィトロネクチン: Vitronectin

血中や ECM 内に存在する糖タンパク質で、細胞接着・細胞進展を促す細胞接着分子である。組織形成維持、血液凝固線溶系、免疫補体系、組織修復、癌転移、神経細胞の分化や突起伸長で重要なはたらきをする。

ヴィトロネクチンはヘパラン硫酸プロテオグリカンに代表される様々なインテグリンに結合する。特に移動に関係する細胞でヴィトロネクチンが局所的に合成されるとされており、マトリックスのヴィトロネクチンは細胞の接着や移動を促進する。細胞溶解阻害因子としては、グリコサミノグリカンと結合し、補体系の膜侵襲複合体に組み込まれる。血液凝固においては、トロンビン-アンチトロンビンⅢ複合体と相互作用する。また、ヴィトロネクチン受容体のインテグリンにより、血管新生や腫瘍の浸潤で機能するとされ、様々な腫瘍では増加発現している。したがって、ヴィトロネクチンは接着の基質として機能するのみならず、細胞移動に伴うマトリックスの形成にも関与すると考えられる[117, 118]。



### 5.2.5. コラーゲン タイプIV: Collagen IV

コラーゲンは、培養表面の基質やスポンジやゲルの足場として使用される一般的なECMである。また、足場としての利用以外に、培養表面の基質としてもよく使用されるECMである。

コラーゲンの重合における自己組織化の性質は、コラーゲン線維の特異的な構造をもたらす。コラーゲン線維は、細胞質膜上のインテグリンとの豊富な結合部位から構成され、接着、拡散、移動などの細胞行動の制御に重要な役割を果たし、それによって増殖などの細胞運命と密接に関係している。脊椎動物の骨や皮を構成するタンパク質で、コラーゲンにはその性質の違いから複数の型が存在する。その中でコラーゲンタイプIVは非線維性コラーゲンで、基底膜を構成し網目状の会合体を形成する。優れた細胞接着性を示すことから、培養器材表面へのコートにも使用される[119]。

### 5.3. 播種条件

HepG2(TKG02058)およびMCF7(TKG0479)細胞は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより提供された。細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS; BioWest)、2mM L-アラニル-L-グルタミン溶液(01102-82, Nacalai Tesque)およびペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(26252-94, Nacalai Tesque)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; 5919, Nissi Inc.) (10%FBS/DMEM.)で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95%airの条件下で培養した。0.25%トリプシン(35547-64; Nacalai Tesque)と0.04%EDTA(15105-35; Nacalai Tesque)を含むトリプシン-EDTA溶解バッファー(TE バッファー)を用いて、1:3の割合で3日ごとに細胞を継代した。

細胞を $1.0 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>で基板の上に均等に播種し、均等に接着させた(Figure 5-1 a)。7日後、細胞は増殖し、ECMでコートされた部分のみに二次元コロニーを形成した(Figure 5-1 b)。これらの細胞二次元コロニーを静かにピペッティングすることで剥離し、続いてスフェロイドが形成されるまで7日間懸濁培養した(Figure 5-1 c)。培養はすべて、5穴ディッシュ(NM-CD-5F, Nakamedical)内に設置したフッ素樹脂コートガラス基板上で行った。

### 5.4. 二次元コロニーおよびスフェロイドの寸法評価(マイクロスタンプ法)

HepG2を用いて、マトリゲルパターンにおけるスフェロイド化の過程を確認した。位相差顕微鏡で観察し、FLOYD-4K(Wraymer社製)を用いて写真撮影と寸法計測を行った。二次元コロニーやスフェロイドは完全な円を形成しないため、ECMパターン同様に円相当

径を算出した。細胞播種後（1 日目）、ECM 上にパターンとして残った二次元コロニーの寸法（7 日目）、スフェロイドのサイズ（10～14 日目）の写真を撮影した。（Figure 5-1）

直径は各測定面の面積より円相当径を算出した。平均値±標準偏差(%)で表したそれぞれの二次元コロニーの寸法は  $804.99\mu\text{m}\pm 24.6\%$ (N=13)、スフェロイド寸法は  $476.02\mu\text{m}\pm 16.7\%$ (N=68)となった(Table 5-1)。



Figure 5-1: 二次元コロニー/スフェロイドの寸法 a: 播種後 1 日目の均一に接着している細胞、b: 播種後 7 日目の二次元コロニー、c: 播種後 10～14 日目のスフェロイド

Table 5-1: 作製した二次元コロニー及びスフェロイドの寸法

	AVG	SD	AVG ± SD(%)
Colony	$805.0\mu\text{m}$	$198.1\mu\text{m}$	$805.0\mu\text{m}\pm 24.6\%$
Spheroid	$476.0\mu\text{m}$	$79.6\mu\text{m}$	$476.0\mu\text{m}\pm 16.7\%$

### 5.5. 他の細胞種および ECM における挙動

次に、他の細胞種および ECM においても提案手法によるスフェロイド化の有効性を確認した(Figure 5-2)。

HepG2 とマトリゲルの組み合わせ同様に iMatrix、フィブロネクチン、ヴィトロネクチン、コラーゲン タイプIVにおいても同様にスフェロイド化した。また、別の細胞種の MCF-7 に置いても全ての ECM においてスフェロイド化を確認した。

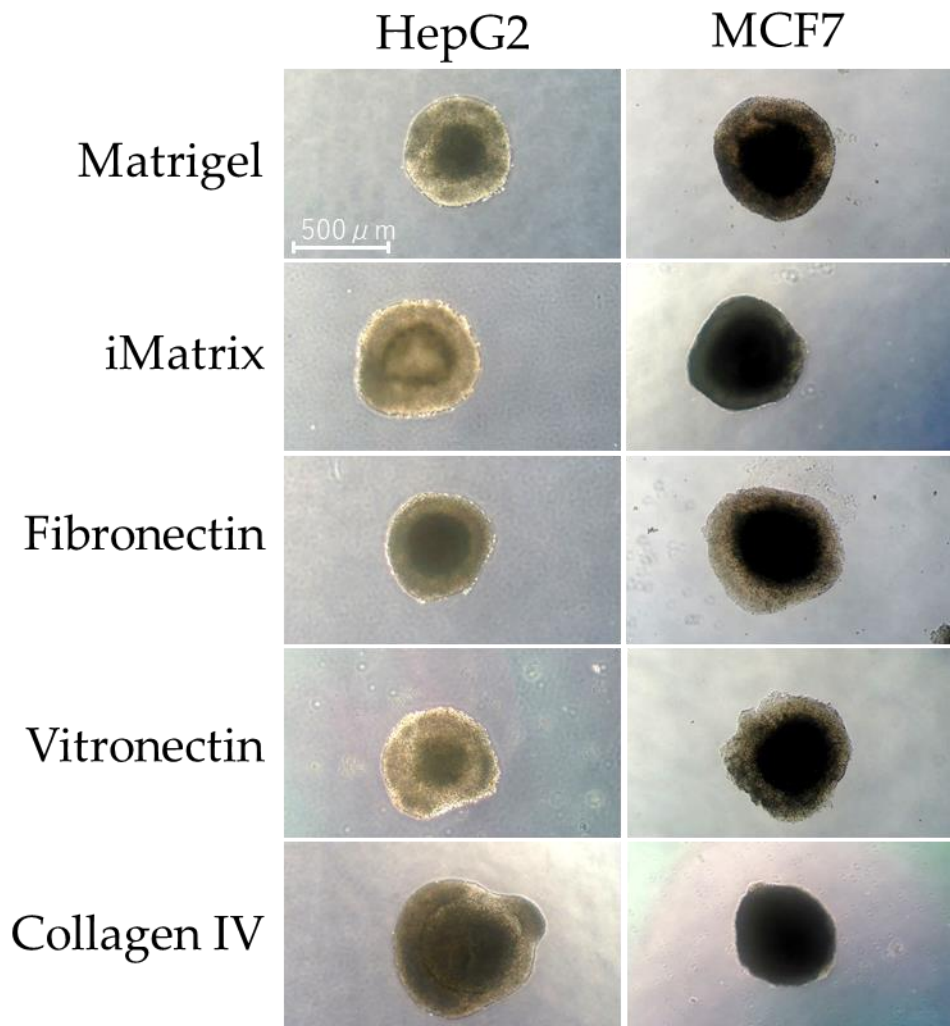


Figure 5-2: ECM 毎のスフェロイド作製結果

## 5.6. 考察

HepG2 と MCF-7 の 2 種の細胞株において複数の ECM を用いて提案手法の有効性を確認した。フッ素樹脂コート基板と ECM のパターンを組み合わせた提案手法では細胞株・ECM を問わずスフェロイド化が可能である。

スフェロイドの寸法制御については、マイクロスタンプ天面寸法までの工学的な部分では非常に小さなばらつきに抑えられているが、ECM の転写において手技によるばらつきが大きくなり、さらに二次元コロニー形成時にはさらにばらつきが大きくなった。スフェロイド形成時にはばらつきが小さくなったが、これは二次元から三次元形状へと丸まった影響だと考えられる (Figure 5-3)。

また、パターン上に単層で培養されたと仮定すると、 $\phi 800\mu\text{m}$  径のパターンからは、その体積からスフェロイドの径は約  $100\sim 200\mu\text{m}$  になると想定していた。実際には平均

476 $\mu\text{m}$  と大きくなっている。今回使用した HepG2 は癌細胞由来のため、通常の平面培養においてもコンフルエントに近づくと上へと三次元的に増える性質がある。今回はスフェロイド化に10~14日と長い時間をかけたため、パターン上でコンフルエントになり高さ方向にも増殖したため、想定より細胞数が多くなったと考えられる。

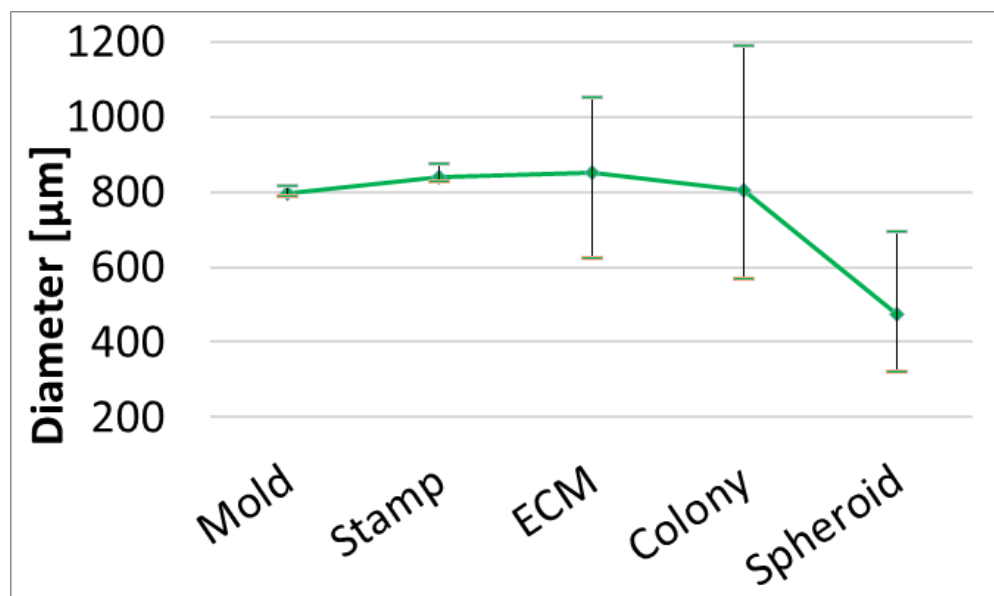


Figure 5-3: 各工程における寸法の遷移

フッ素樹脂は C-F 結合が非常に強いため、不活性を有する。そのため、生体内で使用する材料としては安全で無害である。その高い不活性は生体内での接着性の低さなどの利点をもたらすが、一方で生体内での接着が阻害されることは生体材料としては問題である。このフッ素樹脂の性質より ECM は、強い化学結合を形成しないと予想される。それにもかかわらず、細胞はフッ素樹脂上に転写された ECM に接着することができた。フッ素樹脂上への接着メカニズムについては疎水性相互作用[123]やフッ素樹脂の表面電荷[124]が報告されている。しかし我々は、ECMの種類に関係なく、時間の経過とともに細胞が剥がれ落ちるような弱い接着力を示すことを確認した。このような挙動は共有結合やイオン結合などの強固な結合では実現できないことから、ファンデルワールス力の弱い力が ECM を基板表面に留める力として作用していると考えている。ECM ドットの形成中、培養液中に浮遊していた ECM は重力により沈降し基板表面に集まる。その結果、タンパク質分子とフッ素樹脂表面の距離はゼロに近づき、その後タンパク質分子はファンデルワールス力を介してフッ素樹脂表面に接着する。ファンデルワールス力は非常に弱い接着ではあるが、面積が増すことにより面方向の引張応力は強くなる。一方接着面に対して平行方向のせん断応力に対してや、部分的に力のかかる剥離応力に対しては弱い。そのため、細胞が増殖して形成した二次元コロニーは弱い力で端から剥離し始め、ECM ごとフッ素樹脂表面から容易に剥離したと考える。このファンデルワールス力

の応力の方向に対する接着力の差についてはヤモリの足の吸着機構としても知られている。ヤモリの足は面方向に均一な力に対してはガラスなどの平滑面であっても強固に吸着しているのに対して、面に対して剥くような動きで足を容易に剥がし歩行を可能とするヤモリの足の表面と同様の作用である[125]。

本研究では足場形状の影響を排除するために平面の基板を用いたが、この形状も適度な接着と剥離性を実現するための重要な要素と考えられる。スフェロイド作製のプレートには、剥離性を向上するためにマイクロパターンを用いたものがあるが、マイクロパターンの接着面積ではファンデルワールス力の弱い接着力では十分な足場への接着ができない可能性がある[126]。逆に接着を強めるためにアンカー効果を意図した大きな凹凸を形成した場合には接着力が向上し過ぎるため剥離できない[127]。したがって、基板表面が平滑であることも重要な要素である。

フッ素樹脂の化学的な性質という面では、今回使用した CYTOP™の分子構造は 5 員環を有し、その表面原子に酸素があることから電気的な極性の影響も考えられた。しかし、フッ素樹脂材料選定において CYTOP™同様に分子構造中に酸素を有するが、表面原子としてはフッ素原子のみとなるパーフルオロポリマーの一種である PFA(Perfluoroalkoxy alkane)や、逆に ETFE(Ethylene Tetra Fluoro Ethylen)(Figure 5-4)のように分子構造中に水素を含み、表面原子として水素が露出するような材料であっても同様に細胞の剥離が可能であった。したがって、提案手法は使用した CYTOP™特有の性質に依存するものではなく、フッ素樹脂全般的に適用出来ると推定され、ECMの接着はフッ素樹脂全般的に有する化学的に安定な性質においても働くファンデルワールス力によるものと判断した。

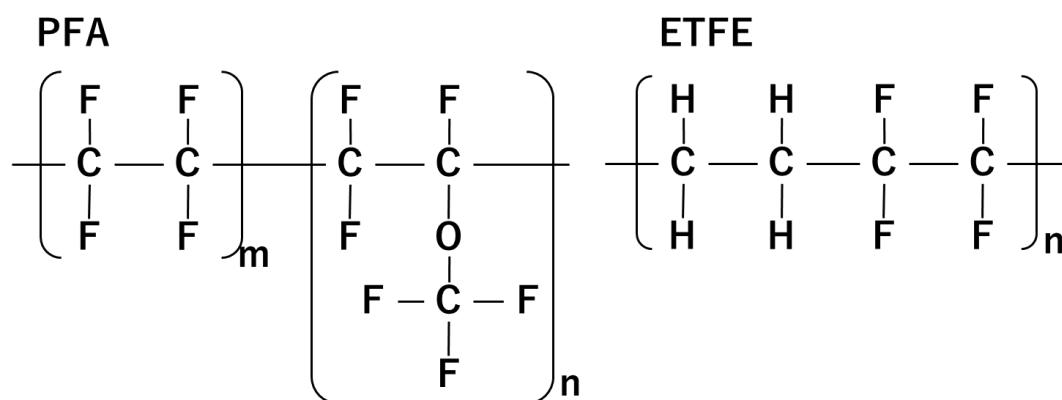


Figure 5-4: PFA および ETFE の分子式

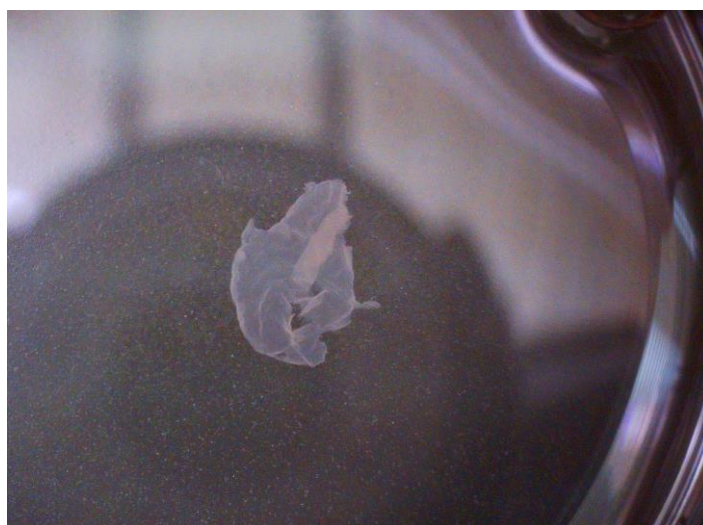


Figure 5-5: PFA 上から回収した細胞シート

フッ素樹脂上でのファンデルワールス力による接着の機序を、フッ素樹脂上に接する物質の状態と分子の動きから考察する。ECMは分子量の大きなタンパク質で、細胞間の接着に寄与する糊のような働きをする。培養液に溶解する前の状態のマトリゲルでは非常に粘性が高く膠状であることが確認できる。ECMがこのようにゲル状の状態であることから、静置することにより培養液中で沈降し、流動性が低いことにより基板表面にてフッ素樹脂上にファンデルワールス力で接着すると考えられる(Figure 5-6 c)。仮にフッ素樹脂上へコートする材料が液体や固体であった場合を想定する。液体の場合では、ゲル状の時とは異なり分子の動きが大きくなり、ファンデルワールス力による作用が小さくなる(Figure 5-6 b)。固体においては分子の動きは小さく、ファンデルワールス力による作用は最も強くなる。しかし、実際には材料表面の凹凸により密に接しないため、ファンデルワールス力が作用する面積が小さくなり接着力が弱くなる(Figure 5-6 a)。したがって、提案手法ではゲル状の ECM の様態がファンデルワールス力による適度な接着の重要な要素となったと考えられる。

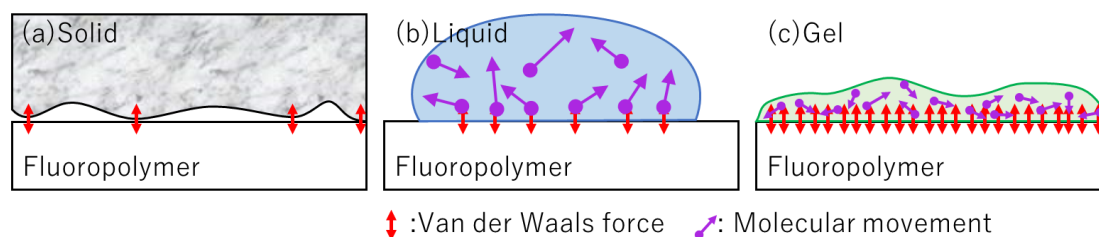


Figure 5-6: フッ素樹脂の上に置かれた物質の状態による作用の模式図

次に、細胞が二次元コロニーを形成するまでは接着を継続し、コンフルエントによる自然剥離または弱いピペッティングにより剥離できる機序を考察する。フッ素樹脂上にコー

トされた ECM に細胞が接着し増殖すると、二次元コロニー中央に向かって細胞同士の引っ張りあう力が働く。この力が ECM とフッ素樹脂間に働くファンデルワールス力を上回ると、二次元コロニーの端から自然に剥離する。また、細胞同士の張力が小さく自然剥離しない場合には、弱いピペッティングにより二次元コロニーの端を少し剥離することをきっかけに、徐々にファンデルワールス力が作用する面積が減少し自然に剥離したと考えられる[127]。

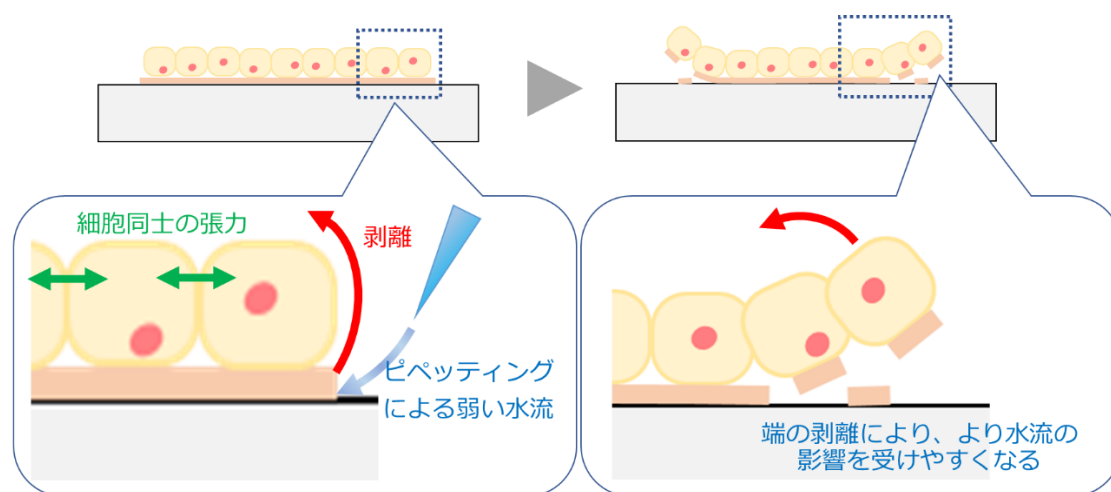


Figure 5-7: 推定される二次元コロニーの剥離機序

## 5.7. 第5章まとめ

当初の目論見では、直径  $10\mu\text{m}$  の細胞が ECM パターン上に単層で密に二次元コロニーを形成した場合の体積から形成するスフェロイド径を算出し、 $800\mu\text{m}$  の ECM パターンで約  $100\mu\text{m}$  のスフェロイドを形成すると想定していた。しかし、実際には平均  $476\mu\text{m}$  と想定していたスフェロイド径より大きなものとなった。これは二次元コロニー単層で形成されることを前提条件としていたが、癌細胞由来株化細胞では、コンフルエント状態になると自ら上方に三次元的に成長する性質があることに起因すると考えられる。想定よりスフェロイド径は大きかったものの、フッ素樹脂と ECM を用いたスフェロイド作製法が可能であること、および複数の細胞種・複数の ECM の組み合わせで提案手法の有効性が確認された。二次元コロニーまでは概ねマイクロスタンプ径と同じ寸法で遷移し、想定通り丸まることによりスフェロイド径が小さくなるという想定した傾向であった。

したがって、スフェロイド作製手法として機能することが確認された。スフェロイド径の大きさについては、癌細胞由来ではない iPS 細胞を用いコンフルエントにならないように管理することで、より小さく管理が可能であると考えられる。

## 5.8. 参考文献

110. World Health Organization, WHO Technical Report Series 978: Annex 3 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2013. 2013.
111. Barbara B. Knowles; Aden, D.P. HUMAN HEPATOMA DERIVED CELL LINE, PROCESS FOR PREPARATION THEREOF, AND USES THEREFOR. Jul. 12, 1983 1983.
112. Skonieczna, M.; Adamiec-Organisciok, M.; Hudy, D.; Dziedzic, A.; Los, L.; Skladany, L.; Grgurevic, I.; Filipec-Kanizaj, T.; Jagodzinski, M.; Kukla, M.; Nackiewicz, J. Hepatocellular cancer cell lines, Hep-3B and Hep-G2 display the pleiotropic response to resveratrol and berberine. *Adv Med Sci* 2022, *67*, 379-385, doi:10.1016/j.advms.2022.09.003.
113. Raviadaran, R.; Ng, M.H.; Chandran, D.; Ooi, K.K.; Manickam, S. Stable W/O/W multiple nanoemulsion encapsulating natural tocotrienols and caffeic acid with cisplatin synergistically treated cancer cell lines (A549 and HEP G2) and reduced toxicity on normal cell line (HEK 293). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021, *121*, 111808, doi:10.1016/j.msec.2020.111808.
114. Prall, F.; Ostwald, C.; Linnebacher, M. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 2009, *40*, 1510-1512, doi:10.1016/j.humpath.2009.06.015.
115. H. D. Soule; J. Vazquez; A. Long; S. Albert; Brennan, M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973, *51*, 1409-1416, doi:10.1093/jnci/51.5.1409.
116. R.Kornblihtt, A.; Umezawa, K.; Vibe-Pedersen, K.; E.Baralle, F. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *The EMBO Journal* 1985, *4*, 1755-1759.
117. HOLMES, R. PREPARATION FROM HUMAN SERUM OF AN ALPHA-ONE PROTEIN WHICH INDUCES THE IMMEDIATE GROWTH OF UNADAPTED CELLS IN VITRO *TRE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 1967 *32*, 297-308, doi:10.1083/jcb.32.2.297.
118. McKeown-Longo, P.J.; Panetti, T.S. Structure and Function of Vitronectin. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 1996, *8*, 327-340.
119. Nadzir, M.M.; Kino-oka, M.; Sugawara, K.; Taya, M. Effect of preservation conditions of collagen substrate on its fibril formation and rabbit chondrocyte morphology. *J Biosci Bioeng* 2012, *114*, 360-363, doi:10.1016/j.jbiosc.2012.04.013.
120. Liu, J.; Shi, L.; Deng, Y.; Zou, M.; Cai, B.; Song, Y.; Wang, Z.; Wang, L. Silk sericin-based materials for biomedical applications. *Biomaterials* 2022, *287*, 121638, doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121638.
121. Sonnleitner, D.; Sommer, C.; Scheibel, T.; Lang, G. Approaches to inhibit biofilm formation applying natural and artificial silk-based materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021, *131*,



- 112458, doi:10.1016/j.msec.2021.112458.
122. Wang, Y.; Wang, F.; Xu, S.; Wang, R.; Chen, W.; Hou, K.; Tian, C.; Wang, F.; Yu, L.; Lu, Z.; Zhao, P.; Xia, Q. Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application. *Acta Biomater* 2019, *86*, 148-157, doi:10.1016/j.actbio.2018.12.036.
  123. Hausmann, A.; Sancio, P.; Vasiljevic, T.; Weeks, M.; Schroën, K.; Gray, S.; Duke, M. Fouling of dairy components on hydrophobic polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for membrane distillation. *Journal of Membrane Science* 2013, *442*, 149-159, doi:10.1016/j.memsci.2013.03.057.
  124. Makohliso, S.A.; Giovangrandi, L.; Leonard, D.; Mathieu, H.J.; Ilegems, M.; Aebischer, P. Application of Teflon-AF® thin films for bio-patterning of neural cell adhesion. *Biosensors & Bioelectronics* 1998, *13*, 1227-1235.
  125. Niewiarowski, P.H.; Lopez, S.; Ge, L.; Hagan, E.; Dhinojwala, A. Sticky gecko feet: the role of temperature and humidity. *PLoS One* 2008, *3*, e2192, doi:10.1371/journal.pone.0002192.
  126. Kitamura, A.; Kobayashi, T.; Meguro, T.; Suzuki, A.; Terai, T. Control of cell behavior on PTFE surface using ion beam irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2009, *267*, 1638-1641, doi:10.1016/j.nimb.2009.01.123.
  127. 赤羽紀武; 山本敬雄; 久, 氏.; 梅沢和正; 三浦金次; 養田俊之; 桜井健司. E-PTFE 人工血管の末梢側吻合部狭窄の発生機序とその予防について. *人工臓器* 1985, *14*, 967-970, doi:doi.org/10.11392/jsao1972.14.967.

## 6. HepG2 スフェロイドを構成する細胞の生存率

細胞培養及びスフェロイド化の過程においては、死細胞が発生するのが一般的である。既存の手法においては、酵素処理により細胞をシャーレから剥離し分散させる処理が必要で、この際には酵素の影響によりダメージを受け、一定数の細胞は死んでしまう。これらの細胞がスフェロイドに取り込まれると、後の挙動に影響を与えることも懸念されるためスフェロイドには死細胞は可能な限り取り込まれないことが望ましい。我々の提案手法では、酵素を使用せず弱い水流で剥離し、シート状の細胞二次元コロニーが浮遊状態からスフェロイド化する。このような機序の手法はこれまでに無く、細胞へのダメージが少ないと考えており、提案手法の特徴となっている。

また、スフェロイドの研究において  $\phi 200\mu\text{m}$  を超えるスフェロイドは内部に栄養と酸素の供給がうまくいかず内部の細胞が壊死すると言われている。これに対して今回、 $\phi 500\mu\text{m}$  に近いスフェロイドを作製出来たため、細胞の生存率は今後のスフェロイドを用いた研究に当たりスフェロイドの品質を示す重要な指標となる。一方、ここで重要なことは、スフェロイド内の大半の細胞が生存していることである。

したがって、本章では前章で我々のスフェロイド作製手法で作製した HepG2 及び MCF-7 のスフェロイドにおける生存率を確認した。

### 6.1. トリパンプルー染色

トリパンプルーは死細胞の計数に使用される青色の染料である。細胞膜が傷ついていない生細胞は染色されないが、死細胞では細胞膜内へと侵入するため選択的に染めることが可能である[128]。トリパンプルーの染色液自体に細胞に対する毒性があることから、染色の工程に伴う死細胞の発生も見込まれるため、短い時間で処理および計数を実施することに留意しなければならない。

### 6.2. HepG2/MCF-7 生存率の評価

HepG2/MCF-7 それぞれ、スフェロイド内の細胞について、二次元培養のコロニーをコントロールとして生存率の評価を行った。TEバッファーで分散し、単一細胞の懸濁液を得た。懸濁液中の細胞をトリパンプルー (35535-02、Nacalai tesque) で染色し、血球計算盤を用いて、全細胞数と死細胞を計数し、生存率を算出した。(Figure 6-1)

HepG2 は、コントロール:  $94.0 \pm 6.6\%$ (N=4) に対して、スフェロイド:  $82.8 \pm 7.0\%$ (N=5)となった。MCF-7 は、コントロール: $96.1 \pm 2.8 \%$ (N=4)に対して、スフェロイド:  $87.9 \pm 3.6 \%$ (N=5)となった。次に Man-Whitney の U 検定による有意差検定を実施した。すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna,

Austria) および R のグラフィカル・ユーザー・インターフェース(GUI)である EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、日本) を用いて行った。EZR は、R の GUI であり、より正確には、生物統計学で頻繁に使用される統計関数を追加するために設計された R commander の改良版である [129]。Man-Whitney の U 検定の結果、 $p$  値  $< 0.05$  を統計的に有意とみなした時に HepG2 では  $P=0.111$ 、MCF-7 では  $P=0.016$  となり、MCF-7 では有意差ありの判定となった。また、効果量の評価として Cliff's d を算出した結果、HepG2 では  $d=0.7$ 、MCF-7 では  $d=1$  となり、それぞれ大きな効果となった。コントロールに対して生存率が低い結果となったが、これは三次元構造をとるスフェロイドを TE バッファーで分散させる際に、スフェロイド内部まで影響が及びにくい。そのため、二次元平面のコロニーより長時間の分散時間を要する。その結果、特にスフェロイド外側の細胞では TE バッファーに暴露される時間が長くなり一定数の死細胞が発生することが避けられない。同様に、トリパンプルー染色液も細胞に対して毒性があることは知られており、染色後時間経過とともに死細胞は増加する。これらの、処理時間の差による影響で二次元コロニーに対してスフェロイドでは若干死細胞が増えたものと考えられる。これらの理由により有意差が生じたものの、スフェロイドを構成する細胞が HepG2/MCF-7 とともに 80%以上壊死せずに生存していることは、従来法と比較した際に著しく優位な手法と考えられる。

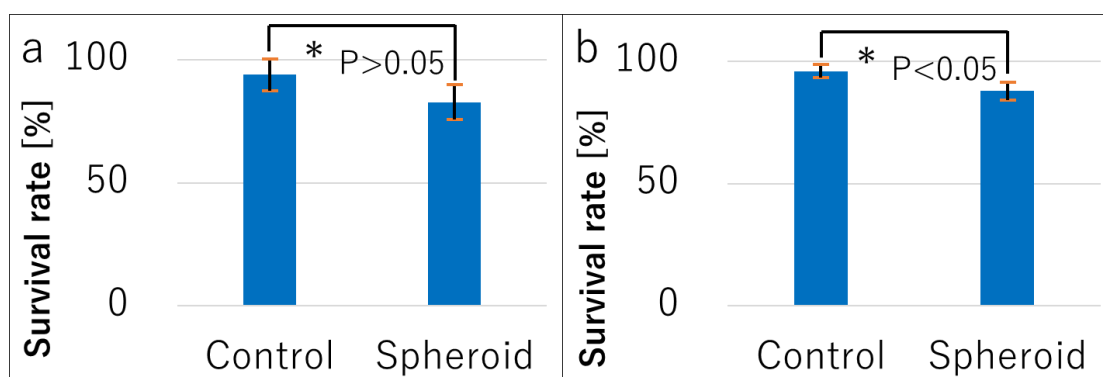


Figure 6-1: トリパンプルー染色による生存率の確認結果(Man-Whitney の U 検定( $p = 0.05$ )  $p$  値  $< 0.05$  を統計的に有意とみなした。データは平均値  $\pm$  標準偏差で表した。) a: HepG2, b: MCF-7

### 6.3. ハンギングドロップ法(既存の手法)との比較

次に、既存のスフェロイド作製手法との比較をおこなった。比較対象としては既存のスフェロイド作製手法の中で特別な器材を必要としないハンギングドロップ法を使用した。提案手法におけるドットパターンのコロニー (Figure 5-1 b) の平均細胞数を推定し、同等の細胞数となるように調整したドロップレットでスフェロイドの形成を試みた。培養ディッシュにてコンフルエントになるまで細胞を増殖させ、TE バッファーで細胞を分散させた。

細胞数を数え、 $8 \times 10^3$  個/drop をハンギングドロップ法で播種してスフェロイドを調製した。

ハンギングドロップ法で、提案手法と同様の細胞数でスフェロイド化を試みたが、スフェロイドを形成することは無かった。1 日目は徐々に凝集し始めているように見られたが、7 日目には球状にならず、培養液の気液界面に細胞が沈降し、一部凝集しつつも球体を形成せずに平面上にまばらに広がる結果となった(Figure 6-2)。通常のハンギングドロップ法では、 $100\mu\text{m}$  程度のスフェロイドを形成するように細胞数をコントロールするため、今回のように約  $500\mu\text{m}$  と大きなスフェロイドの形成では細胞が多すぎて凝集できなかったと考えられる。また、限られたドロップ内の培養液では細胞同士の接着に必要な ECM が少ないことや、酸素や栄養の不足により細胞が死んでしまうことが影響していると考えられる。

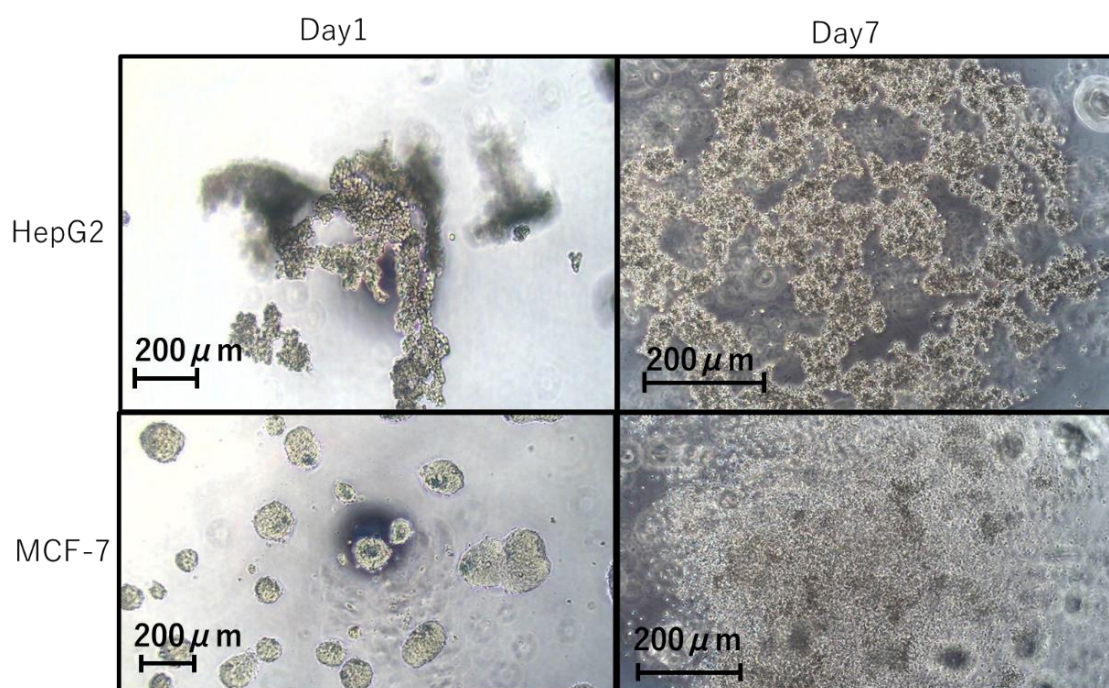


Figure 6-2: ハンギングドロップ法における培養結果

#### 6.4. 考察

生存率の確認の結果、Man-WhitneyのU検定の結果ではコントロールとスフェロイドの間で有意差は確認されたものの、HepG2:  $82.84 \pm 6.99\%$ 、MCF-7:  $87.89 \pm 3.62\%$ と高い生存率を確認した。この有意差については、巨大なスフェロイドを形成したことにより、細胞の分散処理にかかる時間が長くなったことに起因すると考えられ、想定範囲内であった。一般的には $\phi 200\mu\text{m}$ を超えるスフェロイドでは内部への酸素・栄養の供給が滞るため血管など無しには内部が壊死するため、生存率を有する大きなスフェロイドは形成できないとされていた。しかし、提案手法では $\phi 500\mu\text{m}$ 近いスフェロイドサイズにも関わらず

非常に高い生存率を示した。提案手法では膜状の細胞が巻き込みながらスフェロイドを形成する。そのため、内部に培養液を取り込み小さな腔や細胞間の隙間を形成しているなどの栄養や酸素の循環を円滑に行う構造が形成されている可能性があると考えられる。また、スフェロイド化の直前まで平面で培養していることから、培地交換により死細胞が洗い流されていることや、剥離に酵素処理を必要としないため、酵素処理に伴う細胞死もスフェロイドに取り込まれないことも生存率を上げる要因となり得る。

## 6.5. 第6章まとめ

本章では、癌細胞由来の株化細胞を用いて、提案手法に置けるスフェロイドの生存率を確認した。大きなスフェロイドであったが、高い生存率を示しており、スフェロイド作製手法として有効であることが示された。血管等を構成せずに単一の細胞を用いて直接 500 $\mu\text{m}$  という大きなスフェロイドを作製する手法で、かつ内部の生存率も高い状態を維持した手法はこれまで知られていない。したがって、提案手法では既存の手法では得ることのできなかった内部への栄養供給経路が形成されたことが示唆される。

また、癌細胞由来の株化細胞から大きなスフェロイドの作製が可能となったことから、癌スフェロイドとして病理研究・創薬の用途への利用が期待される。

## 6.6. 参考文献

128. 三重正和; 小島英理. バイオ関連分野での基礎－細胞数測定法. *Electrochemistry* 2008, 76, 924-927.
129. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013, 48, 452-458, doi:10.1038/bmt.2012.244.

## 7. ネガ型樹脂マスクを用いた ECM のパターンニング

前章までに使用していたマイクロスタンプ法では、スタンプ表面への ECM 溶液の付着量や押印時の押圧、押印時の角度など複数の寸法に影響する要素を人の手技に頼ったものとなっていた。そのため、滲みや欠け、汚れなど、意図しない転写形状になることもあり、手技の習熟を必要とした。

また、スタンプの天面に保持できる ECM 溶液は非常に少量であることから乾燥が起こりやすく、ECM を扱ううえで避けなければならない。そのため、コーティング期間はスタンプを載せたままインキュベートが必要であったため、スループットも悪くなっていた。

フッ素樹脂と ECM の組み合わせによる新しいスフェロイド作製手法の原理の検証としては十分な成果を得ることが出来たが、実際の研究で大量に生産するには再現性やユーザビリティの改善が必要と考えられる。

これらの欠点を解消するべく、我々はリソグラフィ技術を用いて紫外線硬化樹脂の貫通孔を有するパターンニングマスクを基板上へ形成し、ECM 溶液へ浸漬することで開口部のみ ECM ドットをパターンニングする樹脂マスク法を開発した。マイクロスタンプ法では基板に対して狙った位置にコーティングすることを目的としていたが、樹脂マスク法はその逆に、コーティングしたくない場所をカバーするという発想である (Figure 7-1)。

本章では、マイクロスタンプ法での検討において課題となった手技によるばらつきとスループットの改善のため、新たな手法として樹脂を用いた樹脂マスクを検討する。

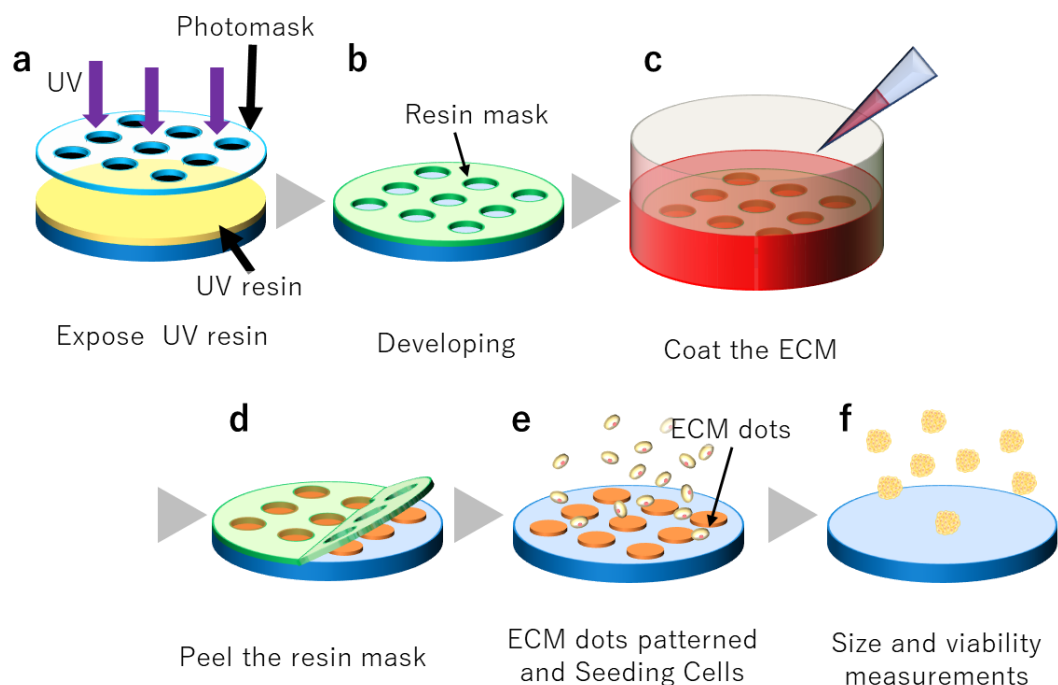


Figure 7-1: 樹脂マスクの作製法及びスフェロイド作製方法

## 7.1. ネガ型樹脂マスクの作製方法

樹脂マスクの作製には半導体加工などに使用される微細加工技術のリソグラフィを使用する。紫外線硬化樹脂をリソグラフィにより感光し、フッ素樹脂コート基板上に貫通孔を有する樹脂マスクを直接形成する。これにより、化学的な結合が困難なフッ素樹脂コート基板上に樹脂マスクが密着し、かつ一度剥離すると再利用が出来ない構成を実現する。

### 7.1.1. リソグラフィ技術

リソグラフィとは、感光性のレジストを紫外線(UV)などの高エネルギーの電磁波によって変性させ、所望のパターンを得る方法である。レジストの種類によって、エネルギーを与えた部分が硬化するネガ型と、エネルギーを与えた部分が可溶性に変化するポジ型となる。

半導体回路の集積度の向上に伴い、リソグラフィの精度も向上し、様々な装置が開発されている。本研究ではフォトマスクを用いたフォトリソグラフィの露光装置を使用する。この手法はコンタクト露光と呼ばれ、フォトマスクとレジストを密着させて露光する方式である。転写したい原寸大の回路が描かれたフォトマスクを作製し、フォトマスクを基板表面のフォトレジストに接触させて平行光を照射し露光する。この方法は、解像度が高く価格は比較的安いのが、大面積への高精度な露光が難しい点や、レジストと密着を繰り返すことによるフォトマスクの消耗や汚損・欠損によるマスク再作製のランニングコストがかかる点が欠点となる(Figure 7-2)。

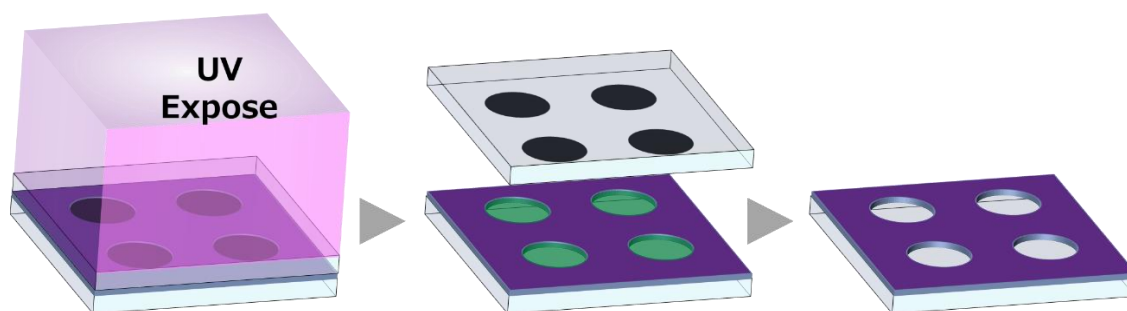


Figure 7-2: コンタクト露光の模式図

### 7.1.2. 紫外線硬化樹脂

紫外線硬化樹脂には 385nm または 405nm の UV 光で硬化する 1209-M-UR-SC(Dymax, Torrington, CT, USA)を使用する。この樹脂は医療用シリンジの針を接着固定する用途を想定して作られた材料で、ISO10993-5(細胞毒性)の規格適合品である。細胞培養基板上への樹脂マスクを形成するにあたり、材料自体の細胞毒性がないことを保証されており、実

験に影響を与える不用意な化学物質の混入などの心配がない。

また、物理的な性質については、硬化時の硬度・破断時伸び率・粘性など、加工時や ECM コーティング後の樹脂マスク剥離におけるユーザビリティを考慮し、総合的な性能をもとに選定した。

### 7.1.3. ネガ型樹脂マスクによる ECM のパターンニング方法

フッ素樹脂コート基板に 1209-M-UR-SC を滴下し、フォトマスクで押しつぶすように均一に広げ露光する。樹脂の露光には i 線マスクアライナーを使用した。直径 300 $\mu$ m、400 $\mu$ m、600 $\mu$ m のドットを持つフォトマスクを用いて UV 光と影のパターンを形成した (Figure 7-1a)。露光後現像し、貫通孔を有する樹脂マスクが形成される (Figure 7-1b)。ECM のパターンニングには iMatrix-511 シルク (ニッピ、東京、日本) をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Nacalai tesque、京都、日本) で希釈したものをを用いた。樹脂マスク基板を、樹脂マスクの開口部が上向きになるようにディッシュに設置し、ECM 溶液を流し込み、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 環境でインキュベートする (Figure 7-1c)。ECM を沈降し、開口部を上向きにして静止させた基板表面をコーティングする。インキュベーション後、樹脂マスクを剥がし、基板をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (-) で洗浄した (Figure 7-1d)。

## 7.2. ネガ型樹脂マスクの貫通孔寸法精度評価

樹脂マスク法は貫通孔以外を覆い、ECM 入りの培養液中に静置することにより、沈降してきた ECM が基板表面に付着する。樹脂マスクを剥離することにより、樹脂マスク上に付着した ECM は除去され、貫通孔パターン内にものみ ECM がコートされた状態となる。作製精度は露光による樹脂の硬化時間と現像時間に依存する。今回使用した 1209-M-UR-SC は本来接着剤としての用途で使用されるポッティング剤であるため、通常のフォトレジストと比較して、硬化反応時間は長い。しかしながら、長時間露光すると、回折や反射の影響が顕著に表れ始め精度が低下するため、適切な樹脂厚と露光時間が重要である [130]。

マイクロスタンプ法と同様に二次元コロニー面積を制御し、スフェロイド化する細胞数を決定づけることは変わらないため、ECM のパターンニング精度は重要である。

樹脂マスクを作製するフォトマスクには  $\phi$  300 $\mu$ m、 $\phi$  400 $\mu$ m、 $\phi$  600 $\mu$ m の 3 サイズを使用した。作製した樹脂マスクの精度はマイクロスタンプの場合と同様にレーザー顕微鏡 (OLS-5000: Olympus) 用いて写真撮影および寸法計測を行った。直径は粒子解析の機能を用いて円相当径を算出した。測定した結果、直径は各測定面の面積より円相当径を算出した。平均値 $\pm$ 標準偏差 (%) で表したそれぞれの寸法は  $\phi$  300 $\mu$ m:  $328.3 \pm 1.2\%$  (N=171)、 $\phi$  400 $\mu$ m:  $429.9 \pm 2.2\%$  (N=171)、 $\phi$  600 $\mu$ m:  $634.8 \pm 0.6\%$  (N=171) となり、非常に小さなばらつきとなった。



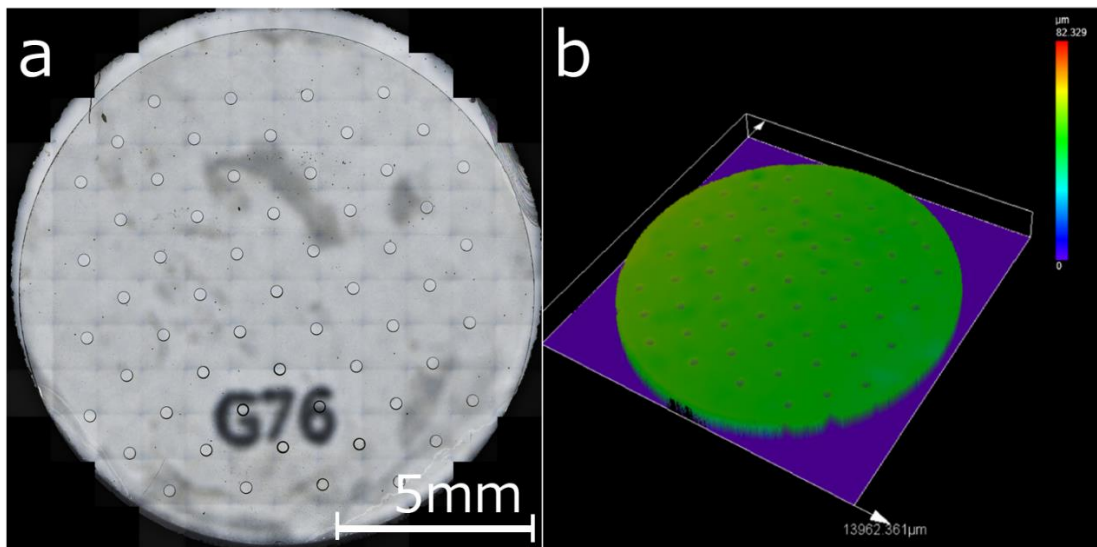


Figure 7-3: 樹脂マスクの三次元観察像

Table 7-1: 樹脂マスク寸法

Hole dia.	N	AVG	SD	AVG ± SD(%)
φ 300 μm	171	328.3 μm	3.8 μm	328.3 μm ± 1.2%
φ 400 μm	171	429.9 μm	9.6 μm	429.9 μm ± 2.2%
φ 600 μm	171	634.8 μm	3.5 μm	634.8 μm ± 0.6%

### 7.3. マイクロスタンプ法と樹脂マスク法の比較

マイクロスタンプ法/樹脂マスク法それぞれの手法で PBS に Matrigel を希釈した溶液をコーティングし、ECM のパターン形状を測定する。培養液中の ECM が沈降し基板上にコートされると仮定したときの単位面積当たり ECM 量を揃えるためには、樹脂マスク法ではマイクロスタンプ法と比較して使用する培養液の量が多くなるため、ECM 溶液濃度が低くなる。撥水性の基板表面の性質から、樹脂マスクを剥離して穴の位置に綺麗に培養液を液体のまま変形なく残すことは困難であることから、気中での ECM パターンの光学観察は困難である。また、湿潤状態での作業となり、作業中の汚損を防ぐことも困難であった。そのため、溶液を蒸発させることにより Matrigel および PBS 中の塩分等を析出させパターンを比較した。(Figure 7-4)

マイクロスタンプ法では ECM 溶液の付着量や押印時の押圧、押印時の角度などにより、円形のパターンを形成できていないものや、円の外側へとはみ出して析出が見られた。ま

た、全体的に汚損しているものも見られる。

これに対して、樹脂マスク法ではこれらの滲みや汚れ、コーティングの欠けもなく、均一にコーティングの出来ていることが確認できた。

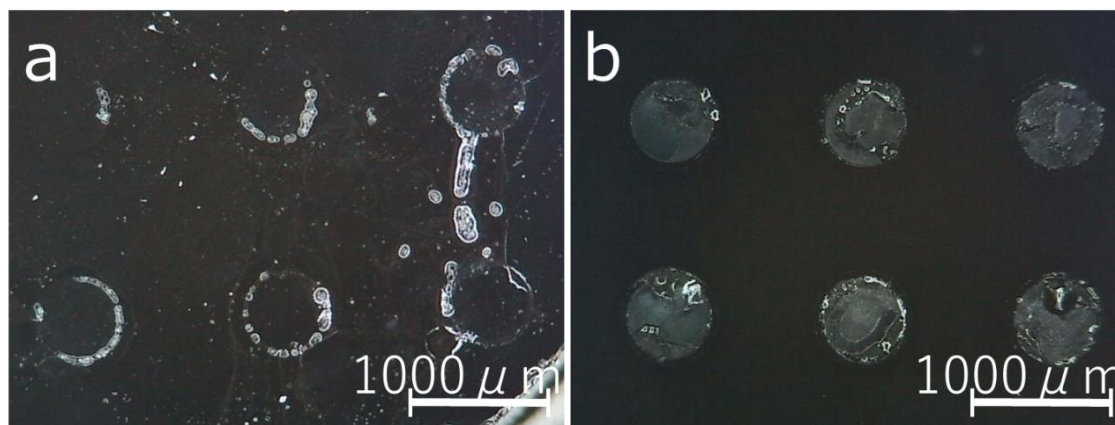


Figure 7-4: Matrigel を PBS に希釈した ECM 溶液転写乾燥パターン(φ 600μm)の比較 a: マイクロスタンプ法によるパターン、b: 樹脂マスク法によるパターン

#### 7.4. 考察

マイクロスタンプ法では押印時にスリップしたなど明らかに作業者が認識できる失敗は除外できるが、作業者が気づかない程度の場合には目視でのパターンの良否判定は困難であった。細胞を播種後に想定外の場所に増殖して結果的にパターンずれを生じていたことが発覚することもあった。今回、乾燥パターンを用い、かつ背面を光学的な反射を限りなく抑えることにより、想定以上にマイクロスタンプ法での安定的なパターンニングが困難であることが確認された。

それに対して、樹脂マスク法では ECM のパターン外への漏れも見られず、安定的なパターンニングが出来ている。この手法では ECM のコーティングも ECM 溶液中に浸漬し、一晚インキュベートするのみと非常に簡便になっており、乾燥を防ぐと共に工数の削減にも寄与している。

樹脂マスク法では、樹脂マスクの開口と同等の ECM ドットパターンが形成される。今回作製した樹脂マスクでは、フォトマスクに対して樹脂マスクの穴の平均寸法が 5~10% 程度大きい。今回使用したコンタクト方式のフォトリソグラフィは、通常 10μm 程度の膜厚のレジストを精度よく加工するために用いられる技術である。それに対して、今回の樹脂マスクは 100μm 程度の樹脂厚であるため、樹脂が厚いことにより光が減衰し、膜の上部/下部での硬化具合の差が生じることや、光の反射・回折による影響でマスクの下部へ光が入射し露光されてしまう課題が発生する[131]。ここでは、露光時間を短く設定していることから、現像時に未硬化部に現像液が入り込み膨潤し、後に収縮することにより穴径が大

きくなったと推察される。しかしながら、そのばらつきは非常に小さく、かつ再現性も高いことから、フォトマスクの寸法を調整することで所望のサイズが得られると考えられるため実用上問題は無い。

## 7.5. 第7章まとめ

本章では、マイクロスタンプ法の欠点を改善する方法として、新たに紫外線硬化樹脂を用いた樹脂マスク法を開発し評価を行った。マイクロスタンプ法における滲みや欠けなどのパターンの精度に影響する不良が、樹脂マスク法では発生せず、非常に簡便に精度の良いECMのパターニングが可能となった。また、樹脂マスクは、ECMコーティングにおける培養液中への浸漬では剥離しないが、樹脂マスク除去時にはピンセットで容易に剥離できる程度の固着強度となっており、作業性も良好である。したがって、樹脂マスク法の採用によりスループットが向上し、大量のスフェロイドを得ることが可能となる。

## 7.6. 参考文献

130. 東木達彦; 大西康伸. 半導体リソグラフィ技術の動向と東芝の取り組み. 東芝レビュー 2012, 67, 2-6.
131. Haq, M.R.; Schiff, H. Vertical sidewalls in thick epoxy resists – a challenge for laser-based direct write lithography. *Micro and Nano Engineering* 2023, 19, doi:10.1016/j.mne.2023.100210.

## 8. 幹細胞を用いたスフェロイドの作製

前章では癌細胞由来の株化細胞を用いて提案手法の原理及び有効性の確認を行った。株化細胞は癌化している細胞のため、テロメアによる分裂回数の制限を受けない。比較的丈夫な細胞で増殖も容易であるため、初期の機能性の観察を行うのには適していた。

本研究の目的として掲げる創薬・再生医療への利用を想定した場合、癌治療を目的とした癌スフェロイドとして有効なことは株化細胞を用いて示すことが出来た。しかしながら、再生医療や癌以外の疾病に対する特定の組織に対する疾患を想定した創薬という観点では、正常な実質細胞を用いてスフェロイド/オルガノイドを形成する必要がある。そのため、幹細胞を用いて同様にスフェロイドを効率的に作製可能であることを示す必要がある。

### 8.1. 幹細胞

幹細胞とは、自己複製能と分化能を有する細胞とされている。自己複製能は複数回の細胞分裂を経ても未分化のままの状態が維持された状態で増える能力とされ、それに対して分化能は体内の組織の細胞へと分化する能力である。

多能性幹細胞（PS 細胞: pluripotent stems）は、ES 細胞と iPS 細胞の両方を包含する用語である。ヒト ES 細胞は、発育中の胚の胚盤胞期の内部細胞塊から単離され、1998 年に James Thomson 博士によって初めて誘導された。

iPS 細胞は、成人の体細胞を再プログラムするために、1 つ以上の遺伝子を異所性発現させることで作製される。iPS 細胞は ES 細胞と類似または同等とみなすことができ、2007 年に山中伸弥博士によって初めて樹立された[132]。

PS 細胞の特徴は、適切な微小環境に曝されると無期限に自己増殖し、ほぼすべての細胞種に分化する能力を持つと言われている。特に iPS 細胞は、患者特異的幹細胞の作製を簡素化することで、幹細胞研究の分野に革命をもたらした。

これらのモデル細胞は、疾患病態のメカニズムを解明や創薬や治療標的の同定において重要な役割を果たす。PS 細胞とその誘導体が応用される可能性のある主な分野は以下のよう多くの応用の可能性がある。

- ・再生医療: 病的あるいは損傷した細胞の修復や置換
- ・疾患研究: 様々な疾患のモデル化
- ・創薬および薬剤開発: 実験的薬剤の効果を試験するための優れたツール
- ・発生生物学: 正常な発生を研究するためのシステム

### 8.2. 播種条件

iPS 細胞（253G1 および 409B2）は、理研バイオリソース研究センター（理研 BRC、茨

城県つくば市)から入手した。iPS細胞は以下の方法で維持した。0.42 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>のiMatrixを含む10%ウシ胎児血清(FBS)(BioWest, Nuaille, Maine-et-Loire, France)/DMEM(Nacalai tesque)を培養皿に入れ、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95%RH環境で24時間培養した。継代のため、培地を吸引し、PBS(-)で洗浄し、フェノールレッドを含まないTrypLE Select(1 $\times$ )(ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA)と共に37°Cで3-5分間インキュベートした。その後、細胞を10%FBS/DMEMを加え、1500rpm、室温で3-5分間遠心し、上清を吸引した。その後、10 $\mu$ MのY27632(Nacalai tesque)と100倍に希釈したペニシリン-ストربتマイシン混合溶液(Nacalai tesque)を含むStemFit(AK02N; Ajinomoto, Tokyo, Japan)に細胞を懸濁し、1:3で播種した。翌日、およびその後1-2日ごとに、継代まで培地をStemFitに交換した。継代は3-4日ごとに行った。

7.1.3節に示す方法でECMをパターンニングした基板に対し、スフェロイド径の測定には1 $\times$ 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>、未分化及び分化能の確認には5 $\times$ 10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>~5 $\times$ 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>の条件で播種した。培養数日後に細胞は増殖し、ECMコートした部分のみに二次元コロニーを形成した。穏やかにピペティングして二次元コロニーを剥離し、次いでスフェロイド形成まで数日間培養した。培養はすべて、5ウェルシャーレ(Naka Medical, Tachikawa, Tokyo, Japan)のフッ素樹脂コートガラス基板上で行った。

### 8.3. 二次元コロニーおよびスフェロイドの寸法評価(樹脂マスク法)

作製した二次元コロニーおよびスフェロイドの寸法は、位相差顕微鏡IX71N-22FL/PH(Evident, Tokyo, Japan)を用いて観察した後、撮影し測定した。二次元コロニーとスフェロイドはほぼ円形または球形であったため、その直径は縦と横の直径の平均値として定義した。

形成した二次元コロニーの直径は平均値 $\pm$ 標準偏差(%)で表した。それぞれの寸法は、ドット径の設計値 $\phi$  300 $\mu$ m,  $\phi$  400 $\mu$ m,  $\phi$  600 $\mu$ mに対し、それぞれ359.3 $\mu$ m $\pm$ 7.9%(N=155), 449.6 $\mu$ m $\pm$ 12.4%(N=146), 669.6 $\mu$ m $\pm$ 5.9%(N=160)となった。同様に、スフェロイドの直径は各設計値に対し、それぞれ261.3 $\mu$ m $\pm$ 9.0%(N=155), 299.9 $\mu$ m $\pm$ 10.1%(N=145), 330.7 $\mu$ m $\pm$ 14.1%(N=158)となった(Table 8-1)。

さらに樹脂マスクの合計171穴に対し、二次元コロニーの形成率及びスフェロイドの回収率を確認した。二次元コロニーの形成率は $\phi$  300 $\mu$ m: 90.64%、 $\phi$  400 $\mu$ m: 85.38%、 $\phi$  600 $\mu$ m: 93.57%となり、平均: 89.86%であった。スフェロイドの回収率は $\phi$  300 $\mu$ m: 90.64%、 $\phi$  400 $\mu$ m: 84.80%、 $\phi$  600 $\mu$ m: 92.40%、平均: 89.28%となり、二次元コロニーの形成率・スフェロイドの回収率共に約90%と高い効率を示した(Table 8-2)。

Table 8-1: 樹脂マスク法における二次元コロニー/スフェロイド寸法

Colony dia.	N	AVG	SD	AVG ± SD(%)
φ 300 μ m	155	359.3 μ m	28.4 μ m	359.3 μ m ± 7.9%
φ 400 μ m	146	449.6 μ m	55.6 μ m	449.6 μ m ± 12.4%
φ 600 μ m	160	669.6 μ m	39.8 μ m	669.6 μ m ± 5.9%

Spheroid dia.	N	AVG	SD	AVG ± SD(%)
φ 300 μ m	155	261.3 μ m	23.5 μ m	261.3 μ m ± 9.0%
φ 400 μ m	145	299.9 μ m	30.2 μ m	299.9 μ m ± 10.1%
φ 600 μ m	158	330.7 μ m	46.8 μ m	330.7 μ m ± 14.1%

Table 8-2: 樹脂マスク法における二次元コロニー形成率/スフェロイド回収率

	φ 300 μ m	φ 400 μ m	φ 600 μ m	Average
Colonization rate	90.64%	85.38%	93.57%	89.86%
Spheroid collection rate	90.64%	84.80%	92.40%	89.28%

#### 8.4. 考察

樹脂マスク法における二次元コロニー/スフェロイドの径を測定した結果、平均値に対して二次元コロニー径では最大でも 12.4%と小さなばらつきに抑えられている。これらの平均値がフォトマスクの径に対して約 10%大きくなっている。これは 7.4 項で述べた樹脂マスク穴の拡大のほかに、ECM パターンの端まで細胞が増えたことによると考えられる。細胞のサイズが約 10μm と仮定すると、二次元コロニーの外縁部にて増えた細胞が接着可能な足場が無い状態となり、ECM パターン上の細胞が支える形で足場に接着せずに保持されているとすると、約 20μm 大きくなっていることに納得ができ、許容範囲と言える。

スフェロイドの径においても同様に、最大 14.1%と小さなばらつきとなった。スフェロイドの径は、二次元コロニーの剥離後に収縮し丸まるため二次元コロニー径よりも小さくなる。そのため、各フォトマスクの径に対してスフェロイド径は差が小さくなるのが予想されており、想定通りの結果となった。スフェロイドの径については、単層の二次元コロニーを剥離し、収縮すると φ600μm の ECM パターンに対し約 90μm のスフェロイドとなることを想定していた。しかしながら、出来上がったスフェロイドは想定より大きいものとなった。これは、二次元コロニー作製時に細胞が密になり部分的に重なり合うことで、

想定していた体積よりも大きくなっていることや、二次元コロニー剥離後にも細胞が増殖しながら丸まっていることを示唆している。細胞の増殖速度は、元の細胞の数に依存することから ECM により増殖できる面積を制限された二次元コロニーの細胞数はある一定の範囲でコントロールされ、その結果スフェロイド径のばらつきも少なくコントロールされたと考えられる (Figure 8-1)。

作製したスフェロイド径のばらつきを確認したところ、全てのサイズにおいて平均値に対して±15%以下となっており、既存の手法で示されるばらつきに対して非常に小さな値で制御できている。フォトマスクの径が小さいほど、スフェロイドを構成する細胞数が少ないため、ばらつきが小さくなる傾向が見られた (Figure 8-2)。

また、二次元コロニーの形成率とスフェロイドの回収率がほぼ同等であることから、二次元コロニーを形成することが出来れば、安定してスフェロイドを形成することが可能であることが示された。二次元コロニー形成が不十分にカウントしなかった穴についても、播種時に定着した細胞が確率的に少なかったなどの影響で、パターンが埋まる速度が遅かったためであり、培養期間を伸ばすことで二次元コロニーを形成し、スフェロイドを回収することも可能である。

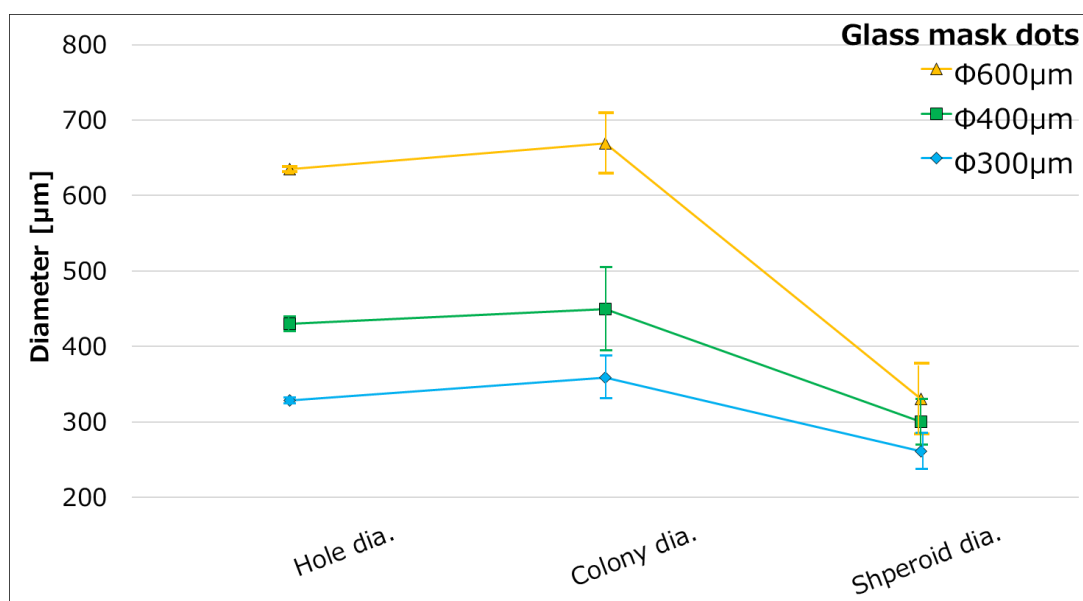


Figure 8-1: 樹脂マスク穴径毎のサイズ遷移(マーカー: 平均値, エラーバー: 標準偏差)

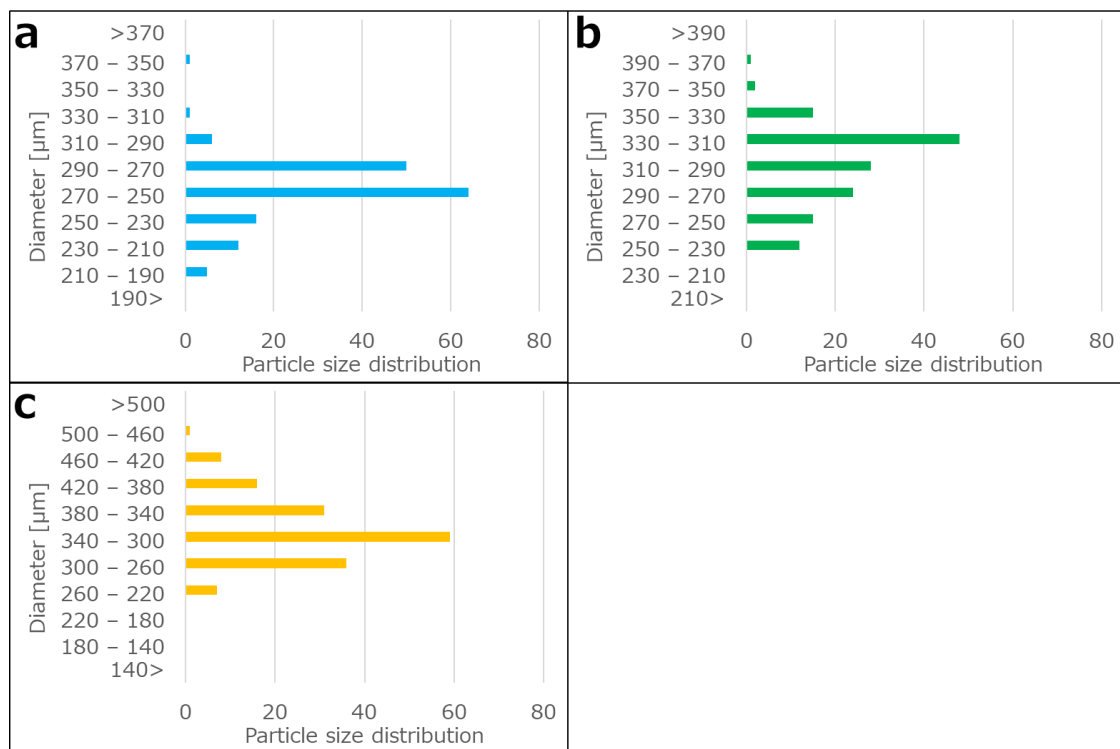


Figure 8-2: 樹脂マスク毎の作製したスフェロイドのサイズ分布(a:  $\phi$  300 $\mu\text{m}$ , b:  $\phi$  400 $\mu\text{m}$ , c:  $\phi$  600 $\mu\text{m}$ )

## 8.5. 第8章まとめ

マイクロスタンプ法の手技によるばらつきや作業性などの欠点を解消すべく、紫外線硬化樹脂を用いた樹脂マスク法を開発した。本手法では、ECMを溶かした溶液中に浸漬したまま静置することで表面がECMにコーティングされ、コーティングが不要な部分に対して施している樹脂マスクを剥がすことによってECMパターンを形成する。溶液中に浸漬することによって、ムラが無くかつ乾燥に対する配慮も必要ない。

また、ばらつきもマイクロスタンプ法より格段に小さくなった。過去のスフェロイド作製手法に関する文献[69]にも、これほど精度良くスフェロイドを作製出来ているものは無く、手法も簡便であり高いスループットが得られた。

## 8.6. 参考文献

69. Borys, B.S.; Le, A.; Roberts, E.L.; Dang, T.; Rohani, L.; Hsu, C.Y.; Wyma, A.A.; Rancourt, D.E.; Gates, I.D.; Kallos, M.S. Using computational fluid dynamics (CFD) modeling to understand murine embryonic stem cell aggregate size and pluripotency distributions in stirred suspension bioreactors. *J Biotechnol* 2019, *304*, 16-27, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.08.002.



132. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, *131*, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.

## 9. iPS スフェロイドの未分化性/初期胚分化能評価

iPS 細胞では、分化誘導を行い所望の組織の細胞への分化が研究されている。iPS 細胞は様々な刺激が分化誘導を引き起こすことは広く知られている。代表的なものとしては、培養中のコンフルエント状態の過密培養により分化が始まるとされている。創薬・再生医療への利用を鑑みると、我々の手法において不用意に分化が始まってはならない。また、同様に意図したタイミングで分化誘導が出来なくてはならない。したがって、我々の手法によって、分化能を消失するか否かを確認しなければならない。

本章では、我々の手法にて iPS 細胞のスフェロイド作製における未分化性の維持の確認、および初期胚への分化能の維持を確認する。

### 9.1. 生存率の評価

6 章の癌細胞由来株化細胞と同様に iPS 細胞においてもトリパンブルー染色を用いて生存率を評価する。採取したスフェロイドの生存率は、コントロールの二次元コロニーで  $88.13 \pm 2.26\%$  (N=5)、ドット径  $\phi$  300,  $\phi$  400 $\mu\text{m}$ ,  $\phi$  600 $\mu\text{m}$  に対し、それぞれ  $87.65 \pm 1.62\%$  (N=5),  $89.82 \pm 1.80\%$  (N=5),  $87.88 \pm 2.94\%$  (N=8) となった(Figure 9-1)。

生存率はスフェロイドのサイズに依存せずに 87.65~92.61%とばらつきも少なく高い値を示した。Steel.Dwss 検定の結果、p 値 $<0.05$ を統計的に有意とみなした時にコントロールに対して、 $\phi$  300 $\mu\text{m}$  では  $P=0.398$ 、 $\phi$  400 $\mu\text{m}$  では  $P=0.989$ 、 $\phi$  600 $\mu\text{m}$  では  $P=0.999$  となり、有意差は確認できなかった。また同様に、各パターンサイズ間においても、 $\phi$  300 $\mu\text{m}$ - $\phi$  400 $\mu\text{m}$ :  $P=0.885$ 、 $\phi$  300 $\mu\text{m}$ - $\phi$  600 $\mu\text{m}$ :  $P=0.735$ 、 $\phi$  400 $\mu\text{m}$ - $\phi$  600 $\mu\text{m}$ :  $P=0.999$  と有意な差は確認できなかった。次に、効果量の評価として Cliff's d を算出した結果、 $\phi$  300 $\mu\text{m}$ :  $d=-0.6$ 、 $\phi$  400 $\mu\text{m}$ :  $d=-0.12$ 、 $\phi$  600 $\mu\text{m}$ :  $d=-0.05$  となり、 $\phi$  400 $\mu\text{m}$ ・ $\phi$  600 $\mu\text{m}$  では非常に効果が小さく、有意な差は認められないと言える。また、 $\phi$  300 $\mu\text{m}$  においては効果量が他の条件より大きい値となった。

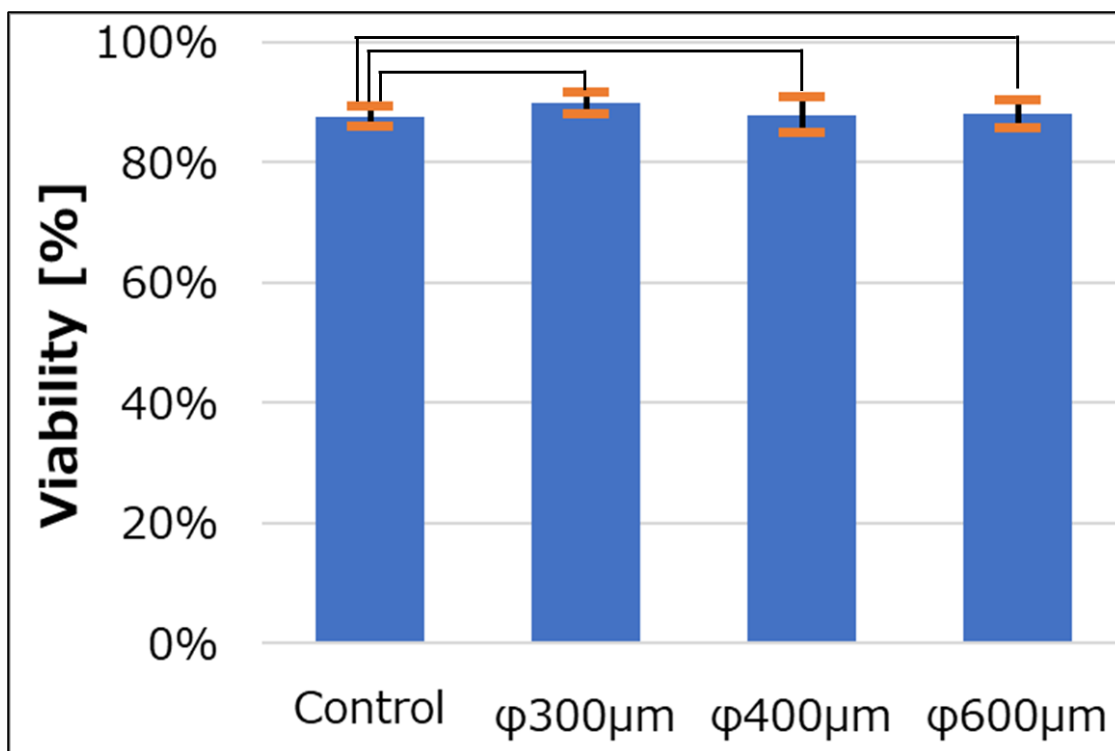


Figure 9-1: トリパンプルー染色による樹脂マスク法にパターンサイズ毎の生存率の確認結果(Steel.Dwass 検定( $p = 0.05$ ) $p$  値 $<0.05$  を統計的に有意とみなした。データは平均値±標準偏差で表した。)

## 9.2. 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は、抗体と蛍光標識物質を用いて細胞内のタンパク質や細胞内部の構造を可視化するための手法で、現代の生物学および医学において広く用いられている技術の一つである。タンパク質、核酸、受容体、内分泌ホルモン、成長因子、神経伝達物質、インビボ薬物および感染源など様々な生体分子の検出に広く用いられる。この手法では、細胞に対して特異的な抗体を用いて、タンパク質などの標的分子の特定を行う。この抗体に対して蛍光標識物質を結合させ、細胞内で標的分子が存在する場所に特定波長に光に対して蛍光が発生するようマーキングする。蛍光顕微鏡などを用いて、蛍光が発生した場所を可視化することにより、細胞内に局在するタンパク質や細胞内部の構造を観察する。本研究では、細胞の局在を示すために DAPI による核染色と、未分化性のマーカーとして 6 種 (Oct3/4, SOX2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG)、初期分化能マーカーとして三胚葉それぞれに 2 種類(外胚葉: OTX2,  $\beta$ -TUBULIN, 中胚葉: PAX2, cTNT, 内胚葉: SOX17, FOXA2)の蛍光免疫染色を行った。

### 9.2.1. DAPI

DAPIは4', 6-diamidino-2-phenylindoleで、分子式はC<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>の蛍光色素で主に核染色に用いられる。DAPIは、細胞膜を透過し核内の二本鎖DNAにおけるアデニン-チミン塩基対に結合して標識の役割を果たすことができることから、細胞中のDNAを可視化することができる。二本鎖DNAに結合したDAPIは紫外光(UV)によって励起する[133]。

本研究では細胞の位置確認に青色の蛍光を示すDAPI-Fluoromount-G(0100-20, SBA, AL, USA)核を標識し使用した。

### 9.2.2. Oct3/4

Oct4(octamer-binding transcription factor 4)はOct3またはOct3/4と称されることもあり、未分化細胞マーカーとして使用される。POU転写因子(ホメオドメインタンパク質スーパーファミリーのうち、POUドメインと呼ばれる転写因子ファミリータンパク質の総称)のOct-3/4は、多能性および生殖細胞における制御因子の候補であり哺乳類胚における多能性始原細胞集団の初期形成に必須となっている。ヒト胚性幹(ES)細胞においてはOct-3/4の正確なレベルが分化を支配しており、発現が2倍以下に増加すると原始内胚葉と中胚葉に分化し、対照的にOct-3/4の抑制は多能性の喪失と外胚葉への脱分化を誘導することが報告されている[134]。このように、Oct-3/4幹細胞の未分化性を維持するためには、Oct-3/4量が重要な要素となっている。

本研究ではOct3/4の発現確認に緑色の蛍光を示すAlexa Fluor 488でマウスモノクローナル抗体OCT3/4(1:500; sc-5279, Santa Cruz, CA, USA)を標識し使用した。

### 9.2.3. SOX2

SOX2(SRY(sex determining region Y)-box 2)は、SRY-related HMG-box(SOX)ファミリーに属する転写因子の一種で未分化状態のES細胞の自己複製維持における必須転写因子である。神経幹細胞のマーカーとして、細胞が自己複製能および多能性を有しているかを同定する際に有用である[135, 136]。SOX2はマウスおよびヒト線維芽細胞を多能性状態にリプログラミングするために用いられる重要な転写因子の一つであるため、発生過程で未分化状態の多能性幹細胞および生殖細胞で発現する。したがって、SOX2抗体を用いることによりES細胞およびiPS細胞の多能性(pluripotency)状態を検証することが可能となる。

本研究ではSOX2の発現確認に緑色の蛍光を示すAlexa Fluor 488でマウスモノクローナル抗体SOX2(1:100; sc-365823, Santa Cruz)を標識し使用した。

#### 9.2.4. SSEA4

SSEA4(Stage-specific embryonic antigen 4)は、胚発生初期および多能性幹細胞に発現する糖タンパク質で、ヒト胚性癌(EC)細胞、胚性生殖細胞(EG)細胞・ES細胞の細胞表面に発現するため、未分化性のマーカーとして使用される。このターゲットに対するモノクローナル抗体は、多能性幹細胞の特性解析に広く用いられている[137, 138]。

本研究では SSEA4 の発現確認に緑色の蛍光を示す Alexa Fluor 488 でマウスモノクローナル抗体 SSEA4 (1 : 1000; 4755, CST, USA) を標識し使用した。

#### 9.2.5. TRA-1-60

TRA-1-60 は細胞分化に関与する細胞表面タンパク質である。細胞表面抗原は、胚発生と発癌の両方における発生制御細胞の機能と発現を特徴付けるため指標である。TRA-1-60 エピトープは ES 細胞や始原生殖細胞にも見られ、TRA-1-60 は生殖細胞腫瘍患者の血清マーカーとして機能する細胞表面のシアリル化されたケラタン硫酸プロテオグリカンによって運ばれる糖鎖である[138, 139]。

本研究では TRA-1-60 の発現確認に緑色の蛍光を示す Alexa Fluor 488 でマウスモノクローナル抗体 TRA-1-60 (1 : 1000; 4746, CST) を標識し使用した。

#### 9.2.6. TRA-1-81

TRA-1-81 抗体は、EC 細胞・EG 細胞・ES 細胞、iPS 幹細胞の表面に存在する高分子量炭水化物エピトープと反応する。他の幹細胞特異的マーカーと同様に、TRA-1-81 抗体が認識するエピトープは細胞の分化に伴い消失するため、未分化性のマーカーとして利用される[137, 140]。

本研究では TRA-1-81 の発現確認に緑色の蛍光を示す Alexa Fluor 488 でマウスモノクローナル抗体 TRA-1-81 (1 : 1000; 4745, CST) を標識し使用した。

#### 9.2.7. NANOG

NANOG タンパク質は、未分化細胞の状態を維持するために必要な転写因子の 1 つであり、幹細胞の自己複製能を維持するために重要な役割を果たしていることから、NANOG タンパク質は、発生初期の ES 細胞や、iPS 細胞などの多能性幹細胞における未分化性のマーカーとして利用される。

本研究では NANOG の発現確認に赤色の蛍光を示す Alexa Fluor 594 でウサギ抗体

NANOG (1 : 500; 4903, CST) を標識し使用した。

#### 9.2.8. OTX2

本研究では OTX2 の発現確認に緑色の蛍光を示す Alexa Fluor 488 でヤギポリクローナル抗体 OTX2 (1 : 100; SC031B, R&D systems, MN, USA) を標識し初期外胚葉マーカーとして使用した。

#### 9.2.9. $\beta$ -TUBULIN

本研究では  $\beta$ -TUBULIN の発現確認に赤色の蛍光を示す Alexa Fluor 594 でウサギモノクローナル抗体  $\beta$ -TUBULIN (1 : 100; 80713-1-RR, Proteintech, IL, USA) を標識し初期外胚葉マーカーとして使用した。

#### 9.2.10. PAX2

本研究では PAX2 の発現確認に緑色の蛍光を示す Alexa Fluor 488 でマウスモノクローナル抗体 PAX2 (1 : 100; MBS4380650, MyBioSource, CA, USA) を標識し初期中胚葉マーカーとして使用した。

#### 9.2.11. cTNT

本研究では cTNT の発現確認に赤色の蛍光を示す Alexa Fluor 594 でウサギポリクローナル抗体心筋トロポニン T (1 : 100; 15513-1-AP, Proteintech) を標識し初期中胚葉マーカーとして使用した。

#### 9.2.12. SOX17

本研究では SOX17 の発現確認に緑色の蛍光を示す Alexa Fluor 488 でマウスモノクローナル抗体 SOX17 (1:100; TA500044, Origene, MD, USA) を標識し初期内胚葉マーカーとして使用した。

#### 9.2.13. FOXA2

本研究では FOXA2 の発現確認に赤色の蛍光を示す Alexa Fluor 594 でウサギモノクローナル抗体 FOXA2/HNF3 $\beta$  (1:400; 8186S, CST) を標識し初期内胚葉マーカーとして使用

した。

### 9.3. 二次元コロニー内の iPS 細胞の未分化性の評価方法

iPS 細胞では、様々な刺激が分化誘導が誘発されるトリガーとなり得る。したがって、スフェロイドの作製の工程によって分化誘導が誘発されないことを確認する必要がある。スフェロイド化する直前の二次元コロニーにおいて未分化性を蛍光免疫染色を用いて確認する。

細胞はそれぞれ  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  及び  $5 \times 10^3/\text{cm}^2$  で播種・培養し、翌日（1日目）、および各ドットが細胞でほぼコンフルエントになるまで増殖した4日後と8日後に免疫染色に用いた。基板上で増殖した iPS 細胞を DMEM または RPMI1640 で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/PBS (-) を用い室温で 15 分間固定した。次に細胞を 0.3% Triton X-100 (Nacalai tesque)/PBS(-) (PBT) で室温にて 10 分間透過処理し、続いて 0.1% PBT で室温で 5 分間のセットで 2 回洗浄し、5%スキムミルクを含む 0.1% PBT で室温で 60 分間細胞固定をおこなった。その後、細胞を 0.1% PBT で室温 5 分間のセットで 3 回洗浄し、0.1% PBT に以下の一次抗体を加えて一晩インキュベートした。

- ・マウスモノクローナル抗体 OCT3/4 (1 : 500; sc-5279, Santa Cruz)
- ・マウスモノクローナル抗体 SOX2 (1 : 100; sc- 365823, Santa Cruz)
- ・マウスモノクローナル抗体 TRA-1-60 (1: 1000; 4746, CST)
- ・マウスモノクローナル抗体 TRA-1-81 (1: 1000; 4745, CST)
- ・マウスモノクローナル抗体 SSEA4 (1 : 1000; 4755, CST)
- ・ウサギ抗体 NANOG (1 : 500; 4903, CST)

インキュベート後、細胞を PBS(-) で 3 回洗浄し Alexa Fluor 488 または 594 標識をおこなう。その後、ロバまたはウサギ抗体マウス IgG 抗体 (1 : 1000; Life Technologies, Tokyo, Japan) と室温で 1 時間インキュベートした。VECTASHIELD (H-100, Vector Laboratories, CA, USA) を数滴滴下した後、蛍光仕様に改造した正立顕微鏡 (BX43, Evident)、専用カメラ (DP-74, Evident)、cellSens standard imaging software (Evident) を用いて画像を取得した。

### 9.4. iPS 細胞の未分化性の評価結果

翌日（1日目）とほぼコンフルエントになった4日目に、免疫染色を行った。未分化性は細胞核を染色した DAPI の青色の蛍光と重なるように細胞骨格上の未分化性マーカーとなるタンパク質である OCT3/4、SOX2、NONOG、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81 の局在を示す緑色及び赤色の蛍光で確認する。細胞が存在する場所は細胞核を染色した青色蛍光によって確認できる。各未分化性マーカーの染色と同時に DAPI 染色をおこなうことに

より、未分化性が維持されている場合にはこの青色の蛍光と重なるように細胞骨格上の各未分化性マーカーに結合した各抗体の蛍光が示される。1日目と4日目の結果では青色の蛍光に重なるように、緑色または赤色の蛍光が全面にわたり均等に確認できたことから、未分化性が維持されていることが確認された。一方、8日目の結果では、 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$  で播種し、8日目にコンフルエントを超えるの状態まで培養し、免疫染色を行った。DAPI染色し青色の蛍光を示す細胞が存在する範囲に対して、それぞれの未分化マーカーの蛍光が点在している状態で、青色の蛍光のみの領域が多く存在し、全てのタンパク質の局在は4日目よりも低下していた(Figure 9-2)。

一般的に iPS 細胞がコンフルエント状態に晒されたときに、そのストレスによって分化が誘導されると言われている。8日目の結果はオーバーコンフルエント状態がストレスとなり、分化が誘導されたことを示していると考えられる。したがって、通常の培養時と同様の管理ではあるが、二次元コロニー形成時においてもオーバーコンフルエント状態にしない管理が必要となり、注意を要する。

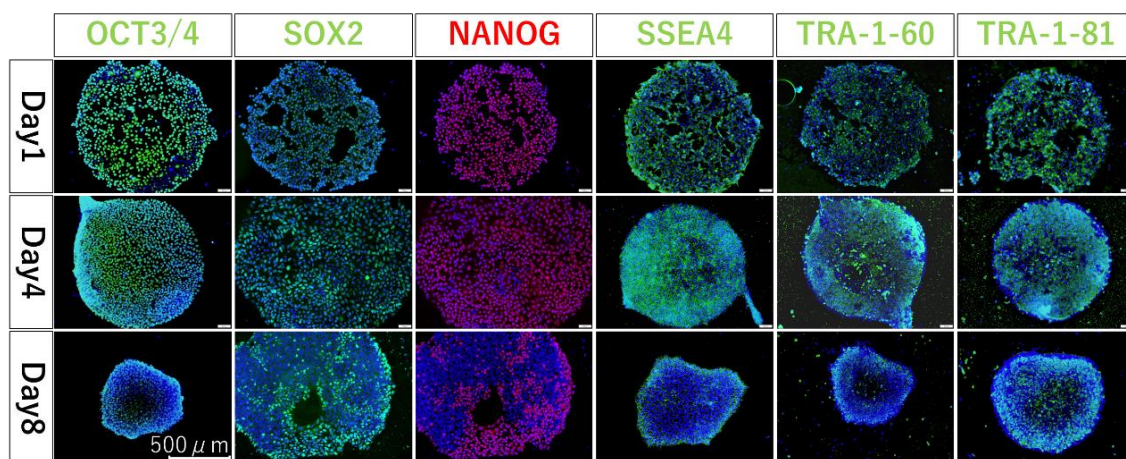


Figure 9-2: 蛍光免疫染色による未分化性評価結果

### 9.5. 初期胚(三胚葉)の分化能の評価方法

ECM 上でコンフルエントになった iPS 細胞二次元コロニーを、初期内胚葉、中胚葉、外胚葉に分化させた。初期内胚葉への分化は、2mM L-アラニル-グルタミン(Nacalai Tesque)、インスリンなしの  $1 \times \text{B27}$  サプリメント(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、100ng/ $\mu\text{L}$  組換えアクチビン A(AproScience, Japan)、3 $\mu\text{M}$  CHIR99021 (Nacalai Tesque)、100nM Wortmannin (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA) で2日間培養した。その後、上記の培地から Wortmannin をさらに2日間除いた。初期中胚葉への分化のために、2mM L-アラニル-グルタミンと  $1 \times \text{NS}$  サプリメントからインスリン(Thermo)を除いた RPMI1640 培地に、10ng/ $\mu\text{L}$  の組換えアクチビン A と 30ng/ $\mu\text{L}$  の組換えヒト BMP4 を添加し、3 $\mu\text{M}$  の CHIR99021 と 100nM の Wortmannin を加えて3日間培



養した。

細胞はそれぞれ  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  で播種・培養し、各ドットが細胞でほぼコンフルエントになるまで増殖した 4~5 日後に免疫染色を行った。基板上で増殖した iPS 細胞を DMEM または RPMI1640 で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/PBS (-) により室温 15 分間固定した。次に細胞を 0.3% PBT で 10 分間室温にて透過処理し、続いて 0.1% PBT で室温で 5 分間のサイクルで 2 回洗浄し、5%スキムミルクを含む 0.1% PBT で室温で 60 分間ブロッキングした。その後、細胞を 0.1% PBT で室温で 5 分間のサイクルで 3 回洗浄し、0.1% PBT に以下の一次抗体を加えて一晩インキュベートした。

次に初期胚三胚葉の分化能を確認するため、それぞれに固有のタンパク質マーカーで蛍光免疫染色をおこなう。初期内胚葉マーカーとしてはウサギモノクローナル抗体 FOXA2/HNF3 $\beta$  (1 : 400; 8186S, CST) およびマウスモノクローナル抗体 SOX17 (1 : 100; TA500044, Origene)を使用した。初期中胚葉マーカーとしてはウサギポリクローナル抗体心筋トロポニン T (1 : 100; 15513-1-AP, Proteintech) およびマウスモノクローナル抗体 PAX2 (1 : 100; MBS4380650, MyBioSource)を使用した。初期外胚葉マーカーとしては、ヤギポリクローナル抗体 OTX2 (1 : 100; SC031B, R&D systems) およびウサギモノクローナル抗体  $\beta$  Tubulin (1 : 100; 80713-1-RR, Proteintech)を使用した。

インキュベート後、細胞を PBS(-) で 3 回洗浄し Alexa Fluor 488 または 594 標識する。その後、ロバまたはウサギ抗体マウス IgG 抗体 (1 : 1000; Life Technologies, Tokyo, Japan) と室温で 1 時間インキュベートした。VECTASHIELD (H-100, Vector Laboratories, CA, USA) を数滴滴下した後、蛍光仕様に改造した正立顕微鏡 (BX43, Evident)、専用カメラ (DP-74, Evident)、cellSens standard imaging software (Evident) を用いて画像を取得した。

## 9.6. 初期胚(三胚葉)の分化能の評価結果

未分化性の評価時と同様に、細胞が存在する場所は細胞核を DAPI 染色した青色の蛍光で示され、三胚葉各 2 種類の分化能マーカーはそれぞれ緑色と赤色に染色した。分化能を有する場合には、青色の蛍光に重なるように緑色及び赤色の蛍光が確認できる。

観察の結果、外胚葉では青・緑・赤の光が強く発光し混ざりあうことにより白っぽく見えていることから、全体的に分化能マーカーが発現していることが確認できる。

中胚葉・内胚葉については、DAPI 染色した青色の発光の密度が薄く、弱い光となっている。これは、分化誘導をする際に添加した試薬によるセレクションの影響によって、中胚葉・内胚葉に分化しにくい細胞がアポトーシスを起こすため細胞数が減少したことによる。しかしながら、分化能マーカーを確認したところ外胚葉ほど強くはないが、中胚葉・内胚葉ともに細胞が局在する位置に重なるように緑色・赤色の蛍光が確認できることから、三胚葉全てにおいて分化能を有していることが確認された。

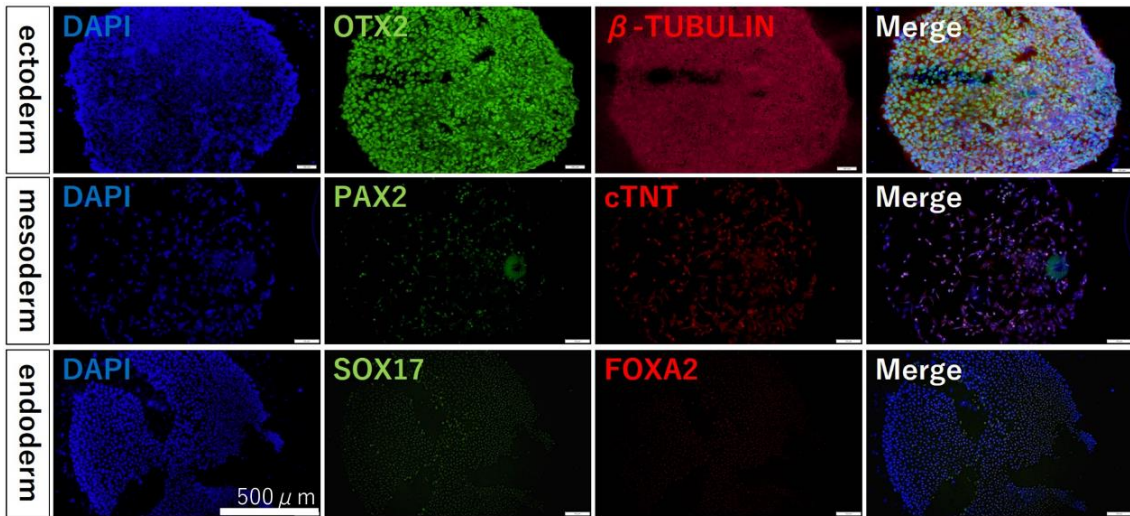


Figure 9-3: 蛍光免疫染色による三胚葉分化能確認結果

### 9.7. 考察

全てのサイズの ECM ドットにおいて、生存率はコントロールに対して有意差はみとめられなかった。このことから、iPS 細胞においても癌細胞由来株化細胞同様に、基板の剥離機序による生存率低下は発生しなかった。

次に、未分化性の維持については、1日目、4日目については未分化性の維持を確認できたが、8日目になると未分化性を示すマーカーの蛍光が減り、分化していることが分かる。これは、iPS 細胞を増やす通常の細胞培養プロセスでも発生する現象で、オーバーコンフルエント状態になるとそのストレスが原因で分化誘導が促されるといものである。そのため、長い培養期間を経た 8 日目に未分化性を維持できなくなったことは妥当であると考えられる。この結果より、本提案法においても iPS 細胞を扱う際には、二次元コロニー形成時にオーバーコンフルエントにならないように管理することが重要であることが確認された。

最後に三胚葉への分化能の確認を行った。外胚葉の結果では、ECM ドットのパターン上に均一に細胞の存在を示す青色の蛍光があり、さらに、2 種の抗体の蛍光が重なることで白色の強い発光が得られたことから、外胚葉への分化能が確認された。これに対して中胚葉・内胚葉の細胞の存在を示す青色の蛍光および各胚葉のマーカーを示す赤色・緑色の蛍光が、想定されるコロニーの面積に対してまばらに分布している。これは、分化誘導のプロトコルで添加した試薬によるセレクションの影響と考えられる。中胚葉/内胚葉への分化誘導では、アクチビン A を適量添加することにより、中胚葉/内胚葉それぞれへの分化に適さない細胞がアポトーシスを起こし排除される。その結果、二次元コロニー内の細胞はセレクションの影響によりまばらな状態となるが、残った細胞には分化能を示すマーカーの蛍光を確認できたことから、三胚葉への分化能を有することが確認できた。

また、提案手法では、この分化誘導をおこなったときにも接着状態を維持していることから、初期分化誘導後にセレクションで減った細胞を増殖する工程を挟むことも可能と考えられるため、今後さらに分化誘導を進める検討が期待される。

## 9.8. 第9章まとめ

本章では樹脂マスク法における生存率・未分化性の維持・分化能の維持についての確認を行った。生存率の確認では、二次元コロニーと  $\phi 300\mu\text{m}$ ,  $\phi 400\mu\text{m}$ ,  $\phi 600\mu\text{m}$  それぞれのスフェロイドに対して有意差が認められず、同等の生存率であることが示された。未分化性の評価では、細胞間が込み合わない播種後 4 日目までは未分化性を維持していることが確認された。また、オーバーコンフルエント状態のストレスにより未分化性が維持できないことも確認した。これは通常の iPS 細胞を増殖する通常培養プロトコルにおける注意事項とも合致する。最後に分化能の評価では、セレクションの工程が無い外胚葉においては良好な蛍光を示した。中胚葉/内胚葉においてはセレクションの影響により細胞が減った影響により散逸的な像となったが、細胞が局在する場所では分化能マーカーの蛍光が確認でき、分化能があることが示された。

全ての項目において良好な結果が得られたことから、提案手法は iPS 細胞の研究における分化誘導に対して悪影響を及ぼすことなくスフェロイド化ができることが確認できた。

また、分化能の確認ではセレクションにより細胞のアポトーシスは、同一のプロトコルを用いて分化誘導を行う場合には同様の事象が発生する。したがって、接着性細胞が増殖することが可能な足場への接着状態で分化誘導をおこなうことができる我々の提案手法の新たなメリットが示された。

## 9.9. 参考文献

133. Bonne, D.; Heuséle, C.; Simon, C.; Pantaloni, D. 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 1985, *260*, 2819-2825, doi:10.1016/s0021-9258(18)89437-6.
134. Hitoshi Niwa; Austin G. Smith; Miyazaki, J.-i. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* 2000, *24*, 372-376., doi:10.1038/74199.
135. Lin, B.; Coleman, J.H.; Peterson, J.N.; Zunitch, M.J.; Jang, W.; Herrick, D.B.; Schwob, J.E. Injury Induces Endogenous Reprogramming and Dedifferentiation of Neuronal Progenitors to Multipotency. *Cell Stem Cell* 2017, *21*, 761-774 e765, doi:10.1016/j.stem.2017.09.008.
136. Wang, Y.; He, L.; Du, Y.; Zhu, P.; Huang, G.; Luo, J.; Yan, X.; Ye, B.; Li, C.; Xia, P.; Zhang, G.; Tian, Y.; Chen, R.; Fan, Z. The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell* 2015, *16*, 413-425, d

oi:10.1016/j.stem.2015.03.003.

137. J.K. HENDERSON; J.S. DRAPER; H.S. BAILLIE; S. FISHEL; J.A. THOMSON; H. MOORE; AND REWS, P.W. Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens. *Stem Cells* 2002, *20*, 329-337, doi:10.1634/stemcells.20-4-329.
138. Jonathan S. Draper; Christine Pigott; Thomson, J.A.; Andrews, P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* 2002, *200*, 249-258.
139. Andrews, P.W.; Fenderson, B.; Hakomori, S. Human embryonal carcinoma cells and their differentiation in culture. *Int J Androl* 1987, *10*, 95-104, doi:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00170.x.
140. Mizrak, S.C.; Chikhovskaya, J.V.; Sadri-Ardekani, H.; van Daalen, S.; Korver, C.M.; Hovingh, S. E.; Roepers-Gajadien, H.L.; Raya, A.; Fluiters, K.; de Reijke, T.M.; de la Rosette, J.J.; Knegt, A. C.; Belmonte, J.C.; van der Veen, F.; de Rooij, D.G.; Repping, S.; van Pelt, A.M. Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod* 2010, *25*, 158-167, doi:10.1093/humrep/dep354.

## 10. 結論

創薬・再生医療を目的としてフッ素樹脂と ECM を組み合わせることにより、弱い水流で細胞二次元コロニーが剥離し、スフェロイド化する機能性足場を開発した。複数種の ECM と複数の癌細胞由来株化細胞の組み合わせで本手法の有効性を示し、かつ巨大な癌スフェロイドが作製可能であることを示した。iPS 細胞を用いた検討では、高い生存率と、未分化性の維持、および初期胚分化能を保持していることを示し、オルガノイドへと繋がるスフェロイドの作製手法としての有効性を示した。

### 10.1. まとめ

第 1 章では、医薬品や医療機器の開発において、最終段階での動物実験による生体安全性の評価や機能性の評価が必須であるにもかかわらず、各国で動物実験が禁止されるパラダイムシフトが発生している背景を述べた。また、このような状況における動物実験の代替手段として、培養細胞を用いた評価が期待されているが、二次元の平面培養では目的とした組織の機能性を示さないため、in-vitro 環境において生体内同様の評価ができるよう、生体を模倣した三次元構造を有するオルガノイドが必要とされる実情を説明した。これを実現するためには、品質の管理されたオルガノイドを大量に生産する技術が必要であり、まずその前段階であるスフェロイドを簡便かつ大量に作製する手段が求められていることを説いた。これに対して従来のスフェロイド作製手法は様々ありながら、いずれも十分なものではないため、新たな方法を開発する必要性と本研究の目的を記した。

第 2 章では既存のスフェロイドの作製手法を分類・分析し、各手法における利点・欠点を明確化した。分析した結果よりスフェロイド作製手法に求められる要求仕様を定義した。

第 3 章では過去の検討結果から、フッ素樹脂と ECM の組み合わせによる剥離機序の推定に至った経緯を説明した。提案手法ではフッ素樹脂の性質と一般的なフッ素樹脂上への細胞接着アプローチと異なり、表面改質を行わずファンデルワールス力による接着を用いる。結晶性樹脂である PTFE は細胞培養において、透過観察ができないため、視認性向上の観点から、非晶質のフッ素樹脂を選択し、その化学的不活性の評価として表面自由エネルギーの低さを示す撥水性を評価した。

第 4 章では提案手法の原理検証をおこなうために ECM のパターンニング方法を検討した。ECM のパターンニングには、PTFE で作製した鋳型を用いて PDMS 製のマイクロスタンプを作製し、このスタンプを用いて ECM を転写した。

第 5 章では HepG2 と MCF-7 の 2 種の癌細胞由来株化細胞と、マトリゲル・フィブロネクチン・ヴィトロネクチン・コラーゲンタイプ IV・iMatrix silk の組み合わせにて提案手法の原理検証をおこなった。全ての組み合わせにおいてスフェロイドを形成し、癌スフェロイドへの活用の可能性を示した。

第 6 章では作製したスフェロイドに対して生存率を評価した。通常のスフェロイドでは  $\phi 200\mu\text{m}$  を超えるスフェロイドでは内部への酸素や栄養の循環が滞り、内部が壊死すると言われているが、提案手法では平均  $450\mu\text{m}$  と巨大なスフェロイドにおいても 80% を超える高い生存率を示した。既存の手法との比較として実施したハンギングドロップ法では、同様の寸法のスフェロイドを構成する細胞数で実施したが、スフェロイドを形成できなかったことから、提案手法の有効性が示された。

第 7 章ではマイクロスタンプ法の欠点であった手技によるばらつきと煩雑さを改善するため、リソグラフィ技術を用いて基板上に直接紫外線硬化樹脂のマスクを形成する方法を開発した。マイクロスタンプ法では、スタンプ先端への ECM 溶液の付着量や押圧のコントロールに手技のばらつきが生じていた。そのため、ECM の転写パターンに滲みや欠け・汚れが発生し、寸法精度を悪化していた。また、ECM 溶液が少ないため、乾燥の影響もあった。樹脂マスク法では、ECM をコーティングする場所にのみ開口を有し、他の部分は樹脂マスクによって覆われている。そのため、ECM 溶液中に浸漬しインキュベーションするのみで開口部の基板上に ECM がコーティングされる。手技によるばらつきも発生せず、基板を設置して ECM 溶液を満たすのみのため、パターニングの精度を向上しつつ工数も大幅に削減した。

第 8 章では樹脂マスク法を用いて、 $\phi 300\mu\text{m}$ ,  $\phi 400\mu\text{m}$ ,  $\phi 600\mu\text{m}$  のフォトマスクのパターンサイズにて iPS 細胞のスフェロイドを作製し、その寸法精度を評価した。作製されたスフェロイドは、 $\phi 300\mu\text{m}$  のパターンにおいて平均値  $\pm$  標準偏差で  $261.3\mu\text{m} \pm 9\%$  と小さく制御できており、最もばらつきの大きかった  $\phi 600\mu\text{m}$  のパターンにおいても  $330.7\mu\text{m} \pm 14.1\%$  となり、樹脂マスク法における優れたスフェロイド寸法制御性能が示された。

第 9 章では生存率・未分化性の維持および初期胚分化能の評価をおこなった。生存率は、いずれのパターンサイズにおいても平面培養のコントロールと比較して同等となっており、スフェロイド化の工程において細胞に対してダメージが無いことが示された。また、Oct3/4, SOX2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG の 6 種の未分化性マーカーにおいて未分化性を維持していることが確認された。初期胚分化能の確認では、誘導過程のセレクションにより内胚葉・中胚葉においてはアポトーシスが起り、細胞の数が減少し蛍光が弱かったが、三胚葉全てにおいて分化能を維持していることが示された。

我々の提案する手法では、フッ素樹脂足場上に ECM ドットパターンを形成し、ECM 上で増殖した二次元コロニーを弱い水流で剥離しスフェロイド化する。この新しい方法では、化学的（酵素）処理や物理的刺激を与えることなくスフェロイド化が可能であることや、平面培養の状態で分化誘導をかけることができること、また特別な加工なく巨大なスフェロイドの内部まで高い生存率を保つなど、既存の手法にはない特徴を有する。この特徴はオルガノイド作製の前段階のスフェロイドとして非常に有用である。また、この提案手法では、我々の基板を用いて通常の細胞培養を行うだけで容易にスフェロイドを得ることが

でき、比較的簡便かつ低コストな技術として期待され、スフェロイド/オルガノイド研究への新規参入の障壁を下げ、スフェロイド/オルガノイドを用いた創薬や再生医療研究の活発化にも貢献できると考える。今後は、さらなる分化誘導を評価し、サイズ制御可能な iPS 細胞からスフェロイド/オルガノイドを作製する方法を確立する。

## 10.2. 今後の研究課題・展望

本研究では、初期胚までの分化能を確認したが、今後はさらにオルガノイドへと繋げることが重要と考える。また、通常  $200\mu\text{m}$  を超えるスフェロイドは内部が壊死と言われている中で、我々の手法では癌細胞由来の株化細胞で約  $450\mu\text{m}$ 、iPS 細胞で約  $330\mu\text{m}$  と大きいスフェロイドにおいて高い生存率を確認している。この高い生存率の機序を解き明かすことにより、さらに我々の手法の優位性が確立できると考える。

## 参考文献

1. EU (2006) Regulation EC No. 1907/2006 OF The European Parliament and of the Council of concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. .
2. ICH (2011) ICH Guideline, Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use s2(r1), Approval by the Steering Committee of S2(R1) under Step 4 and recommendation for adoption to the three ICH regulatory bodies (9 November 2011). .
3. SCCS (2014) Addendum to the SCCS's Notes of Guidance (NoG) for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation 8th Revision, SCCS/1501/12. . doi:10.2772/47128.
4. EU (2009) European Union 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast). Official Journal L342, 22.12.2009. .
5. Nath, S.; Devi, G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* 2016, *163*, 94-108, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
6. Hutchinson, L.; Kirk, R. High drug attrition rates--where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 2011, *8*, 189-190, doi:10.1038/nrclinonc.2011.34.
7. Goetz, M.P.; Rae, J.M.; Suman, V.J.; Safgren, S.L.; Ames, M.M.; Visscher, D.W.; Reynolds, C.; Couch, F.J.; Lingle, W.L.; Flockhart, D.A.; Desta, Z.; Perez, E.A.; Ingle, J.N. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005, *23*, 9312-9318, doi:10.1200/JCO.2005.03.3266.
8. Kurihara, S.; Fujioka, M.; Hirabayashi, M.; Yoshida, T.; Hosoya, M.; Nagase, M.; Kato, F.; Ogasawara, K.; Okano, H.; Kojima, H.; Okano, H.J. Otic Organoids Containing Spiral Ganglion Neuron-like Cells Derived from Human-induced Pluripotent Stem Cells as a Model of Drug-induced Neuropathy. *Stem Cells Transl Med* 2022, *11*, 282-296, doi:10.1093/stcltm/szab023.
9. Crespo, M.; Vilar, E.; Tsai, S.Y.; Chang, K.; Amin, S.; Srinivasan, T.; Zhang, T.; Pipalia, N.H.; Chen, H.J.; Witherspoon, M.; Gordillo, M.; Xiang, J.Z.; Maxfield, F.R.; Lipkin, S.; Evans, T.; Chen, S. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nature medicine* 2017, *23*, 878-884, doi:10.1038/nm.4355.
10. Nii, T.; Makino, K.; Tabata, Y. Three-Dimensional Culture System of Cancer Cells Combined with Biomaterials for Drug Screening. *Cancers (Basel)* 2020, *12*, doi:10.3390/cancers12102754.



11. Gomez, S.; Vlad, M.D.; Lopez, J.; Fernandez, E. Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2016, *42*, 341-350, doi:10.1016/j.actbio.2016.06.032.
12. Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K.M.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem* 2007, *46*, 73-84, doi:10.1042/BA20060134.
13. Lancaster, M.A.; Renner, M.; Martin, C.A.; Wenzel, D.; Bicknell, L.S.; Hurles, M.E.; Homfray, T.; Penninger, J.M.; Jackson, A.P.; Knoblich, J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013, *501*, 373-379, doi:10.1038/nature12517.
14. Mariani, J.; Coppola, G.; Zhang, P.; Abyzov, A.; Provini, L.; Tomasini, L.; Amenduni, M.; Szekely, A.; Palejev, D.; Wilson, M.; Gerstein, M.; Grigorenko, E.L.; Chawarska, K.; Pelphrey, K.A.; Howe, J.R.; Vaccarino, F.M. FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* 2015, *162*, 375-390, doi:10.1016/j.cell.2015.06.034.
15. Pasca, A.M.; Sloan, S.A.; Clarke, L.E.; Tian, Y.; Makinson, C.D.; Huber, N.; Kim, C.H.; Park, J.Y.; O'Rourke, N.A.; Nguyen, K.D.; Smith, S.J.; Huguenard, J.R.; Geschwind, D.H.; Barres, B.A.; Pasca, S.P. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods* 2015, *12*, 671-678, doi:10.1038/nmeth.3415.
16. Gabriel, E.; Albanna, W.; Pasquini, G.; Ramani, A.; Josipovic, N.; Mariappan, A.; Schinzel, F.; Karch, C.M.; Bao, G.; Gottardo, M.; Suren, A.A.; Hescheler, J.; Nagel-Wolfrum, K.; Persico, V.; Rizzoli, S.O.; Altmuller, J.; Riparbelli, M.G.; Callaini, G.; Goureau, O.; Papantonis, A.; Busskamp, V.; Schneider, T.; Gopalakrishnan, J. Human brain organoids assemble functionally integrated bilateral optic vesicles. *Cell Stem Cell* 2021, *28*, 1740-1757 e1748, doi:10.1016/j.stem.2021.07.010.
17. Camp, J.G.; Badsha, F.; Florio, M.; Kanton, S.; Gerber, T.; Wilsch-Brauninger, M.; Lewitus, E.; Sykes, A.; Hevers, W.; Lancaster, M.; Knoblich, J.A.; Lachmann, R.; Paabo, S.; Huttner, W.B.; Treutlein, B. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, *112*, 15672-15677, doi:10.1073/pnas.1520760112.
18. Dye, B.R.; Hill, D.R.; Ferguson, M.A.; Tsai, Y.H.; Nagy, M.S.; Dyal, R.; Wells, J.M.; Mayhew, C.N.; Nattiv, R.; Klein, O.D.; White, E.S.; Deutsch, G.H.; Spence, J.R. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 2015, *4*, doi:10.7554/eLife.05098.
19. Kagan, B.J.; Kitchen, A.C.; Tran, N.T.; Parker, B.J.; Bhat, A.; Rollo, B.; Razi, A.; Friston, K.J. In vitro neurons learn and exhibit sentience when embodied in a simulated game-world. *BioRxiv Preprint* 2021, doi:10.1101/2021.12.02.471005.
20. Raja, W.K.; Mungenast, A.E.; Lin, Y.T.; Ko, T.; Abdurrob, F.; Seo, J.; Tsai, L.H. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer

- r's Disease Phenotypes. PLoS One 2016, *11*, e0161969, doi:10.1371/journal.pone.0161969.
21. Garcez, P.P.; Loiola, E.C.; Costa, R.M.d.; Higa, L.M.; Trindade, P.; Delvecchio, R.; Nascimento, J.M.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Rehen, S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *SCIENCE* 2016, *352*, 816-818, doi:10.1126/science.aaf6116.
  22. Narayan, N.J.C.; Requena, D.; Lalazar, G.; Ramos-Espiritu, L.; Ng, D.; Levin, S.; Shebl, B.; Wang, R.; Hammond, W.J.; Saltsman, J.A., 3rd; Gehart, H.; Torbenson, M.S.; Clevers, H.; LaQuaglia, M.P.; Simon, S.M. Human liver organoids for disease modeling of fibrolamellar carcinoma. *Stem Cell Reports* 2022, *17*, 1874-1888, doi:10.1016/j.stemcr.2022.06.003.
  23. Tomofuji, K.; Fukumitsu, K.; Kondo, J.; Horie, H.; Makino, K.; Wakama, S.; Ito, T.; Oshima, Y.; Ogiso, S.; Ishii, T.; Inoue, M.; Hatano, E. Liver ductal organoids reconstruct intrahepatic biliary trees in decellularized liver grafts. *Biomaterials* 2022, *287*, 121614, doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121614.
  24. Sampaziotis, F.; de Brito, M.C.; Madrigal, P.; Bertero, A.; Saeb-Parsy, K.; Soares, F.A.C.; Schrupf, E.; Melum, E.; Karlsen, T.H.; Bradley, J.A.; Gelson, W.T.; Davies, S.; Baker, A.; Kaser, A.; Alexander, G.J.; Hannan, N.R.F.; Vallier, L. Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nat Biotechnol* 2015, *33*, 845-852, doi:10.1038/nbt.3275.
  25. Ogawa, M.; Ogawa, S.; Bear, C.E.; Ahmadi, S.; Chin, S.; Li, B.; Grompe, M.; Keller, G.; Kamath, B.M.; Ghanekar, A. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2015, *33*, 853-861, doi:10.1038/nbt.3294.
  26. Nunez-Nescolarde, A.B.; Nikolic-Paterson, D.J.; Combes, A.N. Human Kidney Organoids and Tubuloids as Models of Complex Kidney Disease. *Am J Pathol* 2022, *192*, 738-749, doi:10.1016/j.ajpath.2022.01.009.
  27. Tekguc, M.; Gaal, R.C.V.; Uzel, S.G.M.; Gupta, N.; Riella, L.V.; Lewis, J.A.; Morizane, R. Kidney organoids: a pioneering model for kidney diseases. *Transl Res* 2022, doi:10.1016/j.trsl.2022.06.012.
  28. Trush, O.; Takasato, M. Kidney organoid research: current status and applications. *Curr Opin Genet Dev* 2022, *75*, 101944, doi:10.1016/j.gde.2022.101944.
  29. Takasato, M.; Er, P.X.; Chiu, H.S.; Maier, B.; Baillie, G.J.; Ferguson, C.; Parton, R.G.; Wolvetang, E.J.; Roost, M.S.; Chuva de Sousa Lopes, S.M.; Little, M.H. Kidney organoids from human iPSCs contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015, *526*, 564-568, doi:10.1038/nature15695.
  30. McCracken, K.W.; Cata, E.M.; Crawford, C.M.; Sinagoga, K.L.; Schumacher, M.; Rockich, B.E.; Tsai, Y.H.; Mayhew, C.N.; Spence, J.R.; Zavros, Y.; Wells, J.M. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature* 2014, *516*, 400-404, doi:10.1038/nature13863.

31. Allam-Ndoul, B.; Bégin, F.; Houde, A.; Di Marzo, V.; Veilleux, A.; Silvestri, c.; Flamand, N.; Tino co-Mar, B.A. Su1124 SMALL INTESTINE EPITHELIAL ORGANOID AS A MODEL TO INVESTIGATE THE ROLE OF THE ENDOCANNABINOIDOME ON INTESTINAL PARACELLULAR PERMEABILITY DURING INFLAMMATION. *Gastroenterology* 2020, *158*, doi:10.1016/s0016-5085(20)31975-2.
32. Hou, X.; Barthel, E.R.; Speer, A.L.; Levin, D.E.; Grant, C.N.; Spurrier, R.G.; Garcia, S.; Grikscheit, T.C. Small Intestine Organoid Units Can Be Maintained in Long-Term Culture without Exogenous Growth Factors, with Subsequent Formation of Tissue-Engineered Small Intestine. *Journal of Surgical Research* 2014, *186*, doi:10.1016/j.jss.2013.11.680.
33. Isani, M.A.; Schlieve, C.R.; Fowler, K.L.; Nucho, L.-M.A.; Grikscheit, T.C. Scaffold-Free Delivery of Organoid Units Forms Tissue-Engineered Intestine. *Journal of the American College of Surgeons* 2018, *227*, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2018.08.522.
34. Watson, C.L.; Mahe, M.M.; Munera, J.; Howell, J.C.; Sundaram, N.; Poling, H.M.; Schweitzer, J. I.; Vallance, J.E.; Mayhew, C.N.; Sun, Y.; Grabowski, G.; Finkbeiner, S.R.; Spence, J.R.; Shroyer, N.F.; Wells, J.M.; Helmrath, M.A. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* 2014, *20*, 1310-1314, doi:10.1038/nm.3737.
35. Spence, J.R.; Mayhew, C.N.; Rankin, S.A.; Kuhar, M.F.; Vallance, J.E.; Tolle, K.; Hoskins, E.E.; Kalinichenko, V.V.; Wells, S.I.; Zorn, A.M.; Shroyer, N.F.; Wells, J.M. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011, *470*, 105-109, doi:10.1038/nature09691.
36. Tucker, B.A.; Solivan-Timpe, F.; Roos, B.R.; Anfinson, K.R.; Robin, A.L.; Wiley, L.A.; Mullins, R. F.; Fingert, J.H. Duplication of TBK1 Stimulates Autophagy in iPSC-derived Retinal Cells from a Patient with Normal Tension Glaucoma. *J Stem Cell Res Ther* 2014, *3*, 161, doi:10.4172/2157-7633.1000161.
37. Shimizu, T.; Mae, S.I.; Araoka, T.; Okita, K.; Hotta, A.; Yamagata, K.; Osafune, K. A novel ADPKD model using kidney organoids derived from disease-specific human iPSCs. *Biochemical and biophysical research communications* 2020, *529*, 1186-1194, doi:10.1016/j.bbrc.2020.06.141.
38. Shiihara, M.; Ishikawa, T.; Saiki, Y.; Omori, Y.; Hirose, K.; Fukushige, S.; Ikari, N.; Higuchi, R.; Yamamoto, M.; Morikawa, T.; Nakagawa, K.; Hayashi, H.; Mizuma, M.; Ohtsuka, H.; Motoi, F.; Unno, M.; Okamura, Y.; Kinoshita, K.; Furukawa, T. Development of a system combining comprehensive genotyping and organoid cultures for identifying and testing genotype-oriented personalized medicine for pancreaticobiliary cancers. *Eur J Cancer* 2021, *148*, 239-250, doi:10.1016/j.ejca.2021.01.047.
39. Yoshii, Y.; Waki, A.; Yoshida, K.; Kakezuka, A.; Kobayashi, M.; Namiki, H.; Kuroda, Y.; Kiyono, Y.; Yoshii, H.; Furukawa, T.; Asai, T.; Okazawa, H.; Gelovani, J.G.; Fujibayashi, Y. The use of na

- noimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation. *Biomaterials* 2011, *32*, 6052-6058, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.076.
40. Yamazaki, H.; Gotou, S.; Ito, K.; Kohashi, S.; Goto, Y.; Yoshiura, Y.; Sakai, Y.; Yabu, H.; Shimomura, M.; Nakazawa, K. Micropatterned culture of HepG2 spheroids using microwell chip with honeycomb-patterned polymer film. *J Biosci Bioeng* 2014, *118*, 455-460, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.03.006.
  41. Hurrell, T.; Ellero, A.A.; Masso, Z.F.; Cromarty, A.D. Characterization and reproducibility of HepG2 hanging drop spheroids toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro* 2018, *50*, 86-94, doi:10.1016/j.tiv.2018.02.013.
  42. Snyman, C.; Elliott, E. An optimized protocol for handling and processing fragile acini cultured with the hanging drop technique. *Anal Biochem* 2011, *419*, 348-350, doi:10.1016/j.ab.2011.08.024.
  43. Sun, B.; Zhao, Y.; Wu, W.; Zhao, Q.; Li, G. A superhydrophobic chip integrated with an array of medium reservoirs for long-term hanging drop spheroid culture. *Acta Biomater* 2021, doi:10.1016/j.actbio.2021.08.006.
  44. Souza, G.R.; Molina, J.R.; Raphael, R.M.; Ozawa, M.G.; Stark, D.J.; Levin, C.S.; Bronk, L.F.; Ananta, J.S.; Mandelin, J.; Georgescu, M.M.; Bankson, J.A.; Gelovani, J.G.; Killian, T.C.; Arap, W.; Pasqualini, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 2010, *5*, 291-296, doi:10.1038/nnano.2010.23.
  45. Yabe, S.G.; Fukuda, S.; Nishida, J.; Takeda, F.; Nashiro, K.; Okochi, H. Induction of functional islet-like cells from human iPS cells by suspension culture. *Regen Ther* 2019, *10*, 69-76, doi:10.1016/j.reth.2018.11.003.
  46. Qian, X.; Nguyen, H.N.; Song, M.M.; Hadiono, C.; Ogden, S.C.; Hammack, C.; Yao, B.; Hamersky, G.R.; Jacob, F.; Zhong, C.; Yoon, K.J.; Jeang, W.; Lin, L.; Li, Y.; Thakor, J.; Berg, D.A.; Zhang, C.; Kang, E.; Chickering, M.; Nauen, D.; Ho, C.Y.; Wen, Z.; Christian, K.M.; Shi, P.Y.; Maher, B.J.; Wu, H.; Jin, P.; Tang, H.; Song, H.; Ming, G.L. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 2016, *165*, 1238-1254, doi:10.1016/j.cell.2016.04.032.
  47. Hsiao, A.Y.; Torisawa, Y.S.; Tung, Y.C.; Sud, S.; Taichman, R.S.; Pienta, K.J.; Takayama, S. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 2009, *30*, 3020-3027, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.047.
  48. Sebastian, A.; Buckle, A.M.; Markx, G.H. Tissue engineering with electric fields: immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnol Bioeng* 2007, *98*, 694-700, doi:10.1002/bit.21416.
  49. Chen, K.; Wu, M.; Guo, F.; Li, P.; Chan, C.Y.; Mao, Z.; Li, S.; Ren, L.; Zhang, R.; Huang, T.J. Rap

- id formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab Chip* 2016, *16*, 2636-2643, doi:10.1039/c6lc00444j.
50. Aguilar, I.N.; Olivos, D.J., 3rd; Brinker, A.; Alvarez, M.B.; Smith, L.J.; Chu, T.G.; Kacena, M.A.; Wagner, D.R. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation. *Bioprinting* 2019, *15*, doi:10.1016/j.bprint.2019.e00050.
  51. Daly, A.C.; Kelly, D.J. Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers. *Biomaterials* 2019, *197*, 194-206, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.12.028.
  52. Awaja, F.; Gilbert, M.; Kelly, G.; Fox, B.; Pigram, P.J. Adhesion of polymers. *Progress in Polymer Science* 2009, *34*, 948-968, doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.007.
  53. Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svoricik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011, *29*, 739-767, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
  54. Roina, Y.; Auber, F.; Hocquet, D.; Herlem, G. ePTFE functionalization for medical applications. *Materials Today Chemistry* 2021, *20*, doi:10.1016/j.mtchem.2020.100412.
  55. Wang, H.; Kwok, D.T.; Wang, W.; Wu, Z.; Tong, L.; Zhang, Y.; Chu, P.K. Osteoblast behavior on polytetrafluoroethylene modified by long pulse, high frequency oxygen plasma immersion ion implantation. *Biomaterials* 2010, *31*, 413-419, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.066.
  56. Cui, X.; Hartanto, Y.; Zhang, H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 2017, *14*, doi:10.1098/rsif.2016.0877.
  57. Nakayama, T.; Otsuka, S.; Kobayashi, T.; Okajima, H.; Matsumoto, K.; Hagiya, Y.; Inoue, K.; Shuin, T.; Nakajima, M.; Tanaka, T.; Ogura, S.I. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Sci Rep* 2016, *6*, 36478, doi:10.1038/srep36478.
  58. Fukuda, J.; Khademhosseini, A.; Yeo, Y.; Yang, X.; Yeh, J.; Eng, G.; Blumling, J.; Wang, C.F.; Kohane, D.S.; Langer, R. Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. *Biomaterials* 2006, *27*, 5259-5267, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.044.
  59. Kim, S.J.; Park, J.; Byun, H.; Park, Y.W.; Major, L.G.; Lee, D.Y.; Choi, Y.S.; Shin, H. Hydrogels with an embossed surface: An all-in-one platform for mass production and culture of human adipose-derived stem cell spheroids. *Biomaterials* 2019, *188*, 198-212, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.10.025.
  60. Takeoka, Y.; Yurube, T.; Morimoto, K.; Kunii, S.; Kanda, Y.; Tsujimoto, R.; Kawakami, Y.; Fukase, N.; Takemori, T.; Omae, K.; Kakiuchi, Y.; Miyazaki, S.; Kakutani, K.; Takada, T.; Nishida, K.; Fukushima, M.; Kuroda, R. Reduced nucleotomy-induced intervertebral disc disruption through

- gh spontaneous spheroid formation by the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCol). *Biomaterials* 2020, *235*, 119781, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119781.
61. Marrazzo, P.; Pizzuti, V.; Zia, S.; Sargenti, A.; Gazzola, D.; Roda, B.; Bonsi, L.; Alviano, F. Microfluidic Tools for Enhanced Characterization of Therapeutic Stem Cells and Prediction of Their Potential Antimicrobial Secretome. *Antibiotics (Basel)* 2021, *10*, doi:10.3390/antibiotics10070750.
  62. Sasaki, K.; Inoue, M.; Machida, M.; Kawasaki, T.; Tsuruta, S.; Uchida, H.; Sakamoto, S.; Kasahara, M.; Umezawa, A.; Akutsu, H. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as a Model of Intestinal Xenobiotic Metabolism. *StemJournal* 2021, *3*, 1-10, doi:10.3233/stj-200001.
  63. Tsuruta, S.; Uchida, H.; Akutsu, H. Intestinal Organoids Generated from Human Pluripotent Stem Cells. *JMA J* 2020, *3*, 9-19, doi:10.31662/jmaj.2019-0027.
  64. Inoue, M.; Tanaka, Y.; Matsushita, S.; Shimozaki, Y.; Ayame, H.; Akutsu, H. Xenogeneic-Free Human Intestinal Organoids for Assessing Intestinal Nutrient Absorption. *Nutrients* 2022, *14*, doi:10.3390/nu14030438.
  65. Uchida, H.; Machida, M.; Miura, T.; Kawasaki, T.; Okazaki, T.; Sasaki, K.; Sakamoto, S.; Ohuchi, N.; Kasahara, M.; Umezawa, A.; Akutsu, H. A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight* 2017, *2*, e86492, doi:10.1172/jci.insight.86492.
  66. Hsiao, A.Y.; Tung, Y.C.; Qu, X.; Patel, L.R.; Pienta, K.J.; Takayama, S. 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol Bioeng* 2012, *109*, 1293-1304, doi:10.1002/bit.24399.
  67. Aijian, A.P.; Garrell, R.L. Digital microfluidics for automated hanging drop cell spheroid culture. *J Lab Autom* 2015, *20*, 283-295, doi:10.1177/2211068214562002.
  68. Miwa, T.; Idiris, A.; Kumagai, H. A novel cardiac differentiation method of a large number and uniformly-sized spheroids using microfabricated culture vessels. *Regen Ther* 2020, *15*, 18-26, doi:10.1016/j.reth.2020.04.008.
  69. Borys, B.S.; Le, A.; Roberts, E.L.; Dang, T.; Rohani, L.; Hsu, C.Y.; Wyma, A.A.; Rancourt, D.E.; Gates, I.D.; Kallos, M.S. Using computational fluid dynamics (CFD) modeling to understand murine embryonic stem cell aggregate size and pluripotency distributions in stirred suspension bioreactors. *J Biotechnol* 2019, *304*, 16-27, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.08.002.
  70. Martin, Y.; Vermette, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 2005, *26*, 7481-7503, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.057.
  71. Zhu, W.; Ma, X.; Gou, M.; Mei, D.; Zhang, K.; Chen, S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2016, *40*, 103-112, doi:10.1016/j.copbio.2016.03.014.
  72. Heid, S.; Boccaccini, A.R. Advancing bioinks for 3D bioprinting using reactive fillers: A review.

- Acta Biomater 2020, *113*, 1-22, doi:10.1016/j.actbio.2020.06.040.
73. Noor, N.; Shapira, A.; Edri, R.; Gal, I.; Wertheim, L.; Dvir, T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci* 2019, *6*, 1900344, doi:10.1002/advs.201900344.
  74. Zhu, W.; Holmes, B.; Glazer, R.I.; Zhang, L.G. 3D printed nanocomposite matrix for the study of breast cancer bone metastasis. *Nanomedicine* 2016, *12*, 69-79, doi:10.1016/j.nano.2015.09.010.
  75. Guillaume, O.; Kopinski-Grunwald, O.; Weisgrab, G.; Baumgartner, T.; Arslan, A.; Whitmore, K.; Van Vlierberghe, S.; Ovsianikov, A. Hybrid spheroid microscaffolds as modular tissue units to build macro-tissue assemblies for tissue engineering. *Acta Biomater* 2023, *165*, 72-85, doi:10.1016/j.actbio.2022.03.010.
  76. Tan, W.H.; Takeuchi, S. Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. *Advanced Materials* 2007, *19*, 2696-2701, doi:10.1002/adma.200700433.
  77. Aguilar, I.N.; Smith, L.J.; Olivos, D.J., 3rd; Chu, T.G.; Kacena, M.A.; Wagner, D.R. Scaffold-free Bioprinting of Mesenchymal Stem Cells with the Regenova Printer: Optimization of Printing Parameters. *Bioprinting* 2019, *15*, doi:10.1016/j.bprint.2019.e00048.
  78. Bégín-Drolet, A.; Dussault, M.-A.; Fernandez, S.A.; Larose-Dutil, J.; Leask, R.L.; Hoesli, C.A.; Ruel, J. Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications. *Additive Manufacturing* 2017, *15*, 29-39, doi:10.1016/j.addma.2017.03.006.
  79. 秋山義勝; 岡野光夫. 細胞シート工学を支える温度応答性細胞培養表面の設計と特性. 高分子論文集 2018, *75*, 174-186, doi:10.1295/koron.2017-0078.
  80. Tang, L.; Wang, L.; Yang, X.; Feng, Y.; Li, Y.; Feng, W. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications. *Progress in Materials Science* 2021, *115*, doi:10.1016/j.pmatsci.2020.100702.
  81. Takahashi, H.; Shimizu, T.; Nakayama, M.; Yamato, M.; Okano, T. The use of anisotropic cell sheets to control orientation during the self-organization of 3D muscle tissue. *Biomaterials* 2013, *34*, 7372-7380, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.033.
  82. Kim, S.J.; Byun, H.; Lee, S.; Kim, E.; Lee, G.M.; Huh, S.J.; Joo, J.; Shin, H. Spatially arranged encapsulation of stem cell spheroids within hydrogels for the regulation of spheroid fusion and cell migration. *Acta Biomater* 2022, *142*, 60-72, doi:10.1016/j.actbio.2022.01.047.
  83. Takeuchi, H.; Nakatsuji, N.; Suemori, H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep* 2014, *4*, 4488, doi:10.1038/srep04488.
  84. Masanobu Kusunoki; Yoshitaka Togo; Takuto Wada; Yoshiya Hashimoto; Yoshiya Hashimoto; Hiroaki Nishikawa; Hontsu, S. Nerve Cell Patterning Using Polytetrafluoroethylene and Poly-

- D-Lysine. *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems* 2009, *129*, 2014-2018, doi:10.1541/ieejieiss.129.2014.
85. KUSUNOKI MASANOBU; WADA TAKUTO; KANDA HIROTAKA; TOGO HIDETAKA; HAYAMI TAKASHI; HASHIMOTO YOSHIYA; NISHIKAWA HIROAKI; SHIGEKI, H. Micro-patterning technique for capillary blood vessels on Polytetrafluoroethylene substrate. *Mem Fac Biol Oriented Sci Technol Kinki Univ* 2010, *25*, 1-5.
  86. Liu, Y.; Munisso, M.C.; Mahara, A.; Kambe, Y.; Yamaoka, T. Anti-platelet adhesion and in situ capture of circulating endothelial progenitor cells on ePTFE surface modified with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) and hemocompatible peptide 1 (HCP-1). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020, *193*, 111113, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111113.
  87. Kondyurina, I.; Shardakov, I.; Nechitailo, G.; Terpugov, V.; Kondyurin, A. Cell growing on ion implanted polytetrafluoroethylene. *Applied Surface Science* 2014, *314*, 670-678, doi:10.1016/j.apusc.2014.07.057.
  88. Larsen, C.C.; Kligman, F.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R.E. The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function. *Biomaterials* 2006, *27*, 4846-4855, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.009.
  89. Hajian, H.; Wise, S.G.; Bax, D.V.; Kondyurin, A.; Waterhouse, A.; Dunn, L.L.; Kielty, C.M.; Yu, Y.; Weiss, A.S.; Bilek, M.M.; Bannon, P.G.; Ng, M.K. Immobilisation of a fibrillin-1 fragment enhances the biocompatibility of PTFE. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, *116*, 544-552, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.042.
  90. Crombez, M.; Chevallier, P.; Gaudreault, R.C.; Petitclerc, E.; Mantovani, D.; Laroche, G. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials* 2005, *26*, 7402-7409, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.051.
  91. Yasushi Tamada, Y.I. Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces. *Polymer* 1993, *34*, 2208-2212, doi:10.1016/0032-3861(93)90752-V.
  92. Gumpenberger, T.; Heitz, J.; Bäuerle, D.; Kahr, H.; Graz, I.; Romanin, C.; Svorcik, V.; Leisch, F. Adhesion and proliferation of human endothelial cells on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 2003, *24*, 5139-5144, doi:10.1016/s0142-9612(03)00460-5.
  93. Mikulikova, R.; Moritz, S.; Gumpenberger, T.; Olbrich, M.; Romanin, C.; Bacakova, L.; Svorcik, V.; Heitz, J. Cell microarrays on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 2005, *26*, 5572-5580, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.010.
  94. Svorčík, V. Cell proliferation on UV-excimer lamp modified and grafted polytetrafluoroethylene. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2004, *217*, 307-313, doi:10.1016/j.nimb.2003.09.036.
  95. Pérez-Calixto, M.; Diaz-Rodríguez, P.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Burillo, G. Amino-functionalized polymers by gamma radiation and their influence on macrophage polarization. *R*



- reactive and Functional Polymers 2020, *151*, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104568.
96. Rosado, D.; Meléndez-Ortiz, H.I.; Ortega, A.; Gallardo-Vega, C.; Burillo, G. Modification of poly (tetrafluoroethylene) with polyallylamine by gamma radiation. Radiation Physics and Chemistry 2020, *172*, doi:10.1016/j.radphyschem.2020.108766.
  97. Sommani, P.; Tsuji, H.; Kojima, H.; Sato, H.; Gotoh, Y.; Ishikawa, J.; Takaoka, G.H. Irradiation effect of carbon negative-ion implantation on polytetrafluoroethylene for controlling cell-adhesion property. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2010, *268*, 3231-3234, doi:10.1016/j.nimb.2010.05.096.
  98. Gao, A.; Hang, R.; Li, W.; Zhang, W.; Li, P.; Wang, G.; Bai, L.; Yu, X.F.; Wang, H.; Tong, L.; Chu, P.K. Linker-free covalent immobilization of heparin, SDF-1alpha, and CD47 on PTFE surface for antithrombogenicity, endothelialization and anti-inflammation. Biomaterials 2017, *140*, 201-211, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.06.023.
  99. Colwell, J.M.; Wentrup-Byrne, E.; Bell, J.M.; Wielunski, L.S. A study of the chemical and physical effects of ion implantation of micro-porous and nonporous PTFE. Surface and Coatings Technology 2003, *168*, 216-222, doi:10.1016/s0257-8972(03)00204-4.
  100. Song, H.; Yu, H.; Zhu, L.; Xue, L.; Wu, D.; Chen, H. Durable hydrophilic surface modification for PTFE hollow fiber membranes. Reactive and Functional Polymers 2017, *114*, 110-117, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.010.
  101. Cheng, B.; Ishihara, K. Formation of stable polydopamine layer on polytetrafluoroethylene substrate by hybrid process involved plasma treatment and spontaneous chemical reactions. Materials Today Communications 2020, *22*, doi:10.1016/j.mtcomm.2019.100774.
  102. Talon, I.; Schneider, A.; Ball, V.; Hemmerle, J. Functionalization of PTFE Materials Using a Combination of Polydopamine and Platelet-Rich Fibrin. J Surg Res 2020, *251*, 254-261, doi:10.1016/j.jss.2019.11.014.
  103. Ahad, I.U.; Butruk, B.; Ayele, M.; Budner, B.; Bartnik, A.; Fiedorowicz, H.; Ciach, T.; Brabazon, D. Extreme ultraviolet (EUV) surface modification of polytetrafluoroethylene (PTFE) for control of biocompatibility. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2015, *364*, 98-107, doi:10.1016/j.nimb.2015.08.093.
  104. Riveiro, A.; Abalde, T.; Pou, P.; Soto, R.; del Val, J.; Comesaña, R.; Badaoui, A.; Boutinguiza, M.; Pou, J. Influence of laser texturing on the wettability of PTFE. Applied Surface Science 2020, *515*, doi:10.1016/j.apsusc.2020.145984.
  105. Falah Toosi, S.; Moradi, S.; Kamal, S.; Hatzikiriakos, S.G. Superhydrophobic laser ablated PTFE substrates. Applied Surface Science 2015, *349*, 715-723, doi:10.1016/j.apsusc.2015.05.026.
  106. Jarvelainen, H.; Sainio, A.; Koulu, M.; Wight, T.N.; Penttinen, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. Pharmacol Rev 2009, *61*, 198-223, doi:10.1124/pr.109.

001289.

107. NAKAJIMA, A. Surface Wettability Control~ Superhydrophilicity, Superhydrophobicity and Dynamic Hydrophobicity~. *J. Vac. Soc. Jpn.* 2015, *58*.
108. Anada, T.; Fukuda, J.; Sai, Y.; Suzuki, O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* 2012, *33*, 8430-8441, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.040.
109. Yadhuraj, S.R.; Babu Gandla, S.; Omprakash, S.S.; Sudarshan, B.G.; Prasanna Kumar, S.C. Design and Development of Micro-channel using PDMS for Biomedical Applications. *Materials Today: Proceedings* 2018, *5*, 21392-21397, doi:10.1016/j.matpr.2018.06.545.
110. World Health Organization, WHO Technical Report Series 978: Annex 3 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2013. 2013.
111. Barbara B. Knowles; Aden, D.P. HUMAN HEPATOMA DERIVED CELL LINE, PROCESS FOR PREPARATION THEREOF, AND USES THEREFOR. Jul. 12, 1983 1983.
112. Skonieczna, M.; Adamiec-Organisciok, M.; Hudy, D.; Dziedzic, A.; Los, L.; Skladany, L.; Grgurevic, I.; Filipec-Kanizaj, T.; Jagodzinski, M.; Kukla, M.; Nackiewicz, J. Hepatocellular cancer cell lines, Hep-3B and Hep-G2 display the pleiotropic response to resveratrol and berberine. *Adv Med Sci* 2022, *67*, 379-385, doi:10.1016/j.advms.2022.09.003.
113. Raviadaran, R.; Ng, M.H.; Chandran, D.; Ooi, K.K.; Manickam, S. Stable W/O/W multiple nanoemulsion encapsulating natural tocotrienols and caffeic acid with cisplatin synergistically treated cancer cell lines (A549 and HEP G2) and reduced toxicity on normal cell line (HEK 293). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021, *121*, 111808, doi:10.1016/j.msec.2020.111808.
114. Prall, F.; Ostwald, C.; Linnebacher, M. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 2009, *40*, 1510-1512, doi:10.1016/j.humpath.2009.06.015.
115. H. D. Soule; J. Vazquez; A. Long; S. Albert; Brennan, M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973, *51*, 1409-1416, doi:10.1093/jnci/51.5.1409.
116. R.Kornblihtt, A.; Umezawa, K.; Vibe-Pedersen, K.; E.Baralle, F. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *The EMBO Journal* 1985, *4*, 1755-1759.
117. HOLMES, R. PREPARATION FROM HUMAN SERUM OF AN ALPHA-ONE PROTEIN WHICH INDUCES THE IMMEDIATE GROWTH OF UNADAPTED CELLS IN VITRO THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 1967 *32*, 297-308, doi:10.1083/jcb.32.2.297.
118. McKeown-Longo, P.J.; Panetti, T.S. Structure and Function of Vitronectin. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 1996, *8*, 327-340.
119. Nadzir, M.M.; Kino-oka, M.; Sugawara, K.; Taya, M. Effect of preservation conditions of collag

- en substrate on its fibril formation and rabbit chondrocyte morphology. *J Biosci Bioeng* 2012, *114*, 360-363, doi:10.1016/j.jbiosc.2012.04.013.
120. Liu, J.; Shi, L.; Deng, Y.; Zou, M.; Cai, B.; Song, Y.; Wang, Z.; Wang, L. Silk sericin-based materials for biomedical applications. *Biomaterials* 2022, *287*, 121638, doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121638.
  121. Sonnleitner, D.; Sommer, C.; Scheibel, T.; Lang, G. Approaches to inhibit biofilm formation applying natural and artificial silk-based materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021, *131*, 112458, doi:10.1016/j.msec.2021.112458.
  122. Wang, Y.; Wang, F.; Xu, S.; Wang, R.; Chen, W.; Hou, K.; Tian, C.; Wang, F.; Yu, L.; Lu, Z.; Zhao, P.; Xia, Q. Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application. *Acta Biomater* 2019, *86*, 148-157, doi:10.1016/j.actbio.2018.12.036.
  123. Hausmann, A.; Sancio, P.; Vasiljevic, T.; Weeks, M.; Schroën, K.; Gray, S.; Duke, M. Fouling of dairy components on hydrophobic polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for membrane distillation. *Journal of Membrane Science* 2013, *442*, 149-159, doi:10.1016/j.memsci.2013.03.057.
  124. Makohliso, S.A.; Giovangrandi, L.; Leonard, D.; Mathieu, H.J.; Ilegems, M.; Aebischer, P. Application of Teflon-AF® thin films for bio-patterning of neural cell adhesion. *Biosensors & Bioelectronics* 1998, *13*, 1227-1235.
  125. Niewiarowski, P.H.; Lopez, S.; Ge, L.; Hagan, E.; Dhinojwala, A. Sticky gecko feet: the role of temperature and humidity. *PLoS One* 2008, *3*, e2192, doi:10.1371/journal.pone.0002192.
  126. Kitamura, A.; Kobayashi, T.; Meguro, T.; Suzuki, A.; Terai, T. Control of cell behavior on PTFE surface using ion beam irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2009, *267*, 1638-1641, doi:10.1016/j.nimb.2009.01.123.
  127. 赤羽紀武; 山本敬雄; 久, 氏.; 梅沢和正; 三浦金次; 養田俊之; 桜井健司. E-PTFE 人工血管の末梢側吻合部狭窄の発生機序とその予防について. *人工臓器* 1985, *14*, 967-970, doi:doi.org/10.11392/jsao1972.14.967.
  128. 三重正和; 小島英理. バイオ関連分野での基礎－細胞数測定法. *Electrochemistry* 2008, *76*, 924-927.
  129. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013, *48*, 452-458, doi:10.1038/bmt.2012.244.
  130. 東木達彦; 大西康伸. 半導体リソグラフィ技術の動向と東芝の取り組み. *東芝レビュー* 2012, *67*, 2-6.
  131. Haq, M.R.; Schiff, H. Vertical sidewalls in thick epoxy resists – a challenge for laser-based direct write lithography. *Micro and Nano Engineering* 2023, *19*, doi:10.1016/j.mne.2023.100210.

132. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, *131*, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
133. Bonne, D.; Heuséle, C.; Simon, C.; Pantaloni, D. 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 1985, *260*, 2819-2825, doi:10.1016/s0021-9258(18)89437-6.
134. Hitoshi Niwa; Austin G. Smith; Miyazaki, J.-i. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* 2000, *24*, 372-376., doi:10.1038/74199.
135. Lin, B.; Coleman, J.H.; Peterson, J.N.; Zunitch, M.J.; Jang, W.; Herrick, D.B.; Schwob, J.E. Injury Induces Endogenous Reprogramming and Dedifferentiation of Neuronal Progenitors to Multipotency. *Cell Stem Cell* 2017, *21*, 761-774 e765, doi:10.1016/j.stem.2017.09.008.
136. Wang, Y.; He, L.; Du, Y.; Zhu, P.; Huang, G.; Luo, J.; Yan, X.; Ye, B.; Li, C.; Xia, P.; Zhang, G.; Tian, Y.; Chen, R.; Fan, Z. The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell* 2015, *16*, 413-425, doi:10.1016/j.stem.2015.03.003.
137. J.K. HENDERSON; J.S. DRAPER; H.S. BAILLIE; S. FISHEL; J.A. THOMSON; H. MOORE; AND REWS, P.W. Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens. *Stem Cells* 2002, *20*, 329-337, doi:10.1634/stemcells.20-4-329.
138. Jonathan S. Draper; Christine Pigott; Thomson, J.A.; Andrews, P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* 2002, *200*, 249-258.
139. Andrews, P.W.; Fenderson, B.; Hakomori, S. Human embryonal carcinoma cells and their differentiation in culture. *Int J Androl* 1987, *10*, 95-104, doi:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00170.x.
140. Mizrak, S.C.; Chikhovskaya, J.V.; Sadri-Ardekani, H.; van Daalen, S.; Korver, C.M.; Hovingh, S. E.; Roepers-Gajadien, H.L.; Raya, A.; Fluiter, K.; de Reijke, T.M.; de la Rosette, J.J.; Knegt, A. C.; Belmonte, J.C.; van der Veen, F.; de Rooij, D.G.; Repping, S.; van Pelt, A.M. Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod* 2010, *25*, 158-167, doi:10.1093/humrep/dep354.

## 研究業績

### 学会発表

1. 2007年3月27-30日  
ハイドロキシアパタイトとジメチルポリシロキサンを用いた選択的細胞培養足場の作製  
第54回応用物理学関連連合講演会  
楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 川畑君代<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST
  
2. 2007年9月21-22日  
ハイドロキシアパタイトを用いた神経細胞のパターニング技術の検討  
生体医工学シンポジウム 2007  
東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST
  
3. 2007年9月21-22日  
細胞の三次元的成長を目的としたハイドロキシアパタイトマイクロウエルの作製  
生体医工学シンポジウム 2007  
和田拓士<sup>1,3</sup>, 東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST
  
4. 2007年11月18日  
ハイドロキシアパタイトを用いた神経細胞回路形成技術の検討  
平成19年度電気関係学会関西支部連合大会  
東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST

5. 2007年11月18日  
人工歯根表面の細胞挙動シミュレーションを目的としたフォトリソグラフィーによる  
アパタイトマイクロウェルの作製  
平成19年度電気関係学会関西支部連合大会  
和田拓士<sup>1,3</sup>, 東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST
  
6. 2007年11月26—27日  
アパタイトチューブおよびアパタイトシースステントの開発  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2007  
本津茂樹<sup>1,3,4</sup>, 浅野弘樹<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST
  
7. 2007年11月26—27日  
GBR 応用のための生体内吸収性アパタイト薄膜/高分子シートの作製とその生体親和  
性評価  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2007  
浅野弘樹<sup>1,3</sup>, 東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 橋本典也<sup>2,4</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 JST-CREST、4 わかやま産業振興財  
団
  
8. 2007年12月17日  
生体内吸収性アパタイト/有機複合ソフトマテリアルの作製とその生体親和性の評価  
第20回日本アパタイト研究会  
東郷秀孝<sup>1</sup>, 浅野弘樹<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>, 西川博昭<sup>1</sup>, 本津茂樹<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2 大阪歯科大学
  
9. 2007年12月17日  
薄膜作製技術を用いた可撓性アパタイトシートの作製と細胞培養足場への応用  
第20回日本アパタイト研究会  
浅野弘樹<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2</sup>, 西川博昭<sup>1</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>, 本津茂樹<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2 大阪歯科大学

10. 2007年12月7日  
GBR用生体内吸収性アパタイト/有機複合シートの作製と評価  
第11回生体関連セラミックス討論会  
東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 浅野弘樹<sup>1,3</sup>, 橋本典也<sup>2,4</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3、JST-CREST、4 わかやま産業振興財団
  
11. 2008年11月8日  
PTFEを用いた細胞パターン作製技術の検討  
平成20年度電気関係学会関西支部連合大会  
東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 和田拓士<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3</sup>, 本津茂樹<sup>1,3</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団
  
12. 2008年11月8日  
人工歯根表面の細胞挙動シミュレーションを目的としたフォトリソグラフィーによるアパタイトマイクロウェルの作製  
平成20年度電気関係学会関西支部連合大会  
和田拓士<sup>1,3</sup>, 東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3,4</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,3,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団、4 JST-CREST
  
13. 2008年11月17-18日  
PTFE上への神経回路パターン作製技術の検討  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008  
東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 和田拓士<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3</sup>, 本津茂樹<sup>1,3</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団
  
14. 2008年11月17-18日  
PTFE基板上への血管内皮細胞の選択的吸着に関する検討  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008  
和田拓士<sup>1,3</sup>, 東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3</sup>, 橋本典也<sup>2,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3</sup>, 本津茂樹<sup>1,3</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団

15. 2008年11月17-18日  
アパタイトコーティング三次元培養足場の作製と評価  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008  
浅野弘樹<sup>1,4</sup>, 東郷秀孝<sup>1,4</sup>, 濱畑燈<sup>1,4</sup>, 吉野和卓<sup>3</sup>, 飴谷彰洋<sup>3</sup>, 久保気芳徳<sup>3</sup>, 橋本典也<sup>2,4</sup>, 西川博昭<sup>1,4</sup>, 楠正暢<sup>1,4</sup>, 本津茂樹<sup>1,4</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 ハイレックスコーポレーション、4 わかやま産業振興財団
16. 2008年11月17-18日  
生体アパタイトシートの作製とその生体親和性評価  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008  
谷中直樹<sup>1,3</sup>, 東郷秀孝<sup>1,3</sup>, 楠正暢<sup>1,3</sup>, 西川博昭<sup>1,3</sup>, 本津茂樹<sup>1,3</sup>  
1 近畿大学 生物理工学部、2 大阪歯科大学、3 わかやま産業振興財団
17. 2009年3月5-6日  
極薄アパタイトシートの軟組織再生足場としての応用  
第8回再生医療学会  
浅野弘樹<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>, 西川博昭<sup>1</sup>, 速水尚<sup>1</sup>, 本津茂樹<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2 大阪歯科大学
18. 2009年11月7日  
PTFEを用いた選択的細胞吸着パターン作製技術の検討  
平成21年電気関係学会関西支部連合大会  
虫邊慶悟<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 和田拓士<sup>1</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2</sup>, 西川博昭<sup>1</sup>, 本津茂樹<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2 大阪歯科大学
19. 2021年6月16日  
第60回日本生体医工学会  
表面性状制御による低刺激スフェロイド作製法  
東郷秀孝<sup>1</sup>, 廣瀬祐大<sup>1</sup>, 寺田堅斗<sup>2</sup>, 武内大輝<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2 三重大学大学院 医学系研究科  
p.92



20. 2021年6月16日  
第60回日本生体医工学会  
スフェロイド培養足場作製のためのマイクロスタンプ装置の開発  
廣瀬 祐大<sup>1)</sup>, 東郷 秀孝<sup>1)</sup>, 中西 龍馬<sup>1)</sup>, 武内 大輝<sup>2)</sup>, 中川 秀夫<sup>1)</sup>, 楠 正暢<sup>1)</sup>  
1)近畿大学大学院 生物理工学研究科, 2)三重大学大学院 医学系研究科  
p.92
21. 2021年11月29日  
The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials and the 8th Asian Biomaterials Congress (43JSB&8ABMC)  
Development of a Simple Spheroid Production Method with less Chemical and Physical Damage Using Fluoropolymers  
Hidetaka Togo<sup>1</sup>, Kento Terada<sup>2</sup>, Yudai Hirose<sup>1</sup>, Hideo Nakagawa<sup>1</sup>, Hiroki Takeuchi<sup>2</sup>, Masanobu Kusunoki<sup>1</sup>  
1 Graduate school of Biology-Oriented-Science and Technology, Kindai University  
2 Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medicine, Mie University  
p.15
22. 2022年3月18日  
第21回再生医療学会総会  
フッ素樹脂と細胞外マトリクスの組み合わせによる低刺激な新規スフェロイド作製法  
武内 大輝<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>2</sup>, 寺田堅斗<sup>1</sup>, 廣瀬祐大<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>2</sup>  
1 三重大学大学院 医学系研究科 産科婦人科学 2, 近畿大学大学院 生物理工学研究科  
p76
23. 2022年3月30日  
令和3年電気関係学会関西連合大会  
スフェロイド培養足場作製のための細胞外マトリクスドットスタンプ制御装置の開発  
廣瀬 祐大<sup>1)</sup>, 東郷 秀孝<sup>1)</sup>, 中川 秀夫<sup>1)</sup>, 阪口 凱斗<sup>3)</sup>, 奥野 雄大<sup>1)</sup>, 中西 龍馬<sup>1)</sup>, 武内 大輝<sup>2)</sup>, 楠 正暢<sup>1)</sup>  
1)近畿大学大学院 生物理工学研究科, 2)三重大学大学院 医学系研究科, 3)近畿大学 生物理工学部  
p25

24. 2022年6月30日  
第61回日本生体医工学会  
表面性情制御による低刺激プロセスを用いたiPSスフェロイドの作製  
東郷秀孝<sup>1</sup>, 廣瀬祐大<sup>1</sup>, 寺田堅斗<sup>2</sup>, 武内大輝<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科, 2 三重大学大学院 医学系研究科  
p.61
25. 2022年11月22日  
第44回日本バイオマテリアル学会  
フッ素樹脂を用いたスフェロイド作製手法における生存率の評価  
東郷秀孝<sup>1</sup>, 寺田堅斗<sup>3</sup>, 氏次朗<sup>2</sup>, 廣瀬祐大<sup>1</sup>, 武内大輝<sup>3</sup>, 楠正暢<sup>1</sup>  
1 近畿大学大学院 生物理工学研究科 2 近畿大学大学院 生物理工学部 3 三重大学大学院 医学系研究科  
p.386
26. 2023年3月24日  
第22回再生医療学会総会  
新規簡易スフェロイド作製法を使用した多能性幹細胞への影響  
武内大輝<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>2</sup>, 寺田堅斗<sup>1</sup>, 氏次朗<sup>3</sup>, 廣瀬祐大<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>2,3</sup>  
1 三重大学大学院 医学系研究科 産科婦人科学, 2 近畿大学大学院 生物理工学研究科,  
3 近畿大学 生物理工学部  
p.16
27. 2023年5月19日  
第62回日本生体医工学会  
フッ素樹脂を用いた表面性状制御スフェロイド培養足場の複数株iPS細胞への適用  
氏次朗<sup>3</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 寺田堅斗<sup>2</sup>, 廣瀬祐大<sup>1</sup>, 武内大輝<sup>2</sup>, 楠正暢<sup>1,3</sup>  
1) 近畿大学大学院 生物理工学部, 2) 三重大学大学院医学系研究科, 3) 近畿大学 生物理工学部  
p.56

28. 2023年5月19日

第62回日本生体医工学会

表面性状制御による高効率スフェロイド作製手法におけるiPSスフェロイド初期胚分化能の検討

東郷 秀孝<sup>1)</sup>、寺田 堅斗<sup>2)</sup>、氏次 朗<sup>3)</sup>、廣瀬 祐大<sup>1)</sup>、武内 大輝<sup>2)</sup>、楠 正暢<sup>1,3)</sup>

1) 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2) 三重大学大学院 医学系研究科、3) 近畿大学 生物理工学部

p.56

## 論文

### 1. 2009年11月

Polytetrafluoro-ethylene と poly-D-lysine を用いた神経細胞パターン作製法の検討  
電気学会論文誌 2009 ; 129 (11) : 2014–2018.

楠 正暢<sup>1</sup>, 東郷秀孝<sup>1</sup>, 和田拓士<sup>1</sup>, 橋本典也<sup>2</sup>, 西川博昭<sup>1</sup>, 本津茂樹<sup>1</sup>

1 近畿大学大学院 生物理工学研究科、2 大阪歯科大学

### 2. 2010年3月

Micro-patterning technique for capillary blood vessels on Polytetrafluoroethylene substrate

Mem Fac Biol Oriented Sci Technol Kinki Univ 25 25 1 - 5

KUSUNOKI MASANOBU<sup>1</sup>; WADA TAKUTO<sup>2</sup>; KANDA HIROTAKA<sup>2</sup>; TOGO HIDETAKA<sup>2</sup>; HAYAMI TAKASHI<sup>3</sup>; HASHIMOTO YOSHIYA<sup>4</sup>; NISHIKAWA HIROAKI<sup>1</sup>; HONTSU SHIGEKI<sup>1</sup>

1.Department of Electronic Systems and Information Engineering, Kinki University,

2.Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University ,

3.Department of Mechanical Engineering and Biomimetics, Kinki University,

4.OsakaDentalUniversity

### 3. 2019年8月

Applied Surface Science

Orientation control for a-axis or c-axis oriented crystal films of hydroxyapatite, and a possible growth mechanism derived from X-ray diffraction

Masanobu Kusunoki<sup>a</sup>, Yasuhiro Sakoishi<sup>a</sup>, Takayuki Makino<sup>a</sup>, Tomoya Tsunemine<sup>a</sup>,

Naoki Fujita<sup>a</sup>, Yuki Okada<sup>a</sup>, Daisuke Okai<sup>b</sup>, Hidetaka Togo<sup>a</sup>, Takashi Hayami<sup>a</sup>

a Faculty of Biology-Oriented-Science and Technology, Kindai University, Nishimitani 930, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

b Graduate School of Engineering, University of Hyogo, Himeji, Hyogo 671-2280, Japan

4. 2021 年 11 月 8 日  
Applied Sciences  
Development of a Simple Spheroid Production Method Using Fluoropolymers with Reduced Chemical and Physical Damage  
Hidetaka Togo<sup>1</sup>, Kento Yoshikawa-Terada<sup>2</sup>, Yudai Hirose<sup>1</sup>, Hideo Nakagawa<sup>1</sup>, Hiroki Takeuchi<sup>2,\*</sup> and Masanobu Kusunoki<sup>1</sup>  
1 Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa 649-6493, Wakayama, Japan; 2 Department of Obstetrics and Gynecology, Mie University Graduate School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu 514-8507, Mie, Japan;  
Appl. Sci. 2021, 11(21), 10495; <https://doi.org/10.3390/app112110495> - 08 Nov 2021  
Cited by 3 | Viewed by 1644
  
5. 2023 年 1 月 11 日  
Cells  
Fabrication Scaffold with High Dimensional Control for Spheroids with Undifferentiated iPS Cell Properties  
Hidetaka Togo<sup>1</sup>, Kento Terada<sup>2</sup>, Akira Ujitsugu<sup>3</sup>, Yudai Hirose<sup>1</sup>, Hiroki Takeuchi<sup>2</sup>, and Masanobu Kusunoki<sup>1,3</sup>  
1 Graduate School of Biology-Oriented-Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa 649-6493, Wakayama, Japan  
2 Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medicine, Mie University, 2-174 Edobashi, Tsu 514-8507, Mie, Japan  
3 Faculty of Biology-Oriented-Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa 649-6493, Wakayama, Japan  
Cells 2023, 12(2), 278; <https://doi.org/10.3390/cells12020278> - 11 Jan 2023 Viewed by 786

## 謝辞

本論文は、筆者が近畿大学大学院生物理工学研究科生体システム工学専攻デバイスプロセス研究室において行った研究成果をまとめたものである。

本研究室への参加のきっかけを与えていただき、また 5 年間にわたる研究室生活において豊富な経験に裏付けられた懇到なご指導を賜りました、近畿大学大学院生物理工学研究科教授 楠正暢先生に心から感謝いたします。

本論文及び本研究に対して貴重なご助言を賜った近畿大学大学院生物理工学研究科教授 古菌勉先生、近畿大学大学院生物理工学研究科教授 加藤暢宏先生に深く感謝の意を表します。

入学前より、様々な場面において豊富な知識による鋭い指摘、懇切な助言・ご指導を頂きました、三重大学医学部 助教 武内大輝さんには、公私共に様々なディスカッションを通し、多くの知見をいただきました。本研究アイデアの優位性について強く後押しして下さったことで、再びアカデミアの世界で研究を本格的に進めるきっかけを与えていただきました。研究においては iPS 細胞の培養手法のご指導および培養結果の解釈等ご協力を頂き、研究の進行に大いに貢献していただき感謝いたします。

本研究において培養における検証確認で、多大なるご協力をいただきました三重大学大学院 医学系研究科 寺田 堅斗氏、近畿大学生物理工学部生体システム工学科デバイスプロセス研究室 氏次朗氏に心から感謝いたします。

本研究は、ここで名前を挙げるができなかった多くの方々のご指導、ご協力のもとに完遂されたものであり、ここに謹んで感謝の意を表します。

最後に私をここまで育ててくださいました両親および私を支えてくださった妻と娘たちに心より感謝を致します。