

**2P-169 ヒト骨格筋筋芽細胞群における異種細胞間接触がサイトカイン生成能に与える影響**

○長森 英二, 岩田 利彦, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工・生命先端・生工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】重症心不全に対して、患者から単離した骨格筋筋芽細胞群を増殖・シート化して移植する手法が期待される。心機能改善の機序としてサイトカイン生成による血管新生促進効果が考えられ、我々はこれまでに、筋芽細胞群に混在する線維芽細胞の比率が単位細胞当たりのサイトカイン生成能に影響を与えることを明らかにしてきた。今回、この混在下におけるパラクリンおよび異種細胞間接触がサイトカイン生成能に与える影響について報告する。

【方法・結果】抗 CD56 抗体を使って分取した筋芽細胞比率が高い細胞群 (M)、線維芽細胞比率が高い細胞群 (F) を用意した。6 ウェル培養皿の内部に 2 つのテフロン製リングを隣接して配置し、上記異種細胞群が同じ培養容器内に 1:1 で存在するものの異種細胞間接触がない条件 (MF)、異種細胞間接触がある条件 (Mixed)、さらにコントロールとして各細胞群のみを播種した条件 (MM および FF) を作製した。培養 24 h でリングを除去し、培養 48 - 72 h の培地に含まれる VEGF および HGF 濃度を ELISA 法により測定し、1 細胞あたりのサイトカイン生成能 (pg/cell・day) を求めた。結果、MF における VEGF および HGF の生成能は、MM と FF における値の平均値よりも 1.20 倍および 1.09 倍であったのに対し、Mixed では 1.62 倍および 1.56 倍であった。混在下におけるサイトカイン生成能の向上には、パラクリン効果よりも、異種細胞間接触による効果が大きく寄与していることが示された。

**Effect of heterogeneous cell-cell contact on cytokine production in human skeletal muscle myoblast population**

○Eiji NAGAMORI, Toshihiko IWATA, Masahiro KINO-OKA  
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** human skeletal muscle myoblast, human skeletal muscle fibroblast, cytokine production

**2P-171 培養液を環流可能な毛細血管類似ネットワーク構造を有する 3 次元組織体の作製**

○境 慎司, 劉 楊, 田谷 正仁  
(阪大院・基礎工)  
sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

【目的】厚みのある組織を生体外で構築するためには、組織を構成する細胞に酸素や栄養分を供給するためのライフラインとなる生体の血管網に相当する構造を作製する必要がある。本研究では、ヒト肝ガン由来細胞の球状組織体とゲルファイバーの表面にそれぞれ血管内皮細胞層を付与した後、コラーゲンゲルに埋め込み、培養液を環流可能な毛細血管類似ネットワーク構造を含有する 3 次元組織体の作製を目指した。

【方法】既報の方法により、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 細胞から作製した直径約 300  $\mu\text{m}$  の球状組織体表面にヒト血管内皮細胞層を形成させた。また、既報の方法により細胞が接着できるように表面を修飾した直径約 300  $\mu\text{m}$  のアルギン酸誘導体ゲルファイバー上にヒト血管内皮細胞層を形成させた。これらをゲルファイバーを中心としてその表面近傍に球状組織体が配置されるようにコラーゲンゲル内に埋め込んだ。その後、アルギン酸リアーゼを用いてゲルファイバーを分解した。

【結果】HepG2 細胞球状組織体表面のヒト血管内皮細胞が周囲のコラーゲンゲル中に遊走し、直径 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  程度の管腔構造を自発的に形成した。この管腔構造はゲルファイバー上の血管内皮細胞層と融合した。培養液の流通の成否を確認するために、直径 3  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズを分散させた培養液をゲルファイバーの分解で生じた管腔に送液したところ、管腔構造の内部に培養液を流通させることができていることを確認した。

**Fabrication of 3D tissues containing perfusable blood capillary-like network**

○Shinji Sakai, Yang Liu, Masahito Taya  
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** tissue engineering, gelation, encapsulation, enzyme

**2P-170 TGF- $\beta$ 1 添加が積層筋芽細胞シート内での血管内皮細胞挙動に与える影響**

○村上 皓紀, 中村 匡, 長森 英二, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工・生命先端・生工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【緒言】組織工学において、成熟した血管を組織内に作製する技術が求められる。本研究室では積層ヒト骨格筋筋芽細胞 (HSMM) シート内におけるヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) の挙動解析を行ってきた。シート底部に配置された HUVEC は伸長してシート内部へ遊走、近傍の HUVEC 同士が接着し中層にネットワーク状の集塊を形成するが、遊走は停止せず、やがて脱接着した HUVEC がシート上部へ離脱、ネットワークは崩壊する。血管新生において HUVEC の遊走を抑制し血管の成熟に寄与することが知られる TGF- $\beta$ 1 を添加し、HUVEC の挙動に与える影響を評価した。

【方法】Cell Tracker Orange で染色した HSMM をシート状に培養、5 層に積層後、GFP 発現 HUVEC を播種した培養面上に配置し、共培養を開始した。HUVEC ネットワークが形成される培養 72 h で TGF- $\beta$ 1 (200 ng/ml) を添加し、HUVEC の挙動を共焦点レーザー顕微鏡にて、タイムラプス観察した。

【結果・考察】培養 72 - 96 h において、TGF- $\beta$ 1 未添加群では HUVEC ネットワークは伸長した形態を保ち、脱接着した HUVEC がシート上部に抜ける様子が観察された。TGF- $\beta$ 1 添加群では HUVEC ネットワークは伸長した網状の形態から細胞同士が密に集まった集塊に形態を変化させ、シート中層に留まった。これは TGF- $\beta$ 1 添加により HUVEC の遊走が抑制され、HUVEC が伸長した形態から、丸みを帯びた形態に変化するとともに周囲の HUVEC との接着様式を変えたものと考えられた。

**Effect of TGF- $\beta$ 1 addition on endothelial cell behavior in a multilayered skeletal muscle myoblast sheet**

○Koki MURAKAMI, Tadashi NAKAMURA, Eiji NAGAMORI,  
Masahiro KINO-OKA  
(Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** endothelial cell, skeletal muscle myoblast, TGF-beta

**2P-172 繊維状足場材料とハイドロゲルを利用する新規 3 次元細胞培養系の開発**

○堀 綾香, 平井 優, 矢嶋 祐也, 山田 真澄, 関 実  
(千葉大院・工)  
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

【緒言】生体外において 3 次元組織を構築するためには、コラーゲンやアルギン酸、アガロースなど、様々な種類のハイドロゲル材料が利用されている。しかし、通常の均一なハイドロゲル内部では、細胞が接着できる固体の足場が存在しないため、細胞の増殖や細胞同士の組織化を制御しづらいという問題がある。本研究では、細胞外基質 (ECM) 成分によって構成される繊維状の足場材料を細胞とともにハイドロゲルに包埋する、新規 3 次元培養系を提案し、細胞の増殖挙動を評価した。

【実験及び結果】マイクロ流体デバイスを用いたハイドロゲルファイバー作製法<sup>1)</sup>を応用し、ECM タンパク質を含むアルギン酸 Ca ハイドロゲルファイバーを作製した。得られたファイバーを 1 mm 程度の長さで切断し、ECM 成分を架橋した後、アルギン酸分解酵素を用いてアルギン酸を選択的に除去することにより、ECM によって構成された繊維状の足場材料を作製した。ECM タンパク質としてゼラチン、エラスチンを使用したところ、共に直径 10~20  $\mu\text{m}$  程度の繊維状足場材料の作製が可能であった。次に、作製した足場材料を高密度に含むアルギン酸ハイドロゲル内で NIH-3T3 細胞を培養したところ、細胞が足場材料に接着し効率的に増殖する様子が確認された。

1) M. Yamada, et al., *Soft Matter* 8 (11), 3122-3130 (2012).

**Development of 3D cell cultivation technique using fibrous ECM scaffolds and hydrogels**

○Ayaka Hori, Yu Hirai, Yuya Yajima, Masumi Yamada, Minoru Seki  
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

**Key words** extracellular matrix, scaffold, gelation, tissue engineering