(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6659059号
(P6659059)
(45)発行日　令和2年3月4日(2020.3.4)　(24)登録日　令和2年2月10日(2020.2.10)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 5/00 (2006.01)　C12N 5/00

請求項の数 8　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願2018-500018(P2018-500018)
(86)(22)出願日　平成29年1月31日(2017.1.31)
(86)国際出願番号　PCT/JP2017/003368
(87)国際公開番号　WO2017/141691
(87)国際公開日　平成29年8月24日(2017.8.24)
審査請求日　平成30年7月31日(2018.7.31)
(31)優先権主張番号　特願2016-27196(P2016-27196)
(32)優先日　平成28年2月16日(2016.2.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘１番１号
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾　憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(72)発明者　松▲崎▼　典弥
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内

審査官　千葉　直紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
脈管系構造を有する三次元組織の製造方法であって、
（ａ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｂ）鋳型の周辺に三次元組織を形成する工程；
（ｃ）カチオン性溶液を用いて鋳型を溶解させる工程；および
（ｄ）鋳型の溶解後の空隙に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程
を含む、方法。
【請求項２】
工程（ｂ）において、鋳型上に平滑筋細胞を播種する、または
工程（ｄ）において、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する前に、平滑筋細胞を播種する、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
脈管系構造を有する三次元組織の製造方法であって、
（ｉ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｉｉ）鋳型上に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程；
（ｉｉｉ）播種した細胞の周辺に三次元組織を形成する工程；および

（ｉｖ）カチオン性溶液を用いて鋳型を溶解させる工程
を含む、方法。
【請求項４】
工程（ｉｉ）において、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種した後に、平滑筋細胞をさらに播種する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
ゲルがジェランガム（ＧＧ）ゲル、アルギン酸ゲル、ポリアクリル酸ゲル、ポリグルタミン酸ゲル、およびポリアスパラギン酸ゲル、ならびにそれらの組み合わせから選択される、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
カチオン性溶液がトリス－塩酸緩衝液、トリス－マレイン酸緩衝液、ビス－トリス－緩衝液、またはエタノールアミンである、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
カチオン性溶液の濃度が１０～１００ｍＭである、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
段階（ｃ）または（ｉｖ）において、鋳型の溶解を３７℃で行う、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、脈管系構造を有する三次元組織の製造方法に関する。本発明はまた、脈管系構造のゲルを含む三次元組織およびその製造方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年、生体外で細胞の三次元組織を構築する様々な技術が開発されている。このような技術によって構築された三次元組織は、再生医療における移植片として利用されることが期待されている。また、医薬品開発において、薬剤応答評価等に用いることも期待されている。しかしながら、三次元組織内に血管網が存在しなければ、組織自体が生存できないという問題点がある。また、血管網を有さない、あるいは外部との接続がない血管網しか有さない三次元組織を用いて薬剤応答評価等を行った場合には、薬剤が血管網に入らない、あるいは三次元組織全体に単純拡散されてしまう。そのため、薬剤の影響を正確に観察することが困難である。
【０００３】
特許文献１には、細胞の表面全体が接着膜で被覆された被覆細胞を基材上で培養することによって細胞の三次元構造体を製造する方法が開示されている。また、特許文献１には、血管内皮細胞を用いることで、三次元構造体内に血管網を形成できることも開示されている。しかしながら、特許文献１における血管網の形成は、細胞の自己組織化が駆動力であるため、血管網の三次元形態を制御することはできない。
【０００４】
非特許文献１には、ガラス化糖で格子状のファイバーを作製し、その周辺に細胞を含んだコラーゲン等のゲルを作製し、ファイバーを溶解除去した後に、血管内皮細胞で空孔を被覆することにより、血管網を有する三次元組織を構築する方法が開示されている。しかしながら、この方法では、ファイバーの微細な（１００μｍ以下）口径制御が困難であるため、１００μｍ以下の小血管（細動脈－毛細血管－細静脈）は構築できない。
【０００５】
非特許文献２には、コラーゲンゲルの中にマイクロチャンネルを作製し、その上に毛細血管構造を有する細胞シートを培養することにより、血管網を有する三次元組織を構築する方法が開示されている。この方法では、血管内皮細胞が移動してマイクロチャンネルに接続するため、溶液の還流が可能となる。しかしながら、血管網構造の構築は細胞の自己

組織化によるため、三次元形態の制御ができない。
【０００６】
特許文献２には、細胞が細胞外マトリックスを介して三次元に配置された、表面に少なくとも１つの開口構造を有し、かつ、内部に前記開口構造と連通する分岐した管状構造を有する三次元組織体、ならびにその製造方法が開示されている。しかしながら、特許文献１同様、特許文献２における管状構造の形成も、細胞の自己組織化が駆動力であるため、血管網の三次元形態を制御することはできない。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００７】
【特許文献１】特開２０１２－１１５２５４号公報
【特許文献２】特開２０１５－１００３３４号公報
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｎａｔ　Ｍａｔｅｒ．　２０１２　Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ；１１（９）：７６８－７７４
【非特許文献２】ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ　ＲＥＰＯＲＴＳ；３：１３１６
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
本発明が解決しようとする課題は、所望の構造および太さを有する脈管系（血管網および／またはリンパ管網）を有する三次元組織、およびその製造方法を提供すること等である。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ねたところ、カチオン性溶液中でインキュベートすることによってジェランガム（ＧＧ）などのゲルを溶解できることを見出し、本発明を完成するに至った。かくして本発明は以下のものを提供する。
【００１１】
（１）脈管系構造を有する三次元組織の製造方法であって、
（ａ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｂ）鋳型の周辺に三次元組織を形成する工程；
（ｃ）カチオン性溶液を用いて鋳型を溶解させる工程；および
（ｄ）鋳型の溶解後の空隙に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程
を含む、方法。
（２）工程（ｂ）において、鋳型上に平滑筋細胞を播種する、または工程（ｄ）において、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する前に、平滑筋細胞を播種する、（１）に記載の方法。
（３）脈管系構造を有する三次元組織の製造方法であって、
（ｉ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｉｉ）鋳型上に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程；
（ｉｉｉ）播種した細胞の周辺に三次元組織を形成する工程；および
（ｉｖ）カチオン性溶液を用いて鋳型を溶解させる工程
を含む、方法。
（４）工程（ｉｉ）において、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種した後に、平滑筋細胞をさらに播種する、（３）に記載の方法。
（５）ゲルがジェランガム（ＧＧ）ゲル、アルギン酸ゲル、ポリアクリル酸ゲル、ポリグルタミン酸ゲル、およびポリアスパラギン酸ゲル、ならびにそれらの組み合わせから選択

される、（１）～（４）のいずれか一つに記載の方法。
（６）カチオン性溶液がトリス－塩酸緩衝液、トリス－マレイン酸緩衝液、ビス－トリス－緩衝液、またはエタノールアミンである、（１）～（５）のいずれか一つに記載の方法。
（７）カチオン性溶液の濃度が１０～１００ｍＭである、（１）～（６）のいずれか一つに記載の方法。
（８）段階（ｃ）または（ｉｖ）において、鋳型の溶解を３７℃で行う、（１）～（７）のいずれか一つに記載の方法。
（９）脈管系構造のゲルを含む、三次元組織。
（１０）ゲルがジェランガム（ＧＧ）ゲル、アルギン酸ゲル、ポリアクリル酸ゲル、ポリグルタミン酸ゲル、およびポリアスパラギン酸ゲル、ならびにそれらの組み合わせから選択される、（９）に記載の三次元組織。
【００１２】
本発明はまた、以下のものを提供する。
（１１）カチオン性溶液のｐＨが６．０～８．０である、（１）～（１０）のいずれか一つに記載の方法。
（１２）カチオン性溶液のｐＨが７．４である、（１１）に記載の方法。
（１３）工程（ｃ）または（ｉｖ）において、振盪させながら鋳型を溶解する、（１）～（１２）のいずれか一つに記載の方法。
（１４）工程（ｉ）の後に、（ｖ）足場タンパク質を鋳型にコートする工程を含む、（３）または（４）に記載の方法。
（１５）足場タンパク質が、コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチン、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項（１４）に記載の方法。
（１６）ゲルが細胞接着性ペプチドで修飾されている、（３）または（４）に記載の方法。
（１７）脈管系構造のゲルを含む三次元組織の製造方法であって、
（ａ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；および
（ｂ）鋳型の周辺に三次元組織を形成する工程；
を含む、方法。
（１８）脈管系構造のゲルを含む三次元組織の製造方法であって、
（ｉ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｉｉ）鋳型上に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程；および
（ｉｉｉ）播種した細胞の周辺に三次元組織を形成する工程
を含む、方法。
（１９）ゲルがジェランガム（ＧＧ）ゲルである、（１７）または（１８）に記載の方法。
【発明の効果】
【００１３】
本発明によれば、ゲルで形成した鋳型を用いることで、三次元組織体の内部に所望の口径、長さ、および分岐構造を有する血管網および／またはリンパ管網を構築することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】図１は５つの異なる溶液を用いたＧＧゲルの溶解の結果を示す。（ａ）丸：５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）、菱形：ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、四角：リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）。（ｂ）四角：５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）、三角：５０ｍＭ　エタノールアミン（ＭＥＡ）、丸：５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ＨＥＰＥＳ　Ｎａ）。ゲルを１８０分間インキュベートし、所定の時間ごとにゲルの残存重量を定量した。

【図２】図２はＧＧゲルの溶解と温度との関係を示す。５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）中にゲルを浸漬し、溶解に必要な時間を測定した。白丸：室温、黒丸：３７℃。
【図３】図３はゲルの除去による細胞のパターニングを示す。（ａ）はパターニングの手順の模式図を、（ｂ）は各手順の写真を示す。
【図４】図４は三次元組織体内部での空隙の作製を示す。（ａ）は空隙の作製手順の模式図を、（ｂ）はＨＥ染色の結果を示す。
【図５】図５はジェランガム（ＧＧ）ゲルを用いて作成した内腔への、血管内皮細胞の接着実験の結果を示す。
【図６】図６は部分的にＨＵＶＥＣでコートされたチューブを用いた、ヒト全血の還流実験の結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
本発明は、第１の態様において、脈管系構造を有する三次元組織の製造方法であって、
（ａ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｂ）鋳型の周辺に三次元組織を形成する工程；
（ｃ）カチオン性溶液を用いて鋳型を溶解させる工程；および
（ｄ）鋳型の溶解後の空隙に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程
を含む方法に関する。
【００１６】
一実施形態では、工程（ｂ）において、鋳型上に平滑筋細胞を播種する工程を含む。他の実施形態では、工程（ｄ）において、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する前に平滑筋細胞を播種する工程を含む。
【００１７】
本発明は、他の態様において、脈管系構造を有する三次元組織の製造方法であって、
（ｉ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；
（ｉｉ）鋳型上に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程；
（ｉｉｉ）播種した細胞の周辺に三次元組織を形成する工程；および
（ｉｖ）カチオン性溶液を用いて鋳型を溶解させる工程
を含む方法に関する。
【００１８】
一実施形態では、工程（ｉｉ）において、血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種した後に、平滑筋細胞をさらに播種する。
【００１９】
「脈管系」とは、血液やリンパ液を全身に循環させる器官の集まりを指す。本明細書において用いる場合、「脈管系」とは、具体的には血管系またはリンパ管系を指す。血管系には、心臓から送り出された血液を全身に運ぶ動脈、身体の末梢部分の組織・細胞に酸素および栄養分を与え、組織・細胞から二酸化炭素および老廃物を受け取る毛細血管、および毛細血管からの血液を心臓に送り返す静脈が含まれる。毛細血管の太さは約５～１０μｍである。リンパ管は組織中で盲管として始まる細い管であり、組織液を収容する。その始まりは毛細リンパ管と呼ばれる。毛細リンパ管は互いに吻合して次第に太くなり、最終的には静脈系に合流する。本明細書において用いる場合、「脈管系構造」とは、生体組織における血管網やリンパ管網のような、ネットワーク状の構造を指す。
【００２０】
本明細書において用いる場合、「三次元組織」とは、少なくとも一種類の細胞を含む立体的な集合体を意味する。このような三次元組織には、皮膚、毛髪、骨、軟骨、歯、角膜、血管、リンパ管、心臓、肝臓、膵臓、神経、食道などの生体組織、ならびに固形癌モデル（例えば、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌

、腎細胞癌、肝癌など）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２１】

本発明で用いられる「ゲル」としては、細胞の生育および三次元組織の形成に悪影響を及ぼさない限り、イオンの添加、温度変化等によってゲル化できる任意の物質をゲル化させて用いることができる。そのようなゲルとしては、ジェランガム（ＧＧ）ゲル、アルギン酸ゲル、ポリアクリル酸ゲル、ポリグルタミン酸ゲル、およびポリアスパラギン酸ゲルが挙げられるが、これらに限定されない。一種類のゲルを単独で用いてもよく、あるいは複数種類のゲルを組み合わせて用いてもよい。好ましい実施形態では、本発明で用いられるゲルは、ＧＧゲルである。

【００２２】

ジェランガム（ＧＧ）は、シュードモナス・エロディア（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｅｌｏｄｅａ）がブドウ糖などを炭素源として細胞外に産生する、直鎖状の天然高分子多糖類である。ＧＧは１価または２価の金属塩の存在下で、透明性、耐熱性、耐酸性のあるゲルを形成する。ＧＧには、高アシル基含有のＨＡジェランガムと、アシル基が除去されたＬＡジェランガムが存在するが、本発明の方法ではいずれを用いてもよい。あるいは、両方のＧＧを組み合わせて用いてもよい。ＧＧは、例えばＮａｎｏｇｅｌ（登録商標）－ＴＣ、Ｇｒｏｖｇｅｌ、ＡｐｐｌｉｅｄＧｅｌ、Ｐｈｙｔａｇｅｌ（商標）またはＧｅｌｒｉｔｅとして市販されている。本発明で用いられるジェランガムは、後述するカチオン性溶液で溶解されるものであれば、特に限定されない。

【００２３】

本発明に用いるゲルは、イオンの添加によってゲル化することができる物質に１価または２価のカチオンを添加し、ゲル化させることによって得てもよい。かかるカチオンとしては、ナトリウムイオン、カルシウムイオン、バリウムイオン、およびマグネシウムイオンが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、イオンの添加によってゲル化することができる物質の高濃度（２ｗｔ％以上）溶液を冷却し、ゲル化させることによって得てもよい。

【００２４】

本発明で用いられる「カチオン性溶液」としては、細胞の生育および三次元組織の形成に悪影響を及ぼさず、かつ鋳型を溶解する限り、任意の正電荷を有する溶液を用いることができる。カチオン性溶液としては、トリス－塩酸緩衝液、トリス－マレイン酸緩衝液、ビス－トリス－緩衝液、またはエタノールアミンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、本発明で用いられるカチオン性溶液は、トリス－塩酸緩衝液またはエタノールアミンである。

【００２５】

カチオン性溶液の濃度は、細胞の生育および三次元組織の形成に悪影響を及ぼさず、かつ鋳型を溶解する限り、特に限定されない。好ましい実施形態では、本発明で用いられるカチオン性溶液の濃度は約１～約１００ｍＭである。例えば、本発明で用いられるカチオン性溶液の濃度は、約１～約１００ｍＭ、約１０～約１００ｍＭ、約１０～約９０ｍＭ、約１０～約８０ｍＭ、約１０～約７０ｍＭ、約１０～約６０ｍＭ、約１０～約５０ｍＭ、約１０～約４０ｍＭ、約１０～約３０ｍＭ、または約１０～約２０ｍＭである。より好ましい実施形態では、本発明で用いられるカチオン性溶液の濃度は約１０～約５０ｍＭである。

【００２６】

カチオン性溶液のｐＨは、細胞の生育および三次元組織の形成に悪影響を及ぼさず、かつ鋳型を溶解する限り、特に限定されない。好ましい実施形態では、本発明で用いられるカチオン性溶液のｐＨは約６．０～約８．０である。例えば、本発明で用いられるカチオン性溶液のｐＨは、約７．０、約７．１、約７．２、約７．３、約７．４、約７．５、約７．６、約７．７、約７．８、約７．９、または約８．０である。より好ましい実施形態では、本発明で用いられるカチオン性緩衝液のｐＨは約７．２～約７．６である。さらに好ましい実施形態では、本発明で用いられるカチオン性緩衝液のｐＨは約７．４である。

【００２７】
工程（ａ）または（ｉ）では、鋳型の作製方法は特に限定されない。例えば、マイクロピペット、マイクロディスペンサー、シリンジ等を用いて、手動あるいは自動的に、所望の太さ、長さ、および分岐構造を有する鋳型を形成してもよい。また、インクジェットプリンターを用いてもよい。あるいは、所望の大きさおよび形状の型枠を作製し、その内部にゲルを流し入れて固めることによって、鋳型を形成してもよい。
【００２８】
工程（ｂ）または（ｉｉｉ）では、当業者に公知の方法を用いて三次元組織を形成することができる。例えば、特開２００７－２２８９２１、特開２０１２－１１５２５４、特開２０１４－０５７５２７、または特開２０１５－１００３３４に開示される三次元組織の製造方法に従って、三次元組織を形成することができる。あるいは、細胞外マトリックス（コラーゲンなど）等のゲルと細胞を混合し、得られた混合物を用いることで、三次元組織を形成してもよい。この場合、例えば、研究試薬用コラーゲン（例えば、株式会社ニッピ製）や、マトリゲル（登録商標）等を用いてもよい。
【００２９】
工程（ｂ）または（ｉｉｉ）において形成される三次元組織の形状は特に限定されず、線状、シート状、三次元細胞集合体など様々な形状であってよい。本明細書において、三次元細胞集合体は、複数の細胞層を含む細胞集合体、またはかかる細胞集合体の増殖物をいう。
【００３０】
鋳型および三次元組織は適切な基材上に形成される。基材としては、細胞の培養に用いるための培養容器等が挙げられる。培養容器は、細胞や微生物の培養に通常用いられている素材、形状のものであってよい。培養容器の素材としては、ガラス、ステンレス、プラスチックなどが挙げられるが、これらに限定されない。培養容器としては、ディッシュ、セルカルチャーインサート（例えば、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（登録商標）インサート、Ｎｅｔｗｅｌｌ（登録商標）インサート、Ｆａｌｃｏｎ（登録商標）セルカルチャーインサート、Ｍｉｌｌｉｃｅｌｌ（登録商標）セルカルチャーインサート等）、チューブ、フラスコ、ボトル、プレートなどが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、培養容器上に鋳型を作製し、その周辺に直接、三次元組織を形成する。他の実施形態では、適切な基材上で鋳型を作製し、作製した鋳型を培養容器に設置した後、その周辺に三次元組織を形成する。
【００３１】
一実施形態では、工程（ｃ）または（ｉｖ）において、形成した三次元組織ごとカチオン性溶液に浸漬することによって、鋳型を溶解させる。この場合、所定の時間ごとにカチオン性溶液を交換してもよい。他の実施形態では、形成した三次元組織にカチオン性溶液を注ぎかけることによって、鋳型を溶解させる。これにより、細胞にほとんどダメージを与えることなく鋳型を溶解させることができる。別の実施形態では、鋳型の溶解のために、三次元組織をカチオン性溶液中で数時間～数日間、インキュベートする。インキュベートの時間は、三次元組織および鋳型の大きさ等によって変化し得るが、例えば、約１～約４８時間、約１～約３６時間、約１～約２４時間、好ましくは、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、または約２０時間、インキュベートする。
【００３２】
一実施形態では、鋳型の溶解は約１０～約４０℃で行われる。例えば、鋳型の溶解は、約１０、約１５、約２０、約２５、約３０、約３１、約３２、約３３、約３４、約３５、約３６、約３７、約３８、約３９、または約４０℃で行われる。好ましい実施形態では、鋳型の溶解は約２５～約３７℃で行われる。より好ましい実施形態では、鋳型の溶解は約３７℃で行われる。他の実施形態では、振盪させながら鋳型を溶解する。
【００３３】
一実施形態では、工程（ｉ）の後に、（ｖ）足場タンパク質を鋳型にコートする工程を

含んでもよい。これにより、播種される細胞の鋳型への接着を改良することができる。足場タンパク質としては、コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチン、ならびにそれらの改変体、バリアント、およびフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一種類の足場タンパク質を単独で用いてもよく、あるいは複数種類の足場タンパク質を組み合わせて用いてもよい。

【００３４】

他の実施形態では、ゲルが細胞接着性ペプチドで修飾されている。これにより、播種される細胞の鋳型への接着を改良することができる。

【００３５】

本発明の方法において三次元組織の形成に用いられる細胞は特に限定されないが、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、マウス、ラット等の動物に由来する細胞である。細胞の由来部位も特に限定されず、骨、筋肉、内臓、神経、脳、骨、皮膚、血液などに由来する体細胞であってもよく、生殖細胞であってもよい。かかる細胞は、誘導多能性幹細胞細胞（ｉＰＳ細胞）、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）であってもよい。あるいは、初代培養細胞、継代培養細胞、および細胞株細胞などの培養細胞であってもよい。本発明の方法において三次元組織の形成に用いられる細胞には、例えば、線維芽細胞、肝がん細胞等のがん細胞、上皮細胞、神経細胞、樹状細胞、心筋細胞、肝細胞、膵島細胞、組織幹細胞、免疫細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、平滑筋細胞が挙げられるが、これらに限定されない。一種類の細胞を用いてもよいし、複数種類の細胞を用いてもよい。

【００３６】

細胞の播種は、細胞生物学の分野で行われている一般的な方法により行うことができる。例えば、工程（ｄ）では、空隙に適当な数の細胞を含む培地を注入することにより播種を行うことができる。例えば、工程（ｉｉ）では、鋳型上に適当な数の細胞を含む培地を添加することにより播種を行うことができる。

【００３７】

本発明の上記方法によれば、口径１００μｍ以下のゲルネットワークを構築することができ、口径１００μｍ以下の血管網および／またはリンパ管網を構築することができる。また、外部チューブに接続できる程度の太い中血管から、細動脈－毛細血管－細静脈－中血管へとネットワークを作製することができ、外部チューブを介して外部から三次元組織体への送液が可能となる。さらに、所望の口径・長さ・分岐構造を有する血管網および／またはリンパ管網を構築することができるため、生体外での大きなサイズ（１ｃｍ以上）の三次元組織の構築が可能となる。

【００３８】

別の態様において、本発明は、脈管系構造のゲルを含む三次元組織に関する。かかる三次元組織は、本発明の上記方法によって製造される脈管系構造を有する三次元組織の中間体である。一実施形態では、ゲルはジェランガム（ＧＧ）ゲル、アルギン酸ゲル、ポリアクリル酸ゲル、ポリグルタミン酸ゲル、およびポリアスパラギン酸ゲル、ならびにそれらの組み合わせから選択される。好ましい実施形態では、ゲルはＧＧゲルである。

【００３９】

別の態様において、本発明は、脈管系構造のゲルを含む三次元組織の製造方法であって、

（ａ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；および

（ｂ）鋳型の周辺に三次元組織を形成する工程；

を含む方法に関する。

【００４０】

別の態様において、本発明は、脈管系構造のゲルを含む三次元組織の製造方法であって、

（ｉ）ゲルを用いて脈管系構造の鋳型を作製する工程；

（ｉｉ）鋳型上に血管内皮細胞またはリンパ管内皮細胞の少なくとも一方を播種する工程；および

（ｉｉｉ）播種した細胞の周辺に三次元組織を形成する工程
を含む方法に関する。
【００４１】
一実施形態では、上述の脈管系構造のゲルを含む三次元組織の製造方法において、ゲルはジェランガム（ＧＧ）ゲル、アルギン酸ゲル、ポリアクリル酸ゲル、ポリグルタミン酸ゲル、およびポリアスパラギン酸ゲル、ならびにそれらの組み合わせから選択される。好ましい実施形態では、ゲルはＧＧゲルである。
【００４２】
別の態様において、本発明は、上述した細胞、ゲル（もしくはゲル化できる任意の物質）、またはカチオン性溶液から選択される少なくとも１つの試薬を含む、本発明の上記の方法を実施するためのキットを提供する。通常、これらの試薬は適切な容器に入れて提供される。かかるキットは、本発明の上記の方法の実施を簡便にするための適当な試薬、例えば希釈液、バッファー、および洗浄試薬などを含んでもよい。また、ディッシュ、セルカルチャーインサート、チューブ、フラスコ、ボトル、プレートなどの適当な培養容器、マイクロピペット、マイクロディスペンサー、シリンジ等を含んでもよい。さらに、本発明の方法の実施に必要な説明書などの資材を含んでもよい。
【００４３】
本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。用語「約」は、当業者により理解され、それが使用されている文脈に応じてある程度変化する。「約」は、典型的に、当該用語が付されている数値の±１０％、より典型的には±５％、より典型的には±４％、より典型的には±３％、より典型的には±２％、さらにより典型的には±１％の範囲の数値を意味する。
【００４４】
以下に実施例を示して本発明をより詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明の範囲を限定するものではない。
【実施例】
【００４５】
実施例１．ＧＧゲルの溶解
５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、５０ｍＭ　エタノールアミン（ＭＥＡ）、および５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ＨＥＰＥＳ　Ｎａ）を用いて、ＧＧゲルが溶解されるか否かを検証した。２５ｍＬの０．５　ｗ／ｔ％のＧＧ溶液（三晶株式会社、ＫＥＬＣＯＧＥＬ－ＡＦＴ）に１０μＬの５Ｍ　塩化カルシウム溶液を９０℃で添加し、次いで冷却した。得られたゲル１００ｍｇを、２０ｍＬの上記５つの溶液に３７℃でそれぞれ浸漬し、所定の時間ごとにゲルの残存重量を定量した。
【００４６】
結果を図１に示す。１８０分間観察したところ、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌおよびＭＥＡによってＧＧゲルが溶解された。
【００４７】
実施例２．ＧＧゲルの溶解と温度との関係
トリス－塩酸緩衝液を用いて、ＧＧゲルを溶解できるか否かを検証した。２５ｍＬの０．５　ｗ／ｔ％のＧＧ溶液に１０μＬの５Ｍ　塩化カルシウム溶液を９０℃で添加し、次いで冷却した。得られたゲルを室温または３７℃において、２０ｍＬの５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に浸漬し、溶解に必要な時間を測定した。用いたゲルの量は２００ｍｇ、４００ｍｇ、および６００ｍｇであった。
【００４８】
結果を図２に示す。温度の上昇に従い、溶解に必要な時間は減少した。

【００４９】
実施例３．ゲルの除去による細胞のパターニング
２５ｍＬの０．５　ｗ／ｔ％のＧＧ溶液に１０μＬの５Ｍ　塩化カルシウム溶液を９０℃で添加し、次いで４０℃まで冷却した。室温のディッシュもしくは氷冷したディッシュ上にこのＧＧ溶液を滴下することで、瞬時にゲルを形成した。ディッシュに1×10^{6}個の正常ヒト皮膚線維芽細胞（ＮＨＤＦ）を播種し、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）含有ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）を添加した。CO_2インキュベーター（３７℃、５％CO_2）にて２４時間、静置して、ゲルの周辺で細胞を培養した。培養後、ＤＭＥＭを２０ｍＬの５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に置換し、３時間静置した。
【００５０】
結果を図３に示す。（ａ）は本実施例の手順の模式図を、（ｂ）は各手順の写真を示す。トリス－塩酸緩衝液を添加することでＧＧゲルが溶解除去され、ゲルが存在した領域の周辺に細胞が接着し、パターンが形成された。
【００５１】
実施例４．三次元組織体内部での空隙の作製
２５ｍＬの０．５　ｗ／ｔ％のＧＧ溶液に１０μＬの５Ｍ　塩化カルシウム溶液を９０℃で添加し、次いで４０℃まで冷却した。このＧＧ溶液を５０℃で２４ｗｅｌｌセルカルチャーインサート内に滴下し、円柱状のゲルを作製した。特開２０１２－１１５２５４号公報に記載の方法を用いて、ゲルの周辺に1×10^{6}個のＮＨＤＦを用いて三次元組織を形成した。ＮＨＤＦの被覆にはフィブロネクチン（ＦＮ）およびゼラチン（Ｇ）を用いた。ＤＭＥＭを７０ｍＬの５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に置換し、２４時間静置した。これにより、ＧＧゲルを溶解除去した。得られた組織を採取し、パラフィン包埋切片を作製した。パラフィン包埋切片の作製は公知の方法に従った。作製した切片について、ヘマトキシリン・エオジン染色（ＨＥ染色）を行った。ＨＥ染色は公知の方法に従った。
【００５２】
結果を図４に示す。（ａ）は本実施例の手順の模式図を、（ｂ）はＨＥ染色の結果を示す。（ｂ）に示される通り、組織の中央付近に鋳型ゲルの除去で得られた空間が観察された。
【００５３】
実施例５．血管内皮細胞の内腔への接着実験
直径５００μｍ、長さ１ｃｍのジェランガム（ＧＧ）ゲルを、１ｃｍ×１．５ｃｍ×２ｍｍの１０　ｗｔ％ゼラチンゲル（トランスグルタミナーゼにより架橋）の上に設置した。その上にゼラチン溶液を添加し、同サイズのゲルをトランスグルタミナーゼ架橋（５時間、４℃でインキュベート）により作成した。全体を３５ｍＬの５０ｍＭ　トリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）に３７℃で１２時間浸漬することで、ＧＧゲルを溶解除去した。これにより、チューブ構造を有するゼラチンゲルを作成した。ＰＥＥＫ管（アズワン社製）を接続し、０．２ｍｇ／ｍＬのフィブロネクチン（ＦＮ）／Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ溶液を、形成されたチューブ内に約５０μＬインジェクトした。その後、インキュベーターで約２日間インキュベートした。セルトラッカーグリーン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で蛍光ラベル化した、約5×10^{6}個／ｍＬのヒト臍帯静脈血管内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を約５０μＬインジェクトした。その後、インキュベーターで約１日培養した。接着の様子をＯｌｙｍｐｕｓ　ＭＶＸ１０顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓｕ　ＤＰ８０カメラ接続）により観察した。インジェクション時の還流速度は３ｃｍ／秒（ヒト毛細血管の血流速度の約１００倍）、還流流速は０．３６ｍＬ／分であった。
【００５４】
結果を図５に示す。ＧＧゲルの溶解除去によって作成されたチューブ内腔に、ＦＮをコーティングすることができた。また、ＦＮでコーティングしたチューブ内腔に血管内皮細胞を接着させることができた。

【００５５】

実施例６．ヒト全血の還流実験

健全な２４歳ボランティアの全血をヘパリン入りスピッツを用いて約５ｍＬ採血した。実施例５に記載の方法により、部分的にＨＵＶＥＣでコートされたチューブ構造を有するゼラチンゲルを作成した。作成したチューブにＰＥＥＫ管（外径７００μｍ、アズワン社製）とシリコンチューブ（内径５００μｍ、アズワン社製）を接続し、ギアポンプ（イズマテック社製）により血液を還流させた。還流速度は３ｃｍ／秒、還流流速は０．３６ｍＬ／分であった。還流の様子をＯｌｙｍｐｕｓ　ＭＶＸ１０顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＤＰ８０カメラ接続）により観察した。

【００５６】

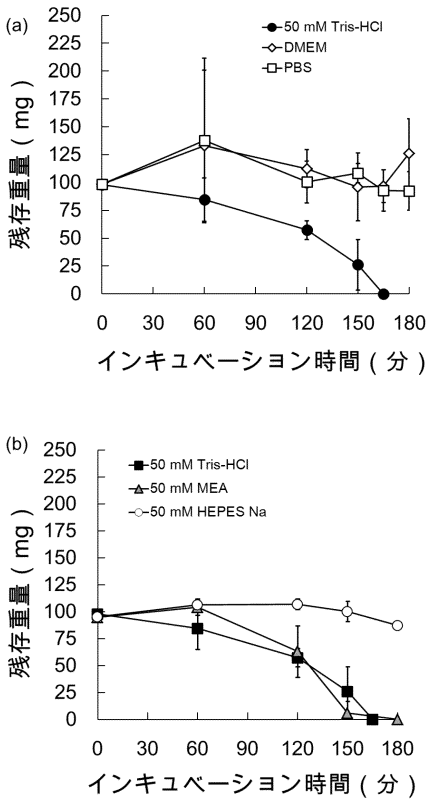
結果を図６に示す。ＧＧゲルの溶解除去によって作成されたチューブ内にヒト全血を還流させることができた。

【産業上の利用可能性】

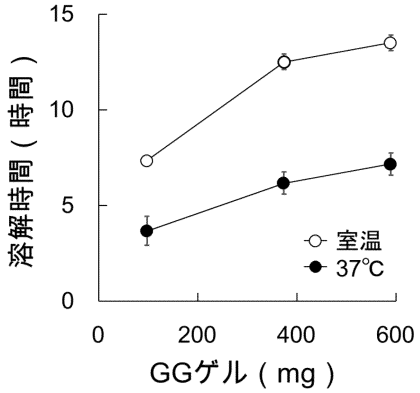
【００５７】

本発明は、再生医療分野において有用である。本発明はまた、医薬品開発においても有用である。

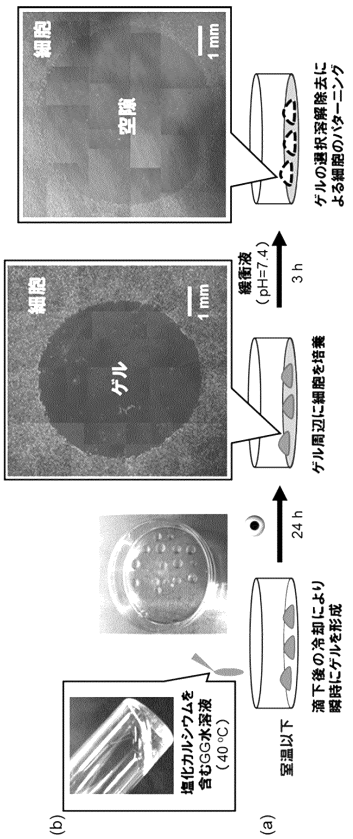
【図１】



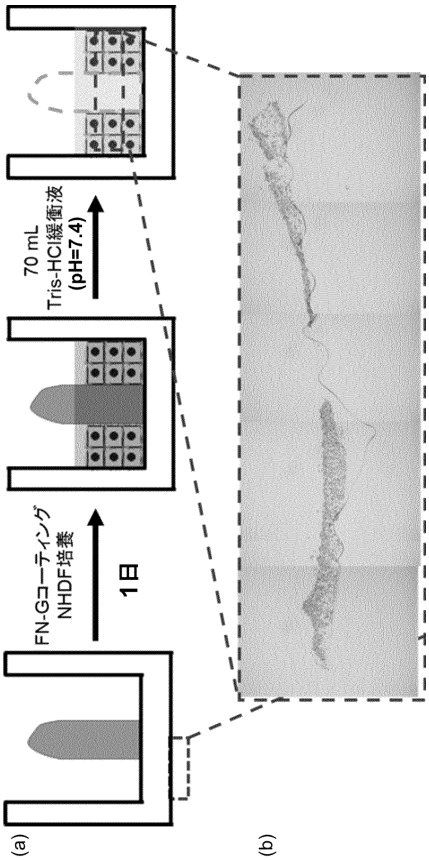
【図２】



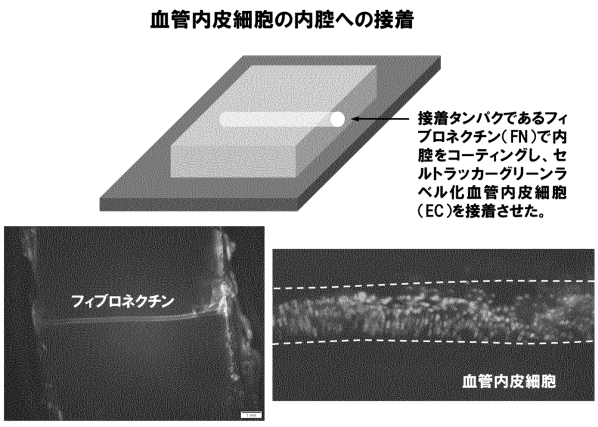
【図３】


細胞
1 mm
空隙
ゲルの選択溶解除去による細胞のパターニング
緩衝液
（pH=7.4）
3 h
細胞
1 mm
ゲル
ゲル周辺に細胞を培養
24 h
塩化カルシウムを含むGG水溶液
（40 ℃）
室温以下
滴下後の冷却により瞬時にゲルを形成
(b)
(a)

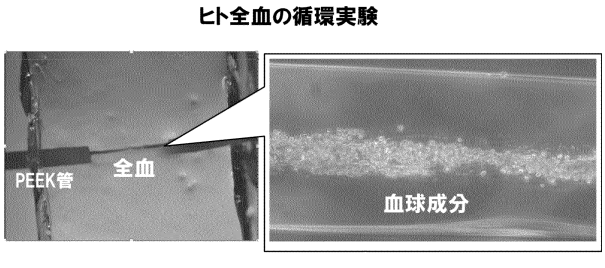
【図４】


70 mL
Tris-HCl緩衝液
(pH=7.4)
FN-Gコーティング
NHDF培養
1日
(a)
(b)

【図５】


血管内皮細胞の内腔への接着
接着タンパクであるフィブロネクチン（FN）で内腔をコーティングし、セルトラッカーグリーンラベル化血管内皮細胞（EC）を接着させた。
フィブロネクチン
血管内皮細胞
チューブ内腔に血管内皮細胞を接着させることが可能であった。

【図６】


ヒト全血の循環実験
PEEK管
全血
血球成分
チューブ内にヒト全血を環流させることができた。

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第２０１５／０６９６１９（WO，Ａ１）
Lab Chip, 2014, Vol. 14, pp. 2709-2716

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＷＰＩＤＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）