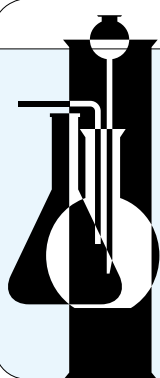


実験講座



体外組織構築のための三次元培養実験

萩原 将也

Key words : オルガノイド, 三次元培養, イメージング, 再現性

硬いプラスチックの上で培養する二次元培養では、細胞からのレスポンスも生体内とは大きく異なる。細胞間コミュニケーションが行われる因子の拡散についても、培地のみ環境と周囲を細胞外マトリックスに囲まれた環境とは全く違うことから、より生体環境に近い三次元における培養のほうが、細胞や組織本来の機能をより表現できることが期待されている¹⁾。特に、単一臓器の機能を三次元的に再構築するオルガノイド技術の目覚ましい発展から、創薬における薬物動態、薬効薬理、安全性試験などの新規化合物スクリーニングにおいても、これら技術の実用化が世界中で望まれている²⁾。一方、硬い平面の二次元培養とは異なり、柔らかいハイドロゲル内で三次元空間に配置される細胞の培養・解析の難易度は飛躍的に上がり、実験の再現性やイメージングを含む実験解析精度を大きく劣化させることから、有用な三次元培養実験系の確立が、オルガノイドを含む三次元培養系を実用レベルに引き上げるうえで急務である。

本稿では、三次元培養における実験難易度の要因を挙げると共に、筆者らが開発した三次元培養実験系を軸に、三次元におけるイメージング精度、実験再現性を向上させるための技術を紹介する。

I. 三次元培養における難しさ

ほとんどすべての臓器は、細胞と共に非細胞素

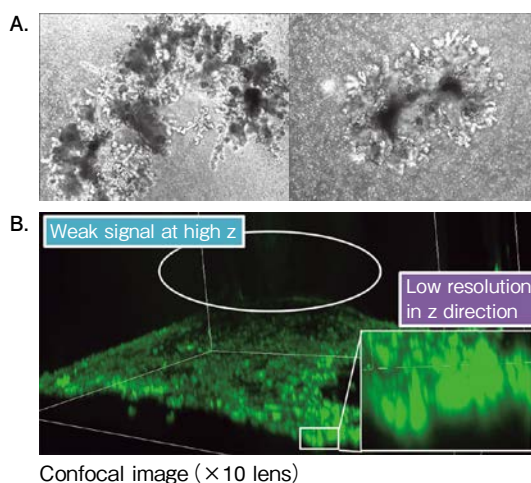


図 1 三次元培養実験における難しさ

A. 実験再現性が低い。B. 三次元イメージングが困難

材である細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) に囲まれ、細胞が三次元に存在できるよう足場として作用している。また、細胞とECMの間でも相互作用を行い、ECMは細胞に対して必要なシグナルを与え、逆に細胞はECMを再構築しつつ生体内で存在している。そこで目的の組織機能を得るためには、細胞に応じたECMを使う必要がある。例えば気管支上皮細胞の場合、マトリゲル下で特定の栄養因子を与えると、多数の三次元分岐形成を起こすものの、同条件においてもコラーゲン I のみの環境では分岐が

Three dimensional culture for organoid development

Hagiwara Masaya : 理化学研究所理研白眉研究チーム (〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1)

0370-9531/02/¥500/論文/JCOPY

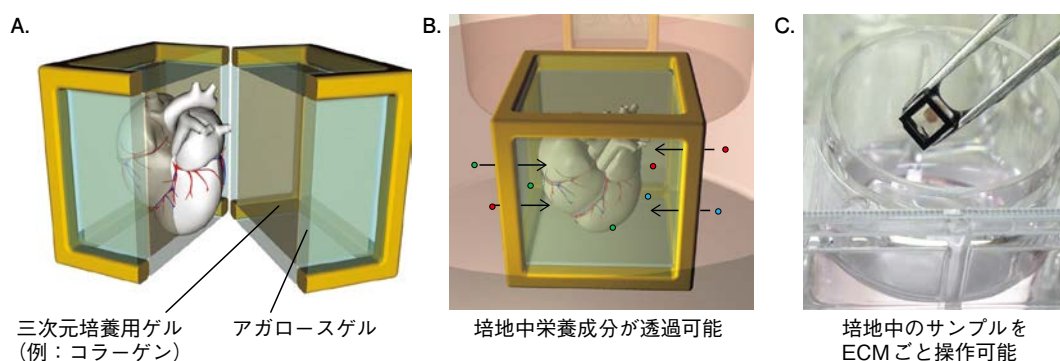


図 2 培養 Cube デバイスによる細胞組織の三次元培養

A. 培養 Cube デバイス構成。B. 外壁がアガロースのため、栄養成分が透過する。C. 培養中サンプルの操作が容易

発生しない。逆に、HUVEC をはじめとする内皮細胞をマトリゲル内に包埋してもほとんど移動・増殖しないが、コラーゲン中においては足を伸ばして集団形成することが確認できる。

細胞が三次元的に存在するための単なる足場としてなら、生体適合性があり、かつ多孔質材料であればよいので人工合成物を含めた ECM の選択肢も増えるのだが、実際には細胞が組織機能を持たせるために使える ECM は非常に限られている。しかも、多くの場合が柔らかいハイドロゲルであり、架橋までの間に時間による状態変化が大きい。そのような環境下でピペットを用いて細胞を三次元的に播種しなければいけない三次元培養は、実験の再現性がどうしても劣化してしまう。図 1A は、同じ作業者が同じタイミングでマトリゲル内においてヒト正常気管支上皮細胞を培養し、分岐形成を発生させた様子である。三次元培養により細胞は集団として中空の分岐構造を有しているものの、その分岐の太さ・長さ・方向および全体サイズといったパターンは非常にランダムであり、およそ発生した形態が似ているとは言い難い。このように、実験自体のバラツキの大きさは、三次元培養において大きなボトルネックである。

また、オルガノイドのようにサンプルサイズが mm 程度になると、全体をイメージングするためには低倍レンズを使う必要がある。しかし、高価なレーザー顕微鏡システムを用いても、低倍レンズでは厚み方向の解像度が大きく劣化してしまう問題がある。また、レーザー照射方向から離れ

ば離れるほどサンプルからのシグナルは弱くなり、厚みのあるサンプルにおいては裏側を適切に検出することは容易ではない(図 1B)。これらの問題を解決するため、ライトシート顕微鏡のようにレーザー照射方向と直交方向から検出する機構を有する顕微鏡システムや、透明化試薬のようにサンプル前処理により対応する方法がとられているが、非常に高価な顕微鏡システムを入れ替えるのはコスト面から大きな負担となり、透明化試薬はライブ観察ができないなどの制限もあり、オルガノイドのイメージングにおいてまだ課題は多い。

II. 培養 Cube デバイス

前述の三次元培養に関わる問題を解決するため、筆者らはこれまでに Cube 型の培養器を開発した³⁾。ポリカーボネート製の立方体フレームのまわりをアガロースゲルの壁で立方体に覆い、その中に培養に必要な ECM とサンプルを内包する構成を持つ。壁として用いているのは従来の培養器で使われるガラスやプラスチックと異なり、アガロースというソフトマテリアルであることから、サンプルを培養したいときは Cube ごと培地の中に浸すことで、栄養成分がアガロースの壁を透過してサンプルに到達することができる。一方、アガロース自体は十分な硬さを有しているため、培養中のサンプルを ECM ごと移動・回転させることを可能とし、サンプルの操作性を大幅に向上させることができる(図 2)。

本操作性を活かすことで、培養中のサンプルを Cube ごと回転させて、複数の面から観察するこ

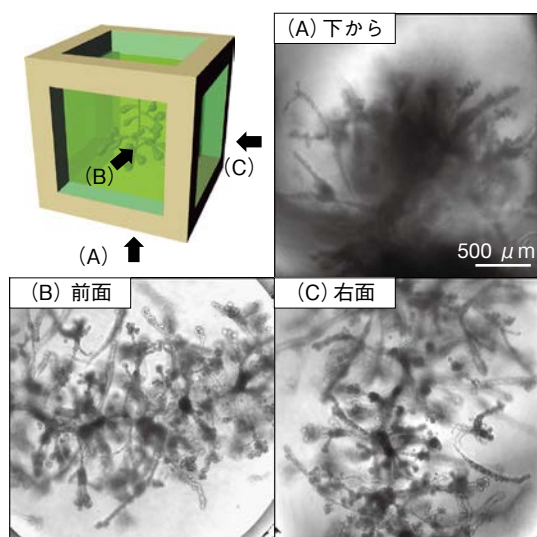


図 3 培養 Cube デバイスによるサンプルの多面観察
A. Cube 下からの観察画像。B. 前面からの観察画像。C. 右面からの観察画像

とが可能となる。図 3 に培養 Cube デバイス内にマトリゲルを内包して、気管支上皮細胞を培養した例を示す。ディッシュやウェルプレートにおける観察と同様に、サンプルを下から観察すると、サンプルが厚いために全体像がよくわからない状態である。しかし、サンプルを Cube ごと回転させて Cube 各面から観察を行うと、 z 方向に伸長した主軸のまわりに細い多くの分岐が発生していることが確認できた。Cube 内に ECM を隙間なく充填しているおかげで、Cube の回転によってサンプルの Cube 内相対位置がずれるようなことは発生しない。このように、サンプルを Cube ごと回転させて多面観察を行うことで、非染色でも厚みのある細胞組織の全体像を確認することが可能となる。非染色かつレーザーを用いないことから、観察による細胞に対するダメージを最低限に抑えることができる。このように、オルガノイド形態の全体像を非侵襲で行うことは、オルガノイドの品質管理を容易にし、オルガノイド技術の実用化にとっても重要である。

Ⅲ. 多面スキャンによる 大域高解像イメージング

前述のように、従来の共焦点や 2 光子顕微鏡を

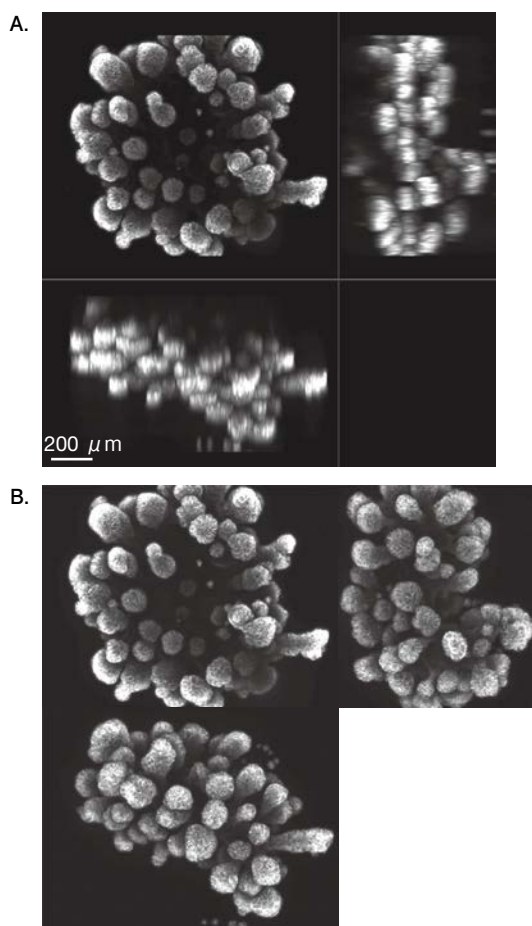


図 4 低倍レンズを用いた多面スキャンによる大域高解像イメージング

A. 一面からのイメージング結果。B. 同じサンプルを多面からイメージングした結果

用いた組織の三次元計測においては、10 倍程度の低倍率レンズではその点拡がり関数 (point spread function; PSF) の大きさから厚み方向の解像度が非常に低く、更にシグナル感度も低いため、組織深遠部の観察が困難であった。一方で、培養 Cube を用いて一方向からレーザースキャン後にサンプルを Cube ごと回転させることで、これまで z 方向の情報であったものが、 xy の情報へと置き換えて、スキャンすることができる。このように、多面からスキャンした画像を高精度に空間アライメントができれば、低倍率のレンズにおいても z 方向の PSF に依存しない高解像な計測が可能になる。各面からの画像を正確にアライメントするための手法としては、培養 Cube

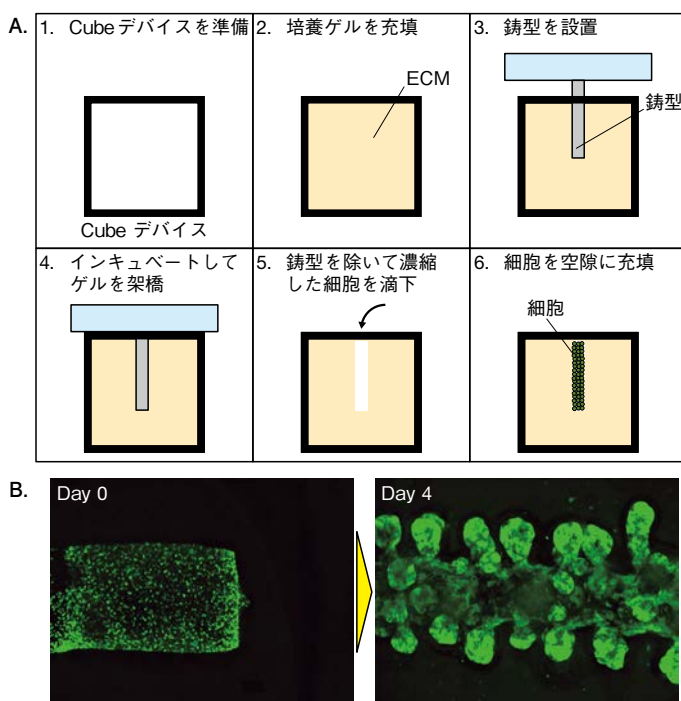


図 5 三次元初期位置制御

A. 培養 Cube を用いた細胞集団位置制御プロセス。B. 円柱上に制御した気管支上皮細胞を培養した結果

内に複数面から観察できる参照点となるポイントを作ることでアライメント可能である。例えば、自家蛍光が強く生体適合性のあるフォトレジスト (SU-8) を用いて、微細加工技術により $50\ \mu\text{m}$ 程度の突起をフレームに追加し、これらを空間参照点として位置合わせに用いることができる。各面から取得した画像データをアライメント後、各空間位置における輝度値データを、別面からのデータで補い三次元画像の再構築を行うことで大域高解像 3D イメージングを達成する⁴⁾。図 4 は、培養 Cube 内で培養した気管支上皮細胞の分岐形成をアクチン染色し、1 面から取得した画像と、6 面から取得した画像の比較である。1 mm 以上のサンプル全体をイメージングするために 10 倍レンズを用いると、一方向からのスキャンでは PSF の大きさから z 方向に間延びし、検知できていない部位も多く存在し、適切な三次元像を得ることができていない (図 4A)。一方、6 面から観察しデータを補完することにより、厚み方向の解像度を飛躍的に向上させ、mm 深さの位置まで計測できていることがわかる (図 4B)。

本イメージング手法では、培養器の観点からイメージングの質を向上させることが可能であり、現在使用している顕微鏡システムをそのまま利用することができる。透明化試薬などイメージングの質を上げるための試薬も併用することが可能であることから、汎用性が非常に高いことが特徴である。

IV. 三次元初期位置制御による実験再現性の向上

実験条件のバラつきは、細胞から集団へと組織形成されるパターンの再現性を著しく劣化させる。周囲とコミュニケーションをとりながら集団形成していることを考えると、播種時の細胞の配置がその後の三次元形態にとって非常に重要であることは容易に予想できる。一方、サイズが数 μm 程度の細胞にとって、作業者にはわずかに $100\ \mu\text{m}$ 程度の誤差も各細胞にとっては非常に大きい。しかし、ハイドロゲルの中で細胞を播種する必要がある三次元培養において、ピペットによる実験作業を μm レベルで行うことは困難を極め

る。現在、組織工学の分野においてもバイオプリンターを用いた三次元細胞空間制御は開発が進められているが、バイオプリンター自体が高価なうえ、実験に応じた条件出しも必要となるため、すぐにどの研究室でも使えるような技術ではまだない。

一方、培養 Cube の操作性を活かすことで、単純な形状であれば Cube 内の細胞集団の三次元位置も比較的容易に制御することができるようになる。図 5A にプロセスを示す。まず、細胞集団を配置したい形状の型と Cube デバイスを用意する。培養ゲルとして必要な ECM を Cube 内に注入したら、ゲルが固まる前に用意した型を Cube の上から Cube 内に吊るすように配置する。次に、Cube ごと培養ゲルをインキュベートして、培養ゲルが固まった段階で型を取り除くことで、ECM 内に型と同様の空間が生じる。この空間に細胞を注入し、細胞が充填されるまで待つことで、用意した型の形に細胞集団の形状を制御することができるようになる⁵⁾。

図 5B に、気管支上皮細胞を Cube 内で円柱上に配置した状態から培養を行い、アクチン染色した例を示す。ピペットを用いたゲル内への細胞の直接注入では、形状や濃度の均一化が非常に困難であり、結果として出てくる分岐の方向や長さに大きなバラつきが生じていた。しかし、細胞の初期形状を制御することで、非常に均一な分岐誘導が達成された。出てきた気管支の分岐はすべて主軸となる円柱から 90° 方向に伸長し、同様の条件で何度実験をしても分岐の太さ、長さ、ピッチなどのパターンが再現よく形成されている。培養 Cube 内で培養して出てきた組織パターンは、前述の多面スキャンを行うことにより全体をイメー

ジングすることができ、実験再現性と共に正確な計測へとつなげることが可能となる。

おわりに

オルガノイドのように、mm サイズの組織の三次元培養実験は今後ますます重要になってくることはまちがいないが、三次元特有の実験の難しさがまだまだ大きな障害となっている。より多くの研究者がルーティーンとしてこれら実験系を実施するためには、大規模な装置ではなく、汎用性の高い安価なツールの開発は必須である。今回紹介した培養 Cube およびそれを用いた培養・イメージング技術は、あくまでも安価に作製できる培養器の開発を起点として成り立っていることから、汎用性が高いことが大きなメリットである。今後生体内のシステムを再構築していくためには、より洗練された制御・計測技術が次々と求められるようになる^{6,7)}。その際に、操作が複雑になりすぎて使える人しか使えない、といったことにならないよう、いかにシンプルな技術に落とし込んでいくことができるか、開発する側の人間にとって大きな課題でもある。

●文 献

- 1) Shamir ER, Ewald AJ : *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15 : 647-664, 2014
- 2) Sasai Y : *Cell Stem Cell.* 12 : 520-530, 2013
- 3) Hagiwara M, Kawahara T, Nobata R : *Adv Healthc Mater.* 5 : 1566-1571, 2016
- 4) Hagiwara M, Nobata R, Kawahara T : *Appl Sci.* 8 : 235, 2018
- 5) Hagiwara M, Nobata R, Kawahara T : *Integr Biol.* 10 : 306-312, 2018
- 6) Takebe T, Wells JM : *Science.* 364 : 956-959, 2019
- 7) Hofer M, Lutolf MP : *Nat Rev Mater.* 6 : 402-420, 2021