

(続紙 1)

京都大学	博士（エネルギー科学）	氏名	呉 裴 征
論文題目	Fabrication of high cellular density tissues with hierarchical vascular networks （階層的血管網を有する高細胞密度組織の作製）		
（論文内容の要旨） 本論文は、細胞シートの細胞配向に及ぼす機械的刺激の影響を調べ、その結果を基に階層的血管網（動脈と毛細血管が吻合した血管網）を有する高密度細胞組織を創製することに関する結果をまとめたもので、5章からなっている。 第 1 章は序論で、組織工学の進展におけるミリメートルサイズの高密度三次元細胞組織の重要性と高密度三次元細胞組織内部に階層的血管ネットワークを形成させることの必要性について概説している。最近の生体外培養技術の進歩により、細胞シート、スフェロイド、オルガノイド等細胞集合体の製造が容易になり、これらを使ったミリメートルサイズの三次元細胞組織の開発が進めれている。しかしこれらの三次元細胞組織は細胞密度が低く、生体内に移植すると過度の免疫反応を引き起こすことが懸念されることから、高密度の細胞組織の開発が求められている。ミリメートルサイズの高密度細胞組織を創製するには、酸素と栄養を供給するための階層的な血管ネットワークを細胞組織内部に構築する必要がある。以上を踏まえ、細胞配向に及ぼす機械的刺激の影響を調べ、その結果を基に階層的血管網を含有する高密度細胞組織を作製するという本研究の目的が述べられている。 第 2 章では、ナノポーラス金（NPG）アクチュエータを用いて約 0.5%の周期引張りひずみをヒト皮膚線維芽細胞（NHDFs）およびその細胞シートに付与することで、機械的刺激による細胞配向を調べた。個々の細胞では周期引張りひずみを付与することで細胞増殖が促進された。ただし、細胞配向は見られなかった。一方、細胞シートではひずみ方向と垂直方向に細胞が配向した。細胞シートにおける細胞配向機序を解明するため細胞内シグナル伝達経路を調べたところ、周期引張り刺激により MAPK 経路が活性化することが示された。また、細胞結合タンパクであるインテグリンの阻害剤を用いてシグナル伝達におけるインテグリンの役割を調べたところ、シグナル伝達はインテグリンの種類に依存し、$\alpha_v\beta_3$インテグリンがシグナル伝達に重要な役割をすることが示された。細胞シートの一部を NPG アクチュエータ上に、残りをプラスチック基板上に配置し周期引張りひずみを付与したところ、周期引張りひずみが直接負荷されないプラスチック基板上の細胞シートにおいても細胞配向が観察された。このことから、配向シグナルは細胞間結合タンパクであるカドヘリンを介して伝達されることが示唆された。 第 3 章では、NHDFs とヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）の共培養細胞シート用いて、階層的			

血管網を有する高密度細胞組織（直径 1mm, 長さ 5mm）の作製を行った。作製した細胞組織の細胞密度を測定したところ、約 2×10^8 個/mL であった。この細胞密度は生体内器官のそれとほぼ同じである。毛細血管と人工動脈が吻合し、細胞組織内に階層的血管網が形成されていることが三次元イメージングから観察された。また遺伝子発現解析から、十分な酸素が階層的血管網を通じ細胞組織内部に供給されていることが示唆された。作製した細胞組織を灌流培養によって 7 日間長期培養することで細胞間の結合が強化された。灌流により発生する機械的刺激が細胞間結合の強化に寄与することが示唆された。

第 4 章では、スフェロイドを用いて階層的血管網を有する高密度細胞組織の作製を行った。細胞シートから高密度細胞組織を作製する方法には、細胞生存率が低い（生細胞率約 60%）、単純な構造しかできない、スケールアップに限界があるという問題があった。これらの問題点を解決するため、作製法の改良が行われた。この改良には 3 つの特徴：トリカルチャースフェロイド、振盪培養、3D バイオプリンティングがあった。トリカルチャースフェロイドでは、NHDFs、HUVECs に肝星細胞（HSCs）を加えることで、発達した毛細血管ネットワークを持つスフェロイドが作製できた。組織観察と遺伝子解析から、HSCs は周囲の細胞との複雑なクロストークにより、階層的血管網の形成を促進する働きがあることが示された。振盪培養は、組織内部への酸素と栄養の供給を促進し高い細胞生存率を維持するだけでなく、コラーゲン分泌と細胞増殖を促進しスフェロイド間の空隙を埋めることでスフェロイド間の結合を強固にする効果があった。バイオプリンティングは、高精度かつ再現性よく細胞組織を大量生産するのに有用であった。これらの改良により、階層的血管網を有したより大きなサイズの細胞組織の作製に成功した。

第 5 章は総括であり、本論文で得られた成果を要約している。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞挙動に及ぼす機械的刺激の影響を調べ、その結果を基に階層的血管網（動脈と毛細血管が吻合した血管網）を有する高密度細胞組織を創製することに関する結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. ナノポーラス金 (NPG) アクチュエータを用いて約 0.5%の周期引張りひずみをヒト皮膚線維芽細胞 (NHDFs) およびその細胞シートに付与することで、細胞挙動に及ぼす機械的刺激の影響を調べた。周期引張りひずみを付与することで個々の細胞では細胞増殖が誘導され、細胞シートではひずみ方向と垂直方向に細胞が配向した。細胞シートの一部を NPG アクチュエータ上に、残りをプラスチック基板上に配置し周期引張りひずみを付与したところ、ひずみが直接負荷されないプラスチック基板上の細胞シートにおいても細胞は配向した。以上のことから、配向シグナルは細胞間結合タンパクであるカドヘリンを介して伝達されることが示唆された。

2. NHDFs とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) との共培養によって作製した細胞シートを用いて、階層的血管網を有する高密度細胞組織（直径 1mm, 長さ 5mm）を創製した。遺伝子発現解析等から、階層的血管網を通じ十分な酸素が細胞組織内部に供給されていることが示された。作製した細胞組織を灌流培養によって 7 日間長期培養することで細胞間の結合が強化されたことから、灌流により発生する機械的刺激が細胞間結合の強化に寄与することが示唆された。

3. 細胞シートから高密度細胞組織を作製する方法には、細胞生存率が低い（生細胞率約 60%）、単純な構造しかできない等の問題があった。これらの問題点を解決するため、トリカルチャースフェロイド、振盪培養、3D バイオプリンティングを用いた改良を行った。トリカルチャースフェロイドでは、NHDFs、HUVECs に肝星細胞を加えることで毛細血管ネットワークを持つスフェロイドが作製され、発達した階層的血管網を構築することができた。振盪培養は、組織内部への酸素と栄養の供給を促進し細胞生存率を向上させるとともに、コラーゲン分泌と細胞増殖を促進しスフェロイド間の結合を強固にする効果があった。バイオプリンティングは、再現性よく細胞組織を大量生産するのに有用であった。

以上、本論文は階層的血管網を有する高密度細胞組織の創製に関するものであり、学術上、實際上、資するところが少なくない。

よって、本論文は博士（エネルギー科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 6 年 11 月 25 日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降