

大学名	東京大学		
University	University of Tokyo		
外国人研究者	パン イウアン		
Foreign Researcher	Pang, Yuan		
受入研究者	酒井 康行	職名	教授
Research Advisor	Yasuyuki Sakai	Position	Professor
受入学部/研究科	大学院工学系研究科		
Faculty/Department	Graduate School of Engineering		

<外国人研究者プロフィール/Profile>

国籍	中華人民共和国
Nationality	People's Republic of China
所属機関	清華大学
Affiliation	Tsinghua University
現在の職名	助教
Position	Assistant Professor
研究期間	2019年1月7日 ~ 2019年3月31日 (79日間)
Period of Stay	79days (January 7, 2019 - March 31, 2019)
専攻分野	バイオメディカルエンジニアリング
Major Field	Biomedical Engineering



酒井研究室で生化学的分析を行うパン博士/
Dr. Pang is doing some biological analysis at Sakai lab.

<外国人研究者からの報告/Foreign Researcher Report>

①研究課題 / Theme of Research

Diabetes mellitus, a severe and life-threatening disease, has long been under global healthcare concern. Although the exact cause is not yet fully understood, it is generally accepted that type I diabetes mellitus is related with the autoimmunity-mediated destruction of pancreatic β cells with environmental trigger. In this study, we propose to construct tissue engineered pancreatic β cell tissue for future implantable treatment. A PLLA scaffold was fabricated using gas foaming method which is relatively facile and resulting in highly porous scaffold modules. The scaffold was inoculated with insulin-producing cell line and studied in a perfusion culture to assess the in vitro function as a candidate for implantable tissue construct.

②研究概要 / Outline of Research

PLLA scaffold was first fabricated using poly-L-lactide particles with NH_4HCO_3 by a gas foaming method. MIN6-m9, a mouse insulinoma cell line was then inoculated to the PLLA scaffold. A bioreactor was fabricated for perfusion culture. To assess the in vitro function of the pancreatic β cell-laden module, several studies were conducted in the 1-week perfusion culture as follows: 1) cell inoculation and immobilization; 2) setup of perfusion circulate for long term culture and mimicking the in vivo micro-environment; 3) glucose consumption/lactate production; 4) glucose-induced insulin secretion; 5) live/dead assay for evaluation of cell viability after perfusion culture; 6) hematoxylin and eosin staining for observation of the tissue morphology.

③研究成果 / Results of Research

During the 1-week perfusion culture, the amount of glucose consumption was observed decreasing and the produced lactate remained relatively low and constant in the cell-laden micro-scaffolds. Referring to the glucose-dependent function, the insulin secretion kept increase during the perfusion culture. Additionally, as visualized by live/dead staining, the immobilized cells remained viable after 7 days of perfusion. The β cells seemed to persist in clusters rather than separated single cells. These results demonstrated the potential of the micro-scaffold to maintain aerobic respiration for cultured cells, which could be resulted from the highly porous structure of the constructs.

④今後の計画 / Further Research Plan

We are now summarizing the results for publication. As the next step, we propose the work focusing on the development of an vascularized multicellular pancreas tissue model by three-dimensional (3D) bioprinting, towards future treatment of type I diabetes mellitus, due to the promising capabilities of 3D bio-printing in engineering of customized and complex architecture of cell-laden tissue constructs. The work will be carried out using 1) organoid-based tissue organization, 2) 3D bio-printing, 3) integration of a flow channel network design and cellular co-culture. We aim at fabrication of a pancreas tissue model with spatially controlled cell types and numbers, topography and biocompatible evaluation of the model through drug tests and the long-term 3D cell culture.

<受入研究者からの報告/Research Advisor Report>

①研究課題 / Theme of Research

糖尿病は特に先進国においてはその患者数から対策をとるべき重要な疾患であり、究極の治療は膵島移植である。しかし、脳死ドナーにその供給を頼っている以上、広範な利用は望めず、幹細胞等をソースとして膵島細胞を取得し、適切な移植デバイスを生体外で構築・移植する新たな治療の研究開発が求められている。そこで本研究では、このような新たな移植デバイスを目指した工学的研究として、物質交換に配慮した特殊なデザインの細胞担体を、生体吸収性のポリ乳酸から、膵島モデル細胞を播種、担体ごと移植デバイス様のバイオリアクターに充填、灌流培養を行うことを目的とした。

②研究概要 / Outline of Research

特殊なポリ乳酸担体は、発泡する粒子源とポリマーを型にいれ硬化させた後に、粒子源を熱水で溶出させて作成した。グルコース濃度に応じてインスリンを産生する膵島ベータ細胞のモデルとしてマウス由来のMIN6-m9細胞を用いた。この細胞を作成した担体にまずは付着増殖させ、その後、移植デバイス様のバイオリアクターに充填し、1週間の培養と機能測定等を行った。重要な評価項目としては、グルコース消費と乳酸生成、高濃度グルコース付加によるインスリン産生、充填し1週間培養後の細胞生存性などを実施し、加えて培養終了後の細胞を固定化し、組織切片を作成、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

③研究成果 / Results of Research

まず、細胞培養において最も難しい操作となる灌流培養のセットアップについては、酒井が立ち会いながら、Pang博士と共に行った。1週間の培養の間、グルコース消費・乳酸生成とも減少傾向にあり、増殖は停止しむしろ安定な組織が形成され、培養液の連続的供給を行う灌流培養にて、高効率の好氣的呼吸が徐々に亢進する様子が観測された。実際、高濃度グルコース付加時のインスリン産生は、培養が進むにつれて増大し、培養によって機能的な組織形成が行われていることが示された。1週間の培養後の細胞生存性計測およびヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的解析からは、担体内で三次元的な細胞の組織化が進み、その中のほとんどの細胞は高い生存性を示したのに対し、単一または数個レベルの凝集に留まった細胞のほとんどは死亡していた。このように安定な三次元化をより多くの細胞に行わせる培養条件の設定が次の課題であり、この促進策についてはPang博士と酒井とで綿密な議論を行った。以上より、本担体を充填することで、高機能な膵島移植デバイスの作成への培養工学的な見通しを立てることができたとと言える。以前よりPang博士の培養操作は高度なものであったが、やや特殊な灌流培養についても習得を無事終えたことも、今後のスムーズな実験実施に繋がる重要な成果といえる。

④今後の計画 / Further Research Plan

今回の結果は、英文共著論文として投稿するために、現在解析とまとめを行っている。もちろん追加実験は必須であるが、骨格となるデータについては、今回のPANG博士の滞在によって取り終えることが出来たことが最大の成果である。今後は、さらに先進的な移植デバイスとその製作へと進む。すなわち、分岐合流する三次元血管様ネットワークを配備した組織をハイドロゲルと細胞とを同時に三次元造形するバイオフィンティングによる製作である。すでにPANG博士の清華大学での指導教員であるWei SUN教授のベンチャー企業が製作販売しているバイオフィンティング装置を、別予算にて東京大学に設置済みであり、PANG博士の滞在を利用して、セットアップを行うことが出来ている。このようにバイオフィンティングを基礎とした三次元組織構築へと進むことで、より大型の移植デバイスから極小の生体外での細胞アッセイ用デバイスまで、多様な用途とスケールの培養デバイスの製作が極めて容易になる。以上のような共同研究を推進するため、当方の修士課程1名を本テーマに配置した。また今後は、Pang博士の招聘や当方の学生の清華大学への短期派遣を計画しており、そのサポートとして、東大・清華大学間の2大学の精度である共同研究助成に応募したところである。



酒井研究室で細胞の観察を行うパン博士/
Dr. Pang is observing cultured cells at Sakai lab.



酒井研究室で細胞の培養操作を行うパン博士/
Dr. Pang is treating cultured cells at Sakai lab.