

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04194

研究課題名(和文) 酵素反応で定着・除去可能なゲルを形成するバイオプリンタ用インクライブラリの開発

研究課題名(英文) Development of bioinks gellable and on-demand degradable using enzymes

研究代表者

境 慎司 (Sakai, Shinji)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医療や組織工学分野において、その有用性が広く認識されるようになってきているバイオプリンティング技術のなかでも、特に大きな可能性を有しているとされるインクジェット式バイオプリンティングに関する研究を実施した。具体的には、ゼラチンやヒアルロン酸、アルギン酸など、細胞に対して異なる作用を示すことが知られているさまざまな材料を、インクとして用いることを可能とする知見を獲得し、新たなインクを開発するとともに、それらを用いて細胞の生存をほとんど妨げることなく、3次元構造物を造形する技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Bioprinting has attracted increasing attention as a useful tool for fabricating 3D constructs containing cells in the fields of tissue engineering and regenerative medicine. Especially, we focused on the development of novel bioinks for inkjet-bioprinting. In this study, we revealed the required conditions in the development of novel bioinks based on the study for the measurements of properties of polymer solutions and generation of satellite droplets during ejecting the polymer solution from an ink-jetting needle. We also revealed that our approach enables to use varieties of polymer solutions resulting in the hydrogels with different properties, such as the derivatives of hyaluronic acid and gelatin, without giving severe damage to the cells enclosed in the resultant three-dimensional constructs.

研究分野：生物化学工学

キーワード：再生医療 バイオプリンティング 3Dプリンター ヒドロゲル 組織工学

1. 研究開始当初の背景

機能不全の組織や臓器を、生体外で作製した3次元組織体を移植して治療する再生医療の実現へ向け、世界中でさまざまな組織体構築法が開発されている。最も広く用いられている方法は、スキャホールドと呼ばれる多孔性の鋳型に、細胞を分散させた溶液を流し込み、細胞を定着させることで目的の形状の3次元組織体を得るというものである。しかし、この方法には、任意の場所に任意の細胞を高い精度で配置することはできず、細胞が適材適所に配置され各種機能を発揮している生体組織とは大きく異なる組織体しか作製できないという問題点がある。

これに対し、最近注目されているのが3Dバイオプリンティングである。細胞を含むインクを、インクジェットプリンタを用いて目的箇所に吐出、定着(ゲル化)させ、積層しながら3次元組織を造形していく技術で、研究分担者の中村(富山大・教授)が、世界に先駆けてその可能性と有望性を実証してきた。印刷技術の進歩は装置とインクの進化で達成されるが、バイオプリンティングでは、特に細胞の増殖・機能化・組織化を誘導するインク材料の進化が不可欠である。

インク(細胞+インク材料)に着目すると、多くの研究では1種類のインクから組織体の構築が試みられている(例えば Neufurth et al, *Biomaterials* 35:8810(2014))。複数のインクを使用する報告でも細胞種はインク毎に異なるがインク材料は単一である。具体的には、単独もしくは未修飾の状態では、細胞の増殖・組織化を促進する機能が無いにも関わらず、細胞に穏和かつ迅速にゲルが得られるという理由により、アルギン酸がバイオプリンティング用インク材料として広く用いられてきた。一方、細胞の機能化や組織化は周囲材料との相互作用の制御により促進でき、必要な相互作用は細胞毎に異なる(Browning et al, *Tissue Eng B Rev* 19:455(2013))ことを考慮すると、細胞毎にその機能をチューニングされたインク材料を用いることは、細胞を精密配置可能なバイオプリンティングの有用性をさらに高め、より優れた機能を有する組織体の構築につながることは間違い無い。さらに、組織体の成熟および生体への移植を考えると、ある程度組織化が進行した後は、各ゲルを任意のタイミングで除去できる方が望ましい。しかし、このような統合的な視点からのインク材料の開発は皆無であった。

2. 研究の目的

研究代表者は、以前から、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応により得られるゲルを用いた、バイオプリンティングによらない組織体構築を行ってきた。このゲル化法は、条件を制御すれば、生存に影響を与えずに細胞を含むゲルを数秒で得ることも可能であった。さらに、異なる特性のゲ

ルをアルギン酸やキトサンなどの各種多糖から作製できること(Sakai et al, *Acta Biomater* 3:495(2007); *J Mater Chem* 22:1944(2012)など)や、それらと各種タンパク質を複合化することで、細胞の増殖・組織化を促進できること(Sakai et al, *Biomacromolecules* 11:1370(2010))を報告してきた。そこで、本研究では、このHRPを用いたゲル化を、バイオインクの定着に用いるインクジェットプリンタ用のバイオインク群を開発し、それを用いて、細胞を含む3次元構造物を造形し、その有用性を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血管新生を促進することのできるインク成分の開発

本研究では、将来的に3次元組織の構築につながるインクの開発を目的としていた。そして、3次元組織の構築にあたっては、その組織の内部の細胞に対して良好に酸素や栄養分を供給するために、血管様ネットワークの構築が重要であると考えた。そこで、それを可能とするバイオインクを得るために、低分子量ヒアルロン酸に着目した。そして、低分子量化ヒアルロン酸をヒドロゲルの中に固定するために、HRPにより架橋可能なフェノール性水酸基を導入した、高分子量ヒアルロン酸を作製し、得られたフェノール性水酸基導入ヒアルロン酸を、過ヨウ素酸ナトリウムを用いて低分子量化することを試みた。その有効性の評価を目的として、フェノール性水酸基を導入したゼラチンとの混合水溶液にHRPを溶解したものに、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞を接着させたゼラチンゲルビーズを分散し、次いで過酸化水素を作用させることでゲルを作製し、ゲルビーズ表面から周囲への細胞の遊走を評価することで行った。

(2) インクジェットバイオプリンタ用インクとして具備すべき高分子溶液物性の測定

HRPの酵素反応によりゲル化するさまざまな高分子水溶液をインクとして用いるに当たっては、どのような物性を有する溶液である必要があるのかを明らかにしておくことが重要である。そこで、フェノール性水酸基を導入したアルギン酸、カルボキシメチルセロース、ポリビニルアルコールなどのさまざまな高分子の濃度の異なる水溶液を使って、必要となる物性を明らかにすることを試みた。具体的には、各溶液について、溶液粘度、界面張力、曳糸性を測定した。その後、それらの溶液をインクジェットノズルから吐出し、溶液の飛翔状態との相関を明らかにすることを試みた。なお、本研究ではインクジェットプリンティングシステムとして、吐出孔の直径が60 μm のクラスターテクノロジー社製のものを用いた。

(3) インクジェットバイオプリンタを用いた

細胞包括微小ゲルビーズの作製

バイオプリンティングの特徴は、直径数十 μm の細胞を含んだ液滴を吐出するというものである。安定的に吐出が可能であれば、アプリケーションの1つとして、細胞包括ゲルビーズへの適用も可能であると考えられた。そこで、細胞とHRPを含んだフェノール性水酸基導入高分子溶液を、インクジェットノズルから、微量の過酸化水素を含む水溶液へ吐出し、均一なサイズの細胞包括ゲルビーズの作製を試みた。その有用性を実証することを目的として、ゲルビーズに包括された細胞の生存率および、ゲルビーズを分解して回収された細胞の増殖挙動の評価を行った。

(4)インクジェットバイオプリンタを用いた3次元構造物の造形

細胞包括ゲルビーズの作製にあたっては、細胞とHRP、フェノール性水酸基導入高分子を含んだ水溶液を微量の過酸化水素を含む水溶液に滴下することを行った。この場合、細胞が過酸化水素にさらされる時間は、作製するゲルビーズの量を少なくすることで短くすることが可能であり、大量に作製したい場合には、短時間の作製プロセスを繰り返せばよい。一方で、細胞を含む3次元構造物をプリントする場合には、過酸化水素を含む溶液中に滴下すると、構造物が大きくなるほど、細胞が過酸化水素にさらされる時間は長くなり、細胞への悪影響が無視できないほど大きくなると考えられる。そこで、2つのインクジェットノズルを用い、一方のノズルからHRP、細胞、フェノール性水酸基を含む水溶液を、もう一方のノズルから、過酸化水素とフェノール性水酸基導入高分子を含む水溶液を交互に吐出することで、液滴が着液したその場で順次ゲルを形成させ、それを積層しながら3次元構造物を作製する方法を考案し、その有用性の実証を行うことを目的とした検討を行った。

4. 研究成果

(1)血管新生を促進することのできるインク成分の開発¹⁾

フェノール性水酸基を導入した後に低分子量化を行った分子量 8600 の低分子量化ヒアルロン酸を調製し、これを溶解した培養液を用いてヒト臍帯血由来血管内皮細胞を用いたスクラッチテストを行ったところ、細胞の遊走性が平板上の培養にて向上することが確認された。次いで、フェノール性水酸基導入ゼラチン、HRP と混合後に過酸化水素水溶液を添加することでゲルを作製し、その際に、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞を表面に播種したゲルビーズと一緒に内包した。6日間の培養期間で、周囲ゲルへの遊走を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、評価したところ、低分子量化ヒアルロン酸の固定化により有意に血管内皮細胞の遊走が促進されることが示された(図1)。以上より、血管内皮細胞

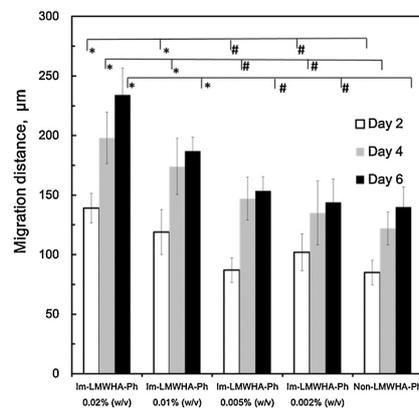


図1. ゲルビーズ表面から周囲ゲルへ遊走した細胞の遊走距離. Im-は低分子量ヒアルロン酸の固定化, その後の値は濃度を表す. ¹⁾ *P < 0.05, #P > 0.05.

胞を含む部分を造形するためのインクとして、低分子量化したフェノール性水酸基導入ヒアルロン酸を用いることで、その部分の血管新生の促進に寄与できるインク成分の開発に成功した。

(2)インクジェットバイオプリンタ用インク的设计指針の獲得

さまざまなフェノール性水酸基導入高分子水溶液および、フェノール性水酸基を導入していない高分子水溶液を用いて、インクジェットヘッドから吐出された溶液の飛翔状態を観察し、測定した粘度、界面張力、および曳糸性と飛翔中のサテライト形成に関する相関を測定したところ、界面張力との相関を見出すことはできなかった。一方で、粘度と曳糸性に関しては、図2のように、ある領域に、サテライトを生じずに吐出可能な条件が存在することを見出すことができた。これにより、この知見にもとづいて、良好な吐出が可能で、インクを調製するための設計指針を得ることができた。なお、本研究で実施したような、複数の高分子水溶液を用いて、インク設計のための統一的な指針を得た検討は、これまでほとんど実施されておらず、インクジェットバイオプリンティング分野にも、有用な知見を与えることができたものと考えられる。

この検討によって、これまでに研究代表者

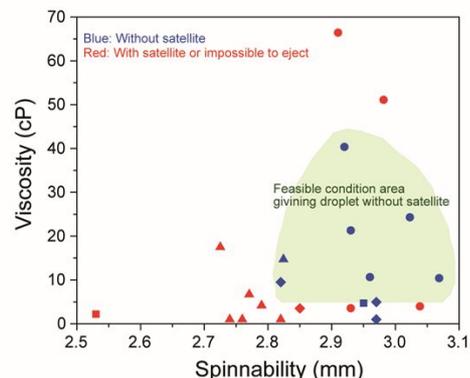


図2. 異なる高分子溶液(各シンボル)を吐出した場合のサテライト液滴形成と粘度と曳糸性の相関.³⁾

が開発を行ってきたものおよび本研究の実施期間にも新たに有用性を見出した、10種類のフェノール性水酸基導入高分子および、その混合物²⁾をインクとした多数のインクを獲得できる目処を得ることができた。

(3) インクジェットバイオプリンタを用いた細胞包括微小ゲルビーズの作製³⁾

図2に示される検討結果にもとづいて得られた知見により作製した高分子溶液に、HRPを混合し、微量の過酸化水素を含む水溶液にインクジェットノズルから滴下した。図3に示すように、フェノール性水酸基導入アルギン酸を用いた検討から、均一なサイズの球状ゲルビーズを作製可能であり、そのサイズは、ノズルの径、HRP、過酸化水素の濃度により制御可能であることが明らかとなった。また、フェノール性水酸基導入アルギン酸以外にも、フェノール性水酸基導入ゼラチンや同ヒアルロン酸、同カルボキシメチルセルロースなど、その他の高分子水溶液からも同様に球状ゲルビーズを作製できた。この結果より、これまでに広く用いられてきた方法では不可能であった、さまざまな材料から同じ架橋方法を用いて、同じように均一なサイズのゲルビーズを作製できる方法の開発に成功した。さらに、マウス線維芽細胞を分散させてゲルビーズを作製したところ、細胞の生存率は約90%であり、さらに、ゲルビーズ内から回収された細胞は、通常の継代培養を行った細胞と同様の増殖挙動を示すことが明らかとなり、本細胞包括ゲルビーズ作製法の有用性が示された。

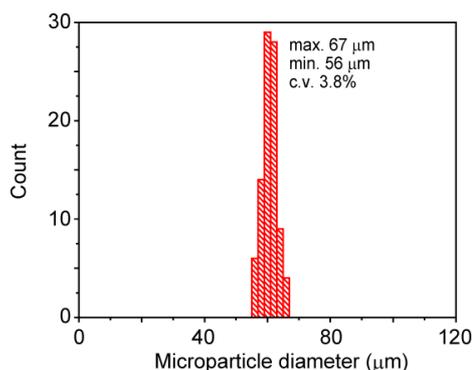


図3. 直径60 μmのインクジェットノズルを用いてアルギン酸誘導体から作製されたゲルビーズの粒子径分布。³⁾

(4) インクジェットバイオプリンタを用いた3次元構造物の造形⁴⁾

まずインクジェットバイオプリンタを用いた検討として、フェノール性水酸基導入アルギン酸と同ゼラチンをインクとして用い、これを、塩化カルシウムを、フェノール性水酸基導入アルギン酸部分を迅速に固化させるための助剤として含む、過酸化水素を含む水溶液中に吐出し、造形を試みた。その結果、細胞の接着性を有する3次元構造物を作製することに成功した。また、その構造物に線維

芽細胞を包括したところ、生存率は80%であり、細胞に大きな影響を与えることなく造形できること、また、その内部で細胞が伸展できることを1週間の培養期間で明らかにすることができた。

上記の有望な研究成果の一方で、将来の造形構造物の大型化により、過酸化水素を含む水溶液中にインクを吐出する方法は、過酸化水素の細胞毒性の点から問題があると考えた。そこで、細胞、HRPを含むフェノール性水酸基導入高分子を含むインクとフェノール性水酸基導入高分子と過酸化水素を含むインクを、別々のインクジェットノズルから交互に同一箇所に滴下することによる造形を試みた。まず、フェノール性水酸基導入アルギン酸を用いて、過酸化水素の濃度を10 mMと固定して、HRP濃度の影響に関して検討を行った。その結果、300 units/mL HRP以上の濃度にて、図4のような良好な造形が可能であることが明らかとなった。次いで、細胞への悪影響の低減の観点から、過酸化水素濃度の影響について検討を行った。その結果、過酸化水素濃度を1 mMに低下させても良好な造形が可能である一方で、0.1 mMに低下させると、造形性が悪くなることが明らかとなった。次いで、過酸化水素濃度を1 mMとして造形した場合の、得られる構造物中に残存する過酸化水素濃度に関して検討を行った。その結果、作製直後に0.1 mMであった過酸化水素濃度は10分以内に、使用した試験紙の検出限界である0.015 mM以下に低下させることが可能であることが明らかとなった。すなわち、この条件で造形することで、細胞の過酸化水素への暴露時間を10分以内とすることができることを見出した。また、同様の造形は、フェノール性水酸基導入ゼラチンや同ヒアルロン酸、同カルボキシメチルセルロースを用いても可能であることを明らかとするとともに、この方法で作製されたゲル構造物に包括される細胞は、生存率90%程度を維持できることを見出した。さらに、ヒアルロン酸とゼラチン誘導体を含むインクから作製した構造物中に包括されたマウス線維芽細胞は、構造体作製12時間程度で、その内部で伸展でき、内部に包括した細胞の増殖が可能なる3次元構造物を造形することが示された。

さらに、より複雑な構造物として、細胞の

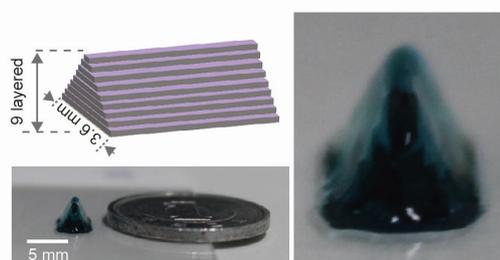


図4. インクジェットバイオプリンタにより造形したアルギン酸誘導体ゲル構造物と設計図。⁴⁾

接着可能な部分とそうでない部分を同時に持つような3次元構造物の造形などを行い、さまざまな構造物の造形が可能であることを実証した。

以上より、本研究では、インクジェットバイオプリンティングにおけるインクの定着法として、HRPの酵素反応を使った方法を提案し、それにより使用可能となる、さまざまな特性を有するインク群を開発することに成功した。さらに、それらを利用することで、細胞の生存にほとんど影響を与えず、細胞を含有する3次元構造物を造形可能であることを実証することに成功した。さらに、この知見にもとづいて、インクジェット式以外のプリンタへの当該インクの応用に関しても検討を実施し、有望な成果を得ることができた。^{5)、6)}今後、より複雑かつ生体の組織に近い構造を有する構造体の構築に取り組んでいく。

5. 主な発表論文等

1) Mehdi Khanmohammadi, Shinji Sakai, Masahito Taya; Impact of immobilizing of low molecular weight hyaluronic acid within gelatin-based hydrogel through enzymatic reaction on behavior of enclosed endothelial cells, International Journal of Biological Macromolecules, vol.97, p.308-316, 2017. [査読有り] doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.088.

2) Mehdi Khanmohammadi, Shinji Sakai, Masahito Taya; Fabrication of single and bundled filament-like tissues using biodegradable hyaluronic acid-based hollow hydrogel fibers, International Journal of Biological Macromolecules, vol.104, p.204-212, 2017. [査読有り] doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.013.

3) Shinji Sakai, Yusuke Yamamoto, Gantumur Enkhtuul, Kohei Ueda, Kenichi Arai, Masahito Taya and Makoto Nakamura, Inkjetting plus Peroxidase-Mediated Hydrogelation Produces Cell-Laden, Cell-Sized Particles with Suitable Characters for Individual Applications, Macromolecular Bioscience, vol.17, 1600416, 2017. [査読有り] doi: 10.1002/mabi.201600416.

4) Shinji Sakai, Kohei Ueda, Enkhtuul Gantumur, Masahito Taya, Makoto Nakamura; Drop-on-drop multimaterial 3D bioprinting realized by peroxidase-mediated cross-linking, Macromolecular Rapid Communications, vol.39, 1700534, 2018. [査読有り] doi: 10.1002/marc.201700534.

5) Shinji Sakai, Hiromi Ohi, Tomoki Hotta, Hidenori Kamei, Masahito Taya; Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatin-based bioink

through micro-extrusion and visible light-initiated crosslinking, Biopolymers, vol.109, 23080, 2017. [査読有り] doi: 10.1002/bip.23080

6) Shinji Sakai, Hidenori Kamei, Toko Mori, Tomoki Hotta, Hiromi Ohi, Masaki Nakahata, Masahito Taya; Visible light-induced hydrogelation of an alginate derivative and application to stereolithographic bioprinting using a visible light projector and acid red, Biomacromolecules, vol.12, p.672-679, 2018. [査読有り] doi: 10.1021/acs.biomac.7b01827.

[雑誌論文](計 7 件)

[学会発表](計 21 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

境 慎司 (SAKAI, Shinji)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号: 20359938

(2)研究分担者

中村 真人 (NAKAMURA, Makoto)

富山大学・理工学部・教授
研究者番号: 90301803

(3)連携研究者

小嶋 勝 (KOJIMA, Masaru)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 00533647