

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12548

研究課題名(和文)足場材料の多孔質構造の制御

研究課題名(英文)Controlling of Porous Structures of Scaffolds

研究代表者

陳 国平 (Chen, Guoping)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA主任研究者

研究者番号：50357505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：撥水性表面に固着させた氷微粒子とフリーの氷微粒子を鋳型として用い、開いた表面空孔と連通する内部空孔を有するPLGA-コラーゲン多孔質足場材料を開発した。本多孔質材料にウシ関節軟骨細胞を播種したところ、細胞は開いた表面孔を通じて内部空孔に侵入し、多孔質足場材料全体に均一に分布して増殖した。細胞は丸い形態を有し、軟骨細胞特異的な遺伝子を発現して豊富な軟骨細胞外マトリックスを産生し、均一な軟骨様組織を再生することができた。以上の結果から、開発した多孔質足場材料は均一な軟骨組織の再生に有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：PLGA-collagen porous scaffolds were prepared by using a template with embossing ice particulates on a hydrophobic surface and free ice particulates. The porous scaffolds had open surface pore structure, which was controlled by the embossing ice particulates, and interconnected bulk pore structure, which was controlled by the free ice particulates. The porous scaffolds were used for three-dimensional culture of bovine articular chondrocytes. The cells penetrated into the interconnected pores and showed homogeneous distribution throughout the scaffolds. The cells in the scaffolds showed round morphology, proliferated with culture time, expressed chondrogenic genes and secreted cartilaginous matrices. Cartilage-like tissue with homogeneous distribution of chondrocytes and cartilaginous matrices was regenerated. The results indicated that the interconnected porous scaffolds should be used for cartilage tissue engineering.

研究分野：生体材料

キーワード：足場材料 多孔質材料 コラーゲン 多孔質構造 氷微粒子 再生医療 軟骨再生 三次元培養

## 1. 研究開始当初の背景

組織再生のための多孔質足場材料は、細胞の分布や接着、増殖、分化などを制御し、組織を再生するうえで重要な役割を果たす。細胞を多孔質足場材料に三次元的に分布させるためには、多孔質足場材料の表面付近の空孔が外部に対して開いていること、材料内部の空孔が互いにつながっていることが必要で、これらの構造を制御することが求められる。しかしながら、従来の多孔質足場材料では、表面の開いた空孔は一部しかなく、しかも内部の空孔は孤立しているという問題があった。そのため、細胞を足場材料全体に均一に分布させるのは困難で、播いた細胞の大部分は足場材料の表面付近に偏って存在することになる。このような場合では、足場材料の表面付近には組織は再生されるが、材料内部は組織が再生されず欠陥となってしまう、大きな機能性組織を再生することはできない。

## 2. 研究の目的

本研究では、氷の微粒子を結晶核として氷の結晶成長を制御し、形成させた氷晶のネットワークを空孔のテンプレートとして用いることにより、生体組織をより効率よく再生できる、連通性に富んだ空孔構造を有するコラーゲン多孔質足場材料の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 氷微粒子の作製

まず、純水を液体窒素中に噴霧し、氷微粒子を作製した。この氷微粒子を -15 °C の低温チャンバーに移し、目の大きさが 425 と 500  $\mu\text{m}$  の篩でふるい分け、粒径が 425 ~ 500  $\mu\text{m}$  のフリーの氷微粒子を得た。

また、撥水性フィルムで包んだガラス板に厚みが 2 mm のシリコンフレームを載せ、これを超音波式加湿器に 6 分置くことにより、撥水性フィルム表面上に微小な水滴を形成させた。これを -80 °C で凍結することにより、撥水性フィルム表面に形成させた氷微粒子の鑄型を作製した。

### (2) 多孔質足場材料の作製

まず、ブタタイプ コラーゲンをエタノールと酢酸水溶液の混合溶媒に溶かし、2 % のコラーゲン溶液を調製した。調製したコラーゲン溶液及び上記のフリーの氷微粒子と氷微粒子鑄型を -5 °C の低温チャンバー内で温度平衡化した。続いて上記のコラーゲン溶液と氷微粒子を 50/50 (体積/重量) の比率で混合し、氷微粒子とコラーゲン溶液の混合スラリーを調製した。この混合スラリーを(1)の氷微粒子固着ガラス板(2枚)の間に充填し、その真ん中に乳酸とグリコール酸の共重合ポリマー (PLGA) のニットメッシュを配置した。つづいて、-5 °C で4時間、-80 °C で6時間凍結した。さらに、この凍結物を凍

結乾燥し、50 mM の 1-エチル 3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、20 mM の N-ヒドロキシスクシンイミドを用いてコラーゲン分子を架橋した。その後、純水で洗浄し、凍結乾燥することにより、開いた表面空孔構造と連通する内部空孔構造を有する PLGA-コラーゲン多孔質材料を作製した。

作製した PLGA-コラーゲン多孔質材料のキャラクタリゼーションを行った。具体的には、多孔質足場材料の表面及び断面を走査型電子顕微鏡で観察した。また、引張試験により、PLGA-コラーゲン多孔質材料の引張強度を測定した。

### (3) 多孔質材料での軟骨細胞培養

ウシ膝関節から単離した軟骨細胞を二回継代培養した後、多孔質材料に播種した。PLGA-コラーゲン多孔質材料を高さ 6 mm、直径 4 mm の円柱状にくり抜き、エチレンオキシドガスで滅菌した後、細胞培養に用いた。細胞密度が  $2.5 \times 10^7$  cells/mL の軟骨細胞の懸濁液 100  $\mu\text{L}$  ずつ多孔質材料の上面と下面に播いて、増殖培地でゆっくり振動しながら 1 週間培養した。

1 日間培養した細胞/多孔質材料をリン酸緩衝液で洗浄した後、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定化した。固定化した細胞/多孔質材料を薄切し、細胞核を蛍光色素 (4',6-diamidino-2-phenylindole; DAPI 試薬) で染色し、蛍光顕微鏡で細胞の分布を観察した。

1 週間培養した細胞/多孔質材料をヌードマウスの背中皮下に 8 週間埋植した。その後、移植物を回収し、その外観を観察した。

### (4) 再生組織の評価

一部の移植物を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定化し、パラフィンに包埋し、組織染色用に薄切した。この切片をヘマトキシリン/エオジン、サフラニン O で染色した。また II 型コラーゲンの抗体を用いた免疫染色を行った。

軟骨組織の再生を定量的に評価するため、回収した移植物の一部を用いて、再生された組織に含まれる DNA の定量及び細胞外マトリックスタンパク質であるグリコサミノグリカンの定量を行った。さらに、リアルタイム定量 PCR 法による II 型コラーゲンとアグリカンの遺伝子発現解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 多孔質構造を制御した多孔質材料

作製したフリーの氷微粒子は球状で、粒径が 425 ~ 500  $\mu\text{m}$  であった (図 1a)。また、撥水性フィルム表面に形成させた氷微粒子の平均粒径は  $442 \pm 10$   $\mu\text{m}$  であった (図 1b)。作製した PLGA-コラーゲン多孔質材料の上面及び横断面の外観写真を図 1c に示す。PLGA ニットメッシュはコラーゲン多孔質体の真中に配置されていることが分かった。

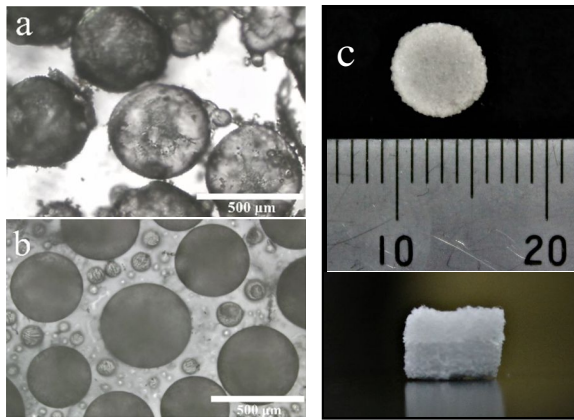


図 1 . (a)フリーの氷微粒子の光学顕微鏡の写真、(b)疎水性フィルム表面に固着した氷微粒子の光学顕微鏡の写真、(c)作製したPLGA-コラーゲン多孔質材料の上面(上)及び横断面(下)の外観写真。

PLGA-コラーゲン多孔質材料の表面及び断面を走査型電子顕微鏡で観察した。多孔質材料外表面に大きな空孔が多く観察され、これらは内部の空孔と連通していることが分かった(図2a)。多孔質材料の表面にある大きな空孔は、疎水性フィルム表面の氷微粒子の鋳型によって形成され、連通孔はコラーゲン溶液が凍結した際に氷微粒子の表面から成長した氷の結晶によると考えられる。

また、横断面及び縦断面の走査電子顕微鏡写真から、多孔質材料の内部には氷微粒子と同程度の大きさの空孔は密に存在し、互いに連通していることが分かった(図2b, c)。さらに、縦断面像から、コラーゲン多孔質体はPLGAニットメッシュと絡み合っていることが分かった(図2c)。多孔質材料の内部の大きな空孔はコラーゲン水溶液と混合したフリーの氷微粒子によるもので、連通孔はコラーゲン溶液が凍結した際に新しく形成した氷の結晶によると考えられる。氷の新しい結晶はフリーの氷微粒子表面から成長して互いに繋がったことで、多孔質材料に高い連通性をもたらしたと考えられる。

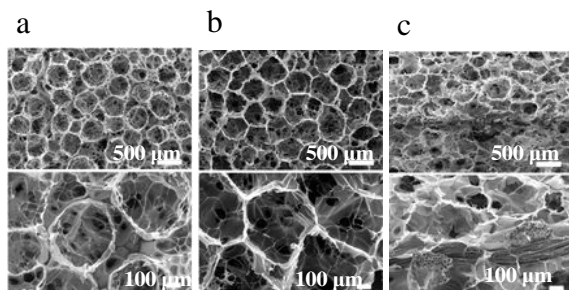


図 2 . PLGA-コラーゲン多孔質材料の上面(a)、横断面(b)及び縦断面(下)の走査電子顕微鏡写真(右)

力学試験の結果、PLGA-コラーゲン多孔質材料は乾燥状態でも湿潤状態でもコラーゲ

ン多孔質体より高い引張強度を示した。

(2)多孔質材料を用いた軟骨組織の再生  
PLGA-コラーゲン多孔質材料でウシ関節軟骨細胞を培養し、1日間培養した細胞をDAPIにより細胞核を染色し、細胞の分布を観察した。PLGA-コラーゲン多孔質材料の上面から下面まで軟骨細胞は均一に分布していることが分かった。PLGA-コラーゲン多孔質材料は開いた表面構造と連通した内部空孔を有するため、播種した軟骨細胞は開いた表面構造を通し、連通した空孔に行きわたり、多孔質材料に均一に播種することができた。

1週間培養した細胞/多孔質材料をヌードマウスの背中皮下に8週間埋植したところ、再生した組織は乳白色の表面光沢を示した(図3)。



図 3 . 再生した軟骨組織の外観

(3)再生組織の構造

再生組織の切片をヘマトキシリン/エオジン染色により、軟骨細胞は丸い形態を有した(図4の左の染色像)。サフラニンO染色により、グリコサミノグリカンの細胞外マトリックスは染色された(図4の右)。関節軟骨に特異的なタイプIIを確認するために、抗タイプIIコラーゲン抗体による免疫染色を行った。その結果、再生組織全体にタイプIIコラーゲンが検出された(図5)。これらの結果より、軟骨細胞は丸い形態を有し、軟骨細胞外マトリックスを産生すること、また、軟骨細胞と細胞外マトリックスが多孔質足場材料に均一に分布していることが分かった。

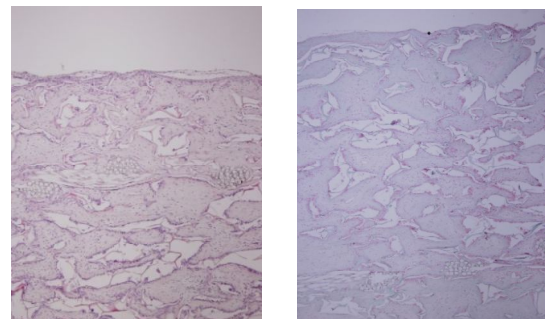


図 4 . 再生した軟骨組織のヘマトキシリン/エオジン染色(左)とサフラニンO染色(右)

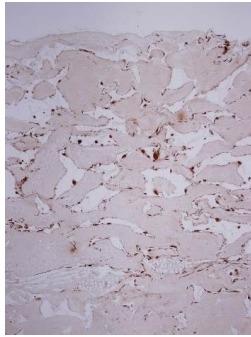


図5. 再生した軟骨組織の II 型コラーゲンによる免疫染色

In vitro で1週間培養した細胞/多孔質材料の構造体及び8週間移植の再生組織に含まれるDNAとグリコサミノグリカンの定量を行った。その結果、in vitro で1週間培養することにより、DNAとグリコサミノグリカンの含量はともに増加した。8週間移植することにより、DNAとグリコサミノグリカンの含量はさらに増加した。これらの結果により、培養及び移植により、軟骨細胞は多孔質材料中で増殖し、軟骨細胞の細胞外マトリックスを産生したことが分かった。

また、リアルタイム定量PCR法により、軟骨細胞のマーカー遺伝子であるII型コラーゲンとアグリカンの遺伝子発現レベルを解析した。その結果、PLGA-コラーゲン多孔質材料で再生した組織はII型コラーゲンとアグリカンを高発現したことが分かった。

以上の結果より、撥水性フィルム表面に固着させた氷微粒子及びフリーの氷微粒子を用いることにより、開いた表面空孔及び連通した内部空孔を有する多孔質材料を作製できた。この多孔質材料を用いて培養した軟骨細胞は多孔質材料中で均一に分布して増殖し、丸い形態を有し、軟骨細胞外マトリックスの遺伝子を発現し、豊富なマトリックスを産生し、均一な軟骨組織を再生することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Forget, M. Waibel, D. M. Rojas-Canales, S. Chen, N. Kawazoe, F. J. Harding, T. Loudovaris, P. T. H. Coates, A. Blencowe, G. Chen and N. H. Voelcker, IGF-2 coated porous collagen microwells for the culture of pancreatic islets, *Journal of Materials Chemistry B*, 査読有, 5, 2017, 220-225. DOI: 10.1039/c6tb02748b

Shangwu Chen, Qin Zhang, Tomoko Nakamoto, Naoki Kawazoe, Guoping Chen, Gelatin Scaffolds with Controlled Pore Structure and Mechanical Property for Cartilage Tissue Engineering Part C

Methods, 査読有, 22, 2016, 189-98  
DOI:10.1089/ten.tec.2015.0281

Shangwu Chen, Qin Zhang, Naoki Kawazoe, Guoping Chen, Effect of High Molecular Weight Hyaluronic Acid on Chondrocytes Cultured in Collagen/Hyaluronic Acid Porous Scaffolds, *RSC Advances*, 査読有, 5, 2015, 94405-94410.  
DOI:10.1039/C5RA18755A.

Shangwu Chen, Tomoko Nakamoto, Naoki Kawazoe, Guoping Chen, Engineering Multi-layered Skeletal Muscle Tissue by Using 3D Microgrooved Collagen Scaffolds; *Biomaterials*, 査読有, 73, 2015, pp.23-31.  
DOI:10.1016/j.biomaterials.2015.09.010

〔学会発表〕(計14件)

Xiuhui Wang, 川添 直輝, 陳 国平, Collagen Porous Scaffolds Prepared by Using Ice Particulates, つくば医工連携フォーラム2017, 2017年1月20日, 物質・材料研究機構千現地区第一会議室, 茨城県つくば市.

PUTRI Nur Rofiqoh Eviana, 川添 直輝, 陳 国平, Preparation of Collagen-PLGA Hybrid Scaffolds with Controlled Pore Structure for Cartilage Tissue Engineering, つくば医工連携フォーラム2017, 2017年1月20日, 物質・材料研究機構千現地区第一会議室, 茨城県つくば市.

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Preparation of Polymeric Scaffolds and Biomimetic Matrices for Tissue Engineering, 3rd International Conference on Biomaterials in Tokyo, 2016年11月28日, 東京大学伊藤国際技術センター, 東京都文京区.

Guoping Chen, Biodegradable Polymer Scaffolds and Biomimetic Matrices for Tissue Engineering Applications, HKU International Symposium for 3D Bio-printing and Biomaterials (招待講演), 2016年10月27日, 香港, 中国.

陳 国平, 陳 尚武, 川添 直輝, 多孔質構造を制御した再生医療用高分子足場材料の開発, 第65回高分子討論会, 2016年9月15日, 神奈川大学横浜キャンパス, 神奈川県横浜市.



Naoki Kawazoe, Jia Hui Ng, Guoping Chen, Preparation of a PLGA-Collagen Hybrid Scaffold with Controlled Mechanical Properties and Pore Structures, TERMIS-AP Meeting 2016 (招待講演), 2016年9月5日, 淡水, 台湾.

Guoping Chen, Rong Cai, Shangwu Chen, Naoki Kawazoe, Design and Preparation of Hybrid and Biomimetic Porous Scaffolds for Tissue Engineering, TERMIS-AP Meeting 2016 (招待講演), 2016年9月4日, 淡水, 台湾.

PUTRINur Rofiqoh Eviana, Shangwu Chen, Naoki Kawazoe, Guoping Chen Preparation of Collagen-PLGA Hybrid Scaffolds with Controlled Pore Structure for Cartilage Tissue Engineering, 2016 Asia University Symposium on Biomedical Engineering, 2016年7月21日, 北京, 中国.

陳 国平, 細胞の機能制御及び組織再生のための足場材料, 学振第 174 委員会第 54 回研究会 (招待講演), 2016年6月3日, 京都テルサ, 京都府京都市.

Guoping Chen, Shangwu Chen, Naoki Kawazoe, 3D micropatterned porous scaffolds for skeletal muscle tissue engineering, 10th World Biomaterials Congress, 2016年5月18日, モントリオール, カナダ.

陳 国平, 川添 直輝, 再生医療のための高分子足場材料の開発, つくば医工連携フォーラム2016, 2016年1月22日, 産総研つくばセンター共用講堂, 茨城県つくば市.

陳 尚武, 川添 直輝, 陳 国平, Preparation of Microgrooved Collagen Scaffolds for Muscle Tissue Engineering, 第 25 回インテリジェント材料・システムシンポジウム, 2016年1月8日, 東京女子医科大学先端生命医科学研究所, 東京都新宿区.

陳 国平, 再生医療用多孔質足場材料の研究開発, 地域・産学連携のためのライフイノベーション拠点形成第1回公開シンポジウム (招待講演), 2015年8月7日, ホテルグランヴィア和歌山, 和歌山県和歌山市.

Guoping Chen, Shangwu Chen, Qing. Zhang, Tomoko Nakamoto, Naoki Kawazoe, Preparation of Gelatin Porous Scaffolds Using Ice Particulates for Cartilage Tissue Engineering, The 5th Asian Biomaterials Congress (招待講演), 2015年5月9日, 台北, 台湾.

[図書](計6件)

川添 直輝, 陳 国平, シーエムシー出版, 再生医療用足場材料の開発と市場, 2016.267 (14-23).

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Woodhead Publishing, Characterisation and Design of Tissue Scaffolds, 2016.276 (105-125).

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Elsevier, Biomaterials Nanoarchitectonics, 2016.347 (77-95).

Guoping Chen and Naoki Kawazoe, Springer, Polymeric Biomaterials for Tissue Regeneration-From Surface/Interface Design to 3D Constructs, 2016. 386 (41-56).

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Wiley, Biomaterials From Nature for Advanced Devices and Therapies, 2016. 669 (3-15).

Guoping Chen, Taylor & Francis, Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials, 2015. 8299 (7085-7092).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

陳 国平 (CHEN, Guoping)

物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク  
トニクス研究拠点・MANA 主任研究者

研究者番号: 5 0 3 5 7 5 0 5