

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16330

研究課題名(和文) 効率的な酸素と栄養の輸送機能を持つ人工血管網の構築技術の開発と設計理論の構築

研究課題名(英文) Development of a construction method for engineered blood vessel networks with efficient transport properties of oxygen and nutrients

研究代表者

古澤 和也 (Furusawa, Kazuya)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：00510017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓などの巨大な臓器を細胞とゼリー状の素材を組み合わせるためには、酸素や栄養の通り道となる血管を人工臓器の中に通す必要があります。私たちの体の中の血管は効率良く酸素や栄養を臓器のすみずみまで届けることができるかたちを持っています。今回の研究では、臓器の中の血管のかたちをコラーゲンゲルを使って再現し、これを使って人工的に血管を作る技術を開発しました。また、この血管に培養液を持続的に流動させる装置を作ることに成功しました。今後は、今回作った人工血管に培養液を流すことで人工血管を人工血管網へと発展させ効率的な酸素と栄養の輸送が実現できる人工血管網の構築技術を確立することに挑みます。

研究成果の概要(英文)：Introducing the blood vessel that plays a role of transport duct for oxygen and nutrients is a prerequisite for artificially constructing huge organs, such as liver and heart, by using combinations of cultured cells and gels. The blood vessels in our body have excellent transport properties of oxygen and nutrients. The excellent transport properties are attributed to a morphology of blood vessel. In this study, we developed the method for constructing the engineered blood vessel by using the template collagen hydrogel which mimics the morphology of blood vessel in our body. In addition, we developed a device for perfusing a cell culture medium into the engineered blood vessel. We will develop the method for introducing the blood vessels with efficient transport properties of oxygen and nutrients into the huge engineered organs by using the methodologies developed in this study.

研究分野：高分子物理学、生体材料学、組織工学、バイオレオロジー

キーワード：血管 コラーゲン 灌流培養 輸送特性 組織工学 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

巨大な再生組織を構築するためには、酸素や栄養の供給経路である血管網を導入する技術を確認することが必要不可欠である。これまでに、数多くの血管導入技術が確立されてきたが、その多くは単純な血管様の管腔構造を導入することのみに限られていた。しかしながら、再生組織に血管を導入したとしても、効率的に培養液や血液を送液できなければ、再生組織の中心まで十分な酸素や栄養を輸送することができない。この問題を解決するためには、どのような血管網を導入すれば効率的に酸素や栄養を再生組織内部へと輸送することができるのか？という学術的課題を解明する必要がある。

生体内の血管網は、血管の分岐によって作られる複雑な構造によって、効率的かつ機能的な酸素と栄養の輸送機能を実現している。このことから、生体内の血管網の分岐の度合いや分岐に伴う血管の太さの変化を再現することができれば、効率的な酸素と栄養の輸送経路を再構築することができるように期待できる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では『どのような分岐構造を持つ人工血管網が、再生組織内部への効率的な酸素と栄養の輸送を実現することができるのか？』という学術的課題を解明することを目的とした。この目的を達成するためには、様々な構造の人工血管網を再生組織内部に導入する必要がある。そして、それぞれの人工血管網の構造が再生組織内部を流れる血液の流動挙動や細胞の生存率などに与える影響を明らかにする必要がある。

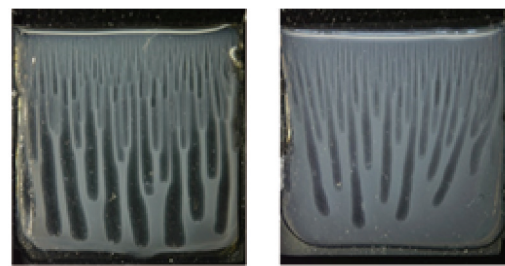
3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、図1に示されている多管構造を持つコラーゲンゲル（マルチチャンネルコラーゲンゲル：MCCG）を用いて様々な構造の人工血管網を構築する。MCCGは次のような特長を持つことが解明されている。

1. 血管や尿細管などの上皮管腔組織を迅速に構築することができる。
2. MCCGは生体模倣的な多管構造を持つ。
3. 様々な形状に成型可能である。
4. 様々な多管構造のMCCGが調製可能である。

以上の特徴より、申請者は、MCCGを用いることで人工血管網の構造が酸素や栄養の輸送機能に与える影響を効果的かつ系統的に調査することができると考えた。本研究で以下の2つの項目の研究を実施した。

(1) 図1に示されているように、MCCGを調製する際に用いるリン酸緩衝液の組成やゲル化温度を変えることでさまざまな多管構造を持つMCCGを調製することができる。この方法で調製したMCCGを鋳型として利



10°Cで調製

30°Cで調製

図1. 異なる温度で調製されたマルチチャンネルコラーゲンゲル

用することで、さまざまな構造の人工血管を構築することを試みた。具体的には図2に示されている方法で厚み2mm、幅6mm、長さ6mmのMCCGを構築し、ゲル表面の均一なゲルの膜を除去した後で、血管内皮細胞を播種することでMCCG内に人工血管を構築した。

(2) (1)で構築した人工血管網内を流れるモデル血液の流れの様子を観察することで、人工血管網の構造とモデル血液の流動特性の間の関係を明らかにすることを試みた。具体的な方法としてはHUVECや血管内皮平滑筋細胞、大動脈由来血管内皮細胞などを懸濁した培養液を調製し、MCCGの多管構造にマイクロピペットを用いて流し込んだ際の細胞の動態を観察した。

(3) 血管を流れる血流が血管新生を誘導することは古くから知られている。(1)で構築した人工血管内に培養液を還流することで、人工血管を作る細胞の血管新生機能が刺激され、MCCG内に構築された一つ一つの血管同士が新生血管を介してつながることで人工血管網が形成されることが期待できる。また、(1)構築したMCCGは厚さ1mmと分厚く、静置培養では中心部の血管を作る細胞が壊死してしまう恐れがある。したがって、構築した人工血管を培養維持しつつ、血管新生

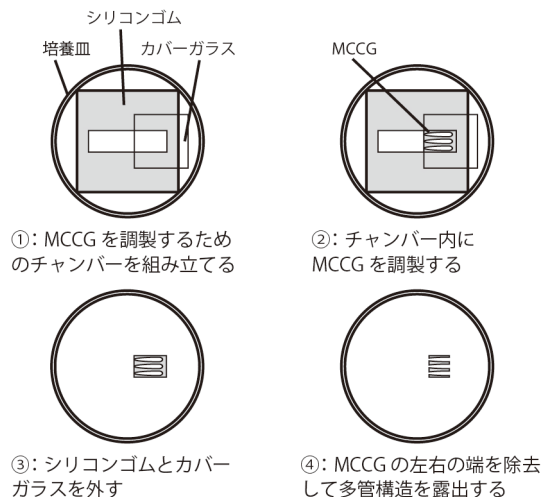


図2. 人工血管を構築するために用いるMCCGの調製方法

を維持することで人工血管網を構築するために、(1) で構築した人工血管を灌流培養する方法を確立する必要がある。そのために、(1) で確立した人工血管を、ボイデンチャンバーを設置することが可能な灌流培養チャンバーを設計し、ボイデンチャンバー内に(1) で構築した人工血管を設置することで灌流培養を行うことができるバイオリアクターを開発した。ボイデンチャンバーはポリスチレン製のパイプの一端に多孔質膜が張り付いた製品である。

4. 研究成果

(1) MCCG を用いることでさまざまな構造の人工血管網を構築する方法を確立した。当初計画よりも効率的な人工血管の構築技術の開発に成功した。MCCG の多管構造表面に血管内皮細胞を播種するためには、MCCG 表面に形成されるゲルの膜を除去する必要がある。当初計画ではこのゲルの膜をコラゲナーゼ処理により消化除去する予定であった。しかし、このことにより MCCG の力学特性が著しく低下するという問題があった。その結果、血管内皮細胞を多管構造表面に播種しても細胞がうまく接着しない問題や、細胞自身が発揮する力によって MCCG が大きく収縮するなどの問題が生じた。この問題を解決するために、メスやマイクロトームの刃などの鋭利な刃物を用いて、ゲルの膜を切断除去することを試したところ、MCCG の力学特性を低下させることなく、多管構造内表面を露出することに成功した。

(2) 上記方法で得られた MCCG に、ヒト臍帯由来静脈内皮細胞 (HUVEC) を播種して得られた試料の共焦点走査型レーザー顕微鏡像が図 3 に示されている。緑色の蛍光像が生きた HUVEC を示しており、連続した管腔構造を形成していることがわかる。この方法は、異なる多管構造を持つ MCCG に対しても有

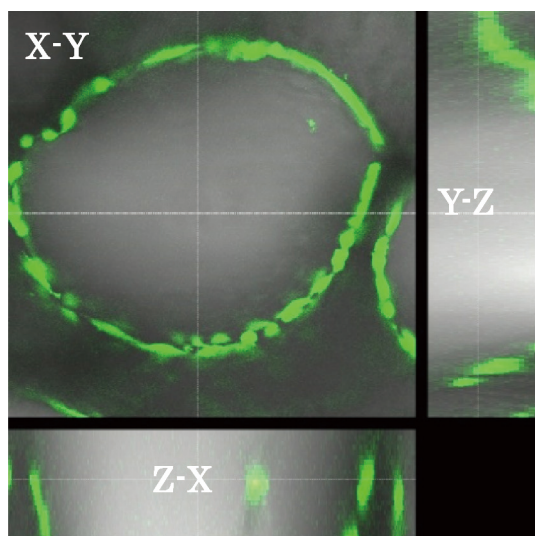


図 3. MCCG 内部に構築された人工血管。緑色の蛍光はカルセイン AM で蛍光標識された HUVEC。

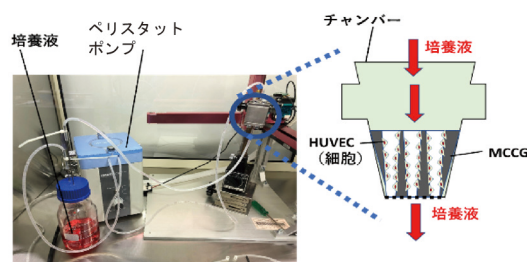


図 4. MCCG を用いて構築した人工血管の灌流培養システム

効であり、さまざまな多管構造を持つ人工血管網の構築技術を確立することにつながった。MCCG の多管構造は表面からの距離とともに管径や管の数が増える傾斜構造を持っている。MCCG を用いて構築される人工血管もこのような傾斜構造を反映した特長を維持していた。組織工学的技術を利用して人工血管を構築する試みは本研究以外にも多数報告されているが、細胞とコラーゲンといった実際の生体組織を作る素材のみで血管の傾斜構造まで再現した例は本研究以外には報告例がない。特に、血管の直径が構築した再生組織表面からの深さとともに少しずつ深くなる傾斜特性は、生体内の血管にも観察される血管のテーパー構造を再現している。血管のテーパー構造を再現することは微小流路技術や 3D プリンターなどの方法では困難であるとされており、本研究で確立された人工血管の構築技術が唯一の技術であるといえる。本技術については、本研究の目的の達成以外にも、血管のテーパー構造と血液の流動特性の相関を調べるためのモデル実験系としての利用が期待できる。

(3) MCCG の多管構造を流れる細胞懸濁液の流れの様子を観察することに成功した。最初に行った研究では、人工血管網の鋳型となる MCCG の多管構造を流れる細胞懸濁液の流動特性を評価した。細胞懸濁液を流入させたときには滞りなく細胞懸濁液が流れ、流れの様子を位相差顕微鏡で観察することもできた。

(4) 続いて、MCCG 内に血管内皮細胞を播種することにより人工血管を構築し、人工血管内に蛍光ビーズを流すことで流れの場を可視化する実験を遂行しようと試みた。しかし、(1) での説明のとおり、当初計画の方法では MCCG の力学特性が著しく低下し、そのことによって血管がつぶれてしまうことや、うまく血管構造を作れないなどの問題が生じたため実施にいたらなかった。この問題については(1) で確立した新しい人工血管の構築技術を用いることで解決できると考えている。

(5) MCCG を用いて構築した人工血管を培養維持するためのバイオリアクターを開発

することに成功した。図4に開発したバイオリアクターが組み込まれた灌流培養システムの写真が示されている。MCCGを用いて構築した人工血管はバイオリアクター内に設置されたボイデンチャンバーのメンブレン上に配置される。バイオリアクターはペリスタットポンプと液体培地入りのボトルに直列でつながれている。培養液の流速はペリスタットポンプの回転速度で制御することが可能である。本灌流培養システムを用いることで、連続的に液体培地をバイオリアクター内に流通することができることも確認した。

(6) 今後の展望として、(1)に記載の方法でさまざまな形態の人工血管を構築し、それぞれの血管を流れる蛍光ビーズや実際の血液の流動特性を評価する。このことにより効率的な流れをもたらす血管や流れの滞りを誘発する血管の構造を明らかにする。(5)で新しく開発したバイオリアクターを用いて(1)で構築した人工血管を人工血管網へと発展させ、分岐構造を持つ血管の流れの評価を実施しつつ、実質部分で培養される細胞の生存率や増殖能を評価する。このことにより、効率的な酸素と栄養の供給を実現することが可能な人工血管網の構築原理を確立する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① : Kazuki Fukao, Takayuki Nonoyama, Ryuji Kiyama, Kazuya Furusawa, Takayuki Kurokawa, Tasaku Nakajima, Jian Ping Gong, “Anisotropic Growth of Hydroxyapatite in Stretched Double Network Hydrogel” *ACS Nano*, 11, 12103-12110, 2017 (査読有り)

DOI: 10.1021/acsnano.7b04942

② : Saki Yahata, Kazuya Furusawa, Kei Nagao, Masahiro Nakajima, Toshio Fukuda, “Effects of three-dimensional culture of mouse calvaria-derived osteoblastic cells in a collagen gel with a multichannel structure on the morphogenesis behaviors of engineered bone tissues” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3, 3414-3424, 2017 (査読有り)

DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b00190

③ : Yasuyuki Maki, Kazuya Furusawa, Toshiaki Dobashi, Yasunobu Sugimoto, Katsuzo Wakabayashi, “Small-angle X-ray and light scattering analysis of multi-layered Curdlan gels prepared by a diffusion method” *Carbohydrate Polymers*, 155, 136-145, 2017 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.08.061

④ : Naoki Sasaki, Yuna Saitoh, Rajesh K. Sharma, Kazuya Furusawa, “Determination of the elastic modulus of β -lactoglobulin amyloid fibrils by measuring the Debye-Waller factor” *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 240-245, 2016 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.011

⑤ : Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Naoki Sasaki, “Development of the evaluation system for barrier functions of engineered epithelial lumens” *Regenerative Therapy*, 3, 82-89, 2016 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.010

⑥ : Takeomi Mizutani, Kazuya Furusawa, Hisahi Haga, Kazushige Kawabata, “Heterogeneous filament network formation by myosin light chain isoforms effects on contractile energy output of single cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells” *Regenerative Therapy*, 3, 90-96, 2016 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.009

⑦ : Emmanuel. C. Ossai, Yuka Tomimori, Shota Ohki, Koki Okada, Takeshi Yonekura, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki, “Morphology and properties of globular polymeric materials in the solid state: A composite material of DNA with a cationic surfactant” *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 54, 730-738, 2015 (査読有り)

DOI: 10.1002/polb.23968

⑧ : Misako Imai, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga, “Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate” *Scientific Reports*, 5, 14208, 2015 (査読有り)

DOI: 10.1038/srep14208

⑨ : Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Hiromi Machino, Saki Yahata, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, “Application of multichannel collagen gels in construction of epithelial lumen-like engineered tissues” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1, 539-548, 2015 (査読有り)

DOI: 10.1021/acsbomaterials.5b00003

[学会発表] (計15件)

① : 古澤和也, 杉山晃一「コラーゲンゲルの階層構造制御」第27回日本MRS年次大会, 2017年12月

② : 古澤和也, 芳賀永, 川端和重, 中田翔平「コラーゲン水溶液の相分離が引き起こす方向づけられた細胞遊走に関する研究」第65回レオロジー討論会, 2017年10月

③ : Kazuya Furusawa, Saki Yahata, “Construction of Engineered Bone Tissues with Complex Hierarchical Structures” IUMRS-ICAM 2017, The 15th International Conference on Advanced Materials, 2017年8月

④ : Kazuya Furusawa, Koichi Sugiyama, “Phase Behaviors of Collagen Solution” IUMRS-ICAM 2017, The 15th International Conference on Advanced Materials, 2017年8月

⑤ : 古澤和也, 土田雅之「細胞を懸濁したコラーゲン水溶液におけるゲル化と相分離の共役」第40回日本バイオレオロジー学会年会, 2017年5月

⑥ : 古澤和也, 隈本有里「多管構造を持つコラーゲンゲルを用いた細動脈様組織の構築」第40回日本バイオレオロジー学会年会, 2017年5月

⑦ : 古澤和也「三次元再生組織の形態形成過程に与えるコラーゲンゲルの階層構造の影響」第16回

日本再生医療学会総会, 2017年3月

⑧: 古澤和也, 杉山晃一「コラーゲンゲルの構造に与える塩濃度の影響についての研究」第64回レオロジー討論会, 2016年10月

⑨: Kazuya Furusawa, Masayuki Tsuchida, “Study on Deformation Kinetics of Engineered Tissues” The XVIIth International Congress on Rheology, 2016年8月

⑩: 古澤和也, 土田雅之「三次元再生組織の形態変化の動力学に与えるコラーゲンゲルの構造の影響」第39回日本バイオレオロジー学会年会, 2016年6月

⑪: 古澤和也, 土田雅之, 福井彰雅, 佐々木直樹「マルチチャンネルコラーゲンゲルを用いた三次元再生組織の構築」第63回レオロジー討論会, 2015年9月

⑫: Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, “Construction Method of Giant Engineered Tissues with Complex Hierarchical Structures” AP Biomech 2015, 2015年9月

⑬: 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹「マルチチャンネルコラーゲンゲルを用いた巨大再生組織の構築」第38回日本バイオレオロジー学会年会, 2015年6月

⑭: 古澤和也, 杉山晃一, 福井彰雅, 佐々木直樹「マルチチャンネルコラーゲンゲルの形成機構に関する研究」第38回日本バイオレオロジー学会年会, 2015年6月

⑮: 古澤和也, 福井彰雅, 佐々木直樹「マルチチャンネルコラーゲンゲルを用いた巨大再生組織の構築技術の確立」第14回日本再生医療学会総会 2015年3月

[図書] (計2件)

①: 新井健生 編著, 古澤和也第3.8節執筆担当, コロナ社, 組織工学ライブラリ 2 マイクロロボティクスとバイオの融合 三次元細胞システム設計論 (第3.8節: マルチチャンネルコラーゲンゲルを用いた三次元再生組織の構築), 2016, 141-156

ISBN: 978-4-339-07262-4

②: 土橋敏明, 喜多理王 編著, 古澤和也 Chapter 12 執筆担当, Springer, Nano/Micro Science and Technology in Biorheology: Principles, Methods, and Application Chapter 12: Control of the multiscale structure of scaffolds and its application in tissue engineering, 2015, 295-322

ISBN: 978-4-431-54886-7

[その他] (計5件)

①: Kazuya Furusawa, Masayuki Tsuchida, “Study on the effects of the hierarchical structures of collagen gels on the morphologies of engineered liver cancer tissues”, Proceedings of 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2016), 47-49, 2016 (査読なし)

DOI: 10.1109/MHS.2016.7824174

②: Masahiro Nakajima, Kei Nagao, Masaru Takeuchi, Saki Yahata, Kazuya Furusawa, Toshio Fukuda, “E-SEM CT observation of collagen scaffold cultured osteoblast cells”, Proceedings of 2016 International

Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2016), 214-215, 2016 (査読なし)

DOI: 10.1109/MHS.2016.7824240

③: Kazuya Furusawa, Masayuki Tsuchida, Saki Yahata, “Construction of Engineered Liver Cancer Tissues with Multichannel Collagen Gel” Proceedings of 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2015), 200-202, 2015 (査読なし)

DOI: 10.1109/MHS.2015.7438238

④: Sakiko Enomoto, Yuya Yajima, Yuki Watabe, Masumi Yamada, Kazuya Furusawa, Minoru Seki, “One-Step Microfluidic Spinning of Collagen Microfibers and Their Application to Cell Cultivation” Proceedings of 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2015), 210-212, 2015 (査読なし)

DOI: 10.1109/MHS.2015.7438257

⑤: Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, “Control of structure of multi-channel collagen gel beads”, Proceedings of 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2014), 260-262, 2014 (査読なし)

DOI: 10.1109/MHS.2014.7006141

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古澤 和也 (Furusawa, Kazuya)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号: 00510017