

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02423

研究課題名(和文) 機能的3次元組織構築のための統合的バイオファブリケーション

研究課題名(英文) Biofabrication of functional 3D tissues

研究代表者

田谷 正仁 (TAYA, MASAHITO)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：60144127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、可視光硬化インクとバイオプリンターを中心として、独自の3Dバイオプリンティング技術を統合的な視点から構築し、機能的な組織構築につながる技術を確立することを目的とした。可視光硬化インクとしては、フェノール性水酸基導入高分子と可視光応答光レドックス触媒を用いて、細胞の生存に影響を与えず、内部に血管様の流路を有する構造物の造形に成功した。さらに、ヒト由来脂肪幹細胞を包括したものを造形することによって、内部で細胞の増殖を達成するとともに、分化誘導して特定の細胞を含む構造体を作製可能なことを明らかにした。このようなことから、新たな3Dバイオプリンティング技術の開発に成功することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3Dバイオプリンティングは、生体外にて人工的に機能的な組織を構築するためのキーテクノロジーとして期待されている。本研究では、それに寄与する検討に取り組んだ。そして、新たに光硬化性インクを用いた細胞含有3次元構造体の構築法の開発に成功するとともに、細胞源として期待される脂肪由来幹細胞を使って、その有用性を実証した。これらは、簡単な装置や単純な手法で達成されたことから、今後さまざまな研究者に利用され、再生医療をターゲットとする組織工学だけでなく、細胞の機能などを調べる用途などにも利用されると期待される。さらに、再生医療の進展に寄与する技術の開発に成功したことから、その成功は社会的にも意義が高い。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to establish 3D bioprinting technology based on visible light curing inks and bioprinters for them for fabricating functional 3D tissue construction. As the visible light curing ink, we used polymers possessing phenolic hydroxyl moieties. Visible light responsive photoredox catalyst was used for inducing hydrogelation. We succeeded in fabrication of 3D hydrogel constructs including cells and a blood vessel-like perfusable structure without affecting the survival of cells. Furthermore, it was revealed that it is possible to achieve proliferation of cells in the hydrogel constructs as well as differentiation induction from human adipose-derived stem cells. As such, we were able to succeed in developing a new 3D bioprinting technology.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオプリンティング 組織工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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、多孔体の鋳型に、細胞分散溶液を流し込み、目的の形状の3次元組織体を得るものである。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できず、細胞が適材適所に配置され各種機能を発揮す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方式やプロッター方式により粒子状や線状に目的箇所に吐出、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。印刷技術の進歩は装置とインクの進化で達成されるため、バイオプリンティングの進化には、目的とする構造体の造形を可能とするためのプリンターの進歩と細胞の生存に影響を与えることなく迅速にゲル化し、細胞の増殖・機能化・組織化を誘導するインクの進化が不可欠である。細胞の機能化や組織化は周囲材料との細胞毎に異なる相互作用の制御により促進できることを考慮すると、細胞毎にその機能をチューニングされたインクを用いることは、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、個々の細胞が増殖し組織体を形成する上では、必要なタイミングで除去可能なゲルを形成することも重要である。さらに、細胞の生存に必要な酸素や栄養分を供給するためのライフラインとなる血管様の培養液流路も組み込む必要がある。個々の要素技術に関する研究は数多くされているが、バイオプリンターおよびそのインクの開発も含めて、それらの要素を全て包含する統合的な観点からの組織構築技術の開発に関する検討は皆無である。

2. 研究の目的

バイオプリンターを用いた3次元組織体の作製は、既存の技術では不可能であった高精度での細胞配置を可能とすることなどから、より機能的な組織体の構築につながる技術として期待されている。本研究では、生物化学工学、バイオマテリアル、メカトロニクス、薬物動態研究の異なる分野の研究者が結集し、新たに開発する独自の可視光硬化インクとバイオプリンターにより、これまでに申請者が開発してきた、組織工学に関する要素技術（細胞機能発現促進のための基材デザイン、ゲル分解による微小組織体作製、血管様流路を含む組織体作製）を連結することで、統合的な視点からの機能的3次元組織構築技術の開発につながる技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 可視光硬化インクの開発

従来広く採用されてきた紫外光を照射してヒドロゲルを形成させるやり方では、細胞のDNA損傷が危惧される。そこで、可視光応答光レドックス触媒を使った、フェノール性水酸基含有高分子水溶液のヒドロゲル形成を調べた。具体的には、トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)ジクロリド六水和物（ルテニウム錯体、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）および犠牲剤として過硫酸ナトリウム（SPS）の存在下において、可視光を照射した場合の、ゲル化特性、ゲルの強度、ゲルに包括する細胞への影響を調べ、バイオプリンティングに適用可能な条件を調べた。

(2) 可視光硬化インクを使った3Dバイオプリンティング

(1)の検討で見出した条件に基づいて、押し出し方式とプロジェクタを使ったステレオリソグラフィ方式の2つのプリンターで、細胞含有3次元構造物のプリンティングを行った。この際に、アルギン酸、ヒアルロン酸、ゼラチン、キトサン、カルボキシメチルセルロースなどの誘導体を用いて、内部に含まれる細胞の増殖を考慮したバイオインク組成の探索を実施した。また、さまざまな細胞に分化することが可能なヒト脂肪由来幹細胞を包括した構造物をバイオプリンティングし、その幹細胞性の維持および分化能に関する評価を行った。さらに、血管様流路を有する構造物の造形にも取り組んだ。

(3) 過酸化水素を含む空気中での西洋わさび由来ペルオキシダーゼを使ったバイオプリンティング技術の開発

可視光によるゲル化のみで無く、統合的なバイオプリンティング法の開発の視点から、西洋わさび由来ペルオキシダーゼによるフェノール性水酸基間の結合形成反応を利用するプリンティング法の開発を行った。この検討では、連続的に構造物の造形を可能とするという視点から、細胞およびフェノール性水酸基を含む高分子水溶液をインクとして押し出し方式のバイオプリンターから、反応の進行に必要な過酸化水素を含有させた空気中に吐出することを試み、良好な造形に必要な、押し出し速度やインク粘度について検討した。また、血管様の流路を有する構造体のプリンティングにも取り組んだ。

(4) インクジェットバイオプリンターを用いた微小組織の構築

インクジェット方式のバイオプリンターは、他の方式のプリンターと比較して、微小な構造物をプリントできる長所がある。これを活かして微小な組織を構築するために、多糖のヒドロゲル基板上に細胞が接着できる領域をプリントし、細胞を増殖させた後に多糖ヒドロゲル基板を分解する方法の開発を行った。具体的には、多糖のヒドロゲルとしてアルギン酸から得られるゲルを用い、その上にゼラチン誘導体のパターンを印刷して細胞を増殖させた後、アルギン酸分解酵素であるアルギン酸リアーゼで処理をした。

4. 研究成果

(1) 可視光硬化インクの開発

いくつかの候補の中から、図 1a に示す反応が最も扱いやすいことがわかった。そこで、アルギン酸にフェノール性水酸基を導入した材料を溶解させた水溶液に、ルテニウム錯体および SPS を溶解し、室内蛍光灯下に置いたところ、15 分程度でゲルを形成させることに成功した (図 1b)。次いで、この反応をバイオプリンティングに用いるために不可欠な、ゲル化時間の制御およびその短縮に関して検討を行った。その結果、図 2 に示すように、ルテニウム錯体、SPS および可視光の強度 (452 nm の光強度) を操作することによって、ゲル化時間を制御可能であり、10 秒程度で水溶液をゲル化することができる条件を見出すことができた。さらに、この見出した条件に基づいてアルギン酸誘導体のゲルにマウス繊維芽細胞 (10T1/2 細胞) を包括したところ、アルギン酸の性質により細胞がゲル内で伸展することはなかったが、生存率は 1 週間の間 90% 以上を維持していた。すなわち、細胞の生存に影響を与えることなく、可視光の照射によって細胞を含むヒドロゲルを得ることに成功した。

(2) 可視光硬化インクを使った 3D バイオプリンティング

市販のビジネスプロジェクターを光源として用いたステレオリソグラフィー方式によるプリンティングを試みた。その結果、光を照射したインク中での光の散乱により、当初は図 3b のように設計図とは大きく異なる形状のゲルしか得ることができなかった。しかし、光吸収剤として食品添加物としても使用されているアシッドレッド (Acid red) を適量添加することで、大きく造形性を向上させることができ、設計図通りの 3 次元構造物を作製することができた (図 3c)。また、アシッドレッドの添加によって、細胞の生存に大きな影響を与えることがないことも見出した。さらに、血管様流路を構築するために、図 4 に示す設計図を作成し、らせん状の流路を含むゲル構造物の造形を試みたところ、内部に溶液を流通可能な構造を有する構造体の構築を達成することができた。この成果は、朝日新聞などのメディアで紹介された。

さらに、フェノール性水酸基を導入したヒアルロン酸とゼラチンの誘導体の水溶液にヒト脂肪由来肝細胞を分散し、押し出し式プリンタを用いたバイオプリンティングを試みた。その結果、この細胞の生存もほとんど損なうことなく造形可能であることを実証することができた。また、それぞれの高分子の含有量を操作することで、幹細胞性の維持に関わる、Nanog、Oct4、Sox2 の遺伝子発現の程度が変化し、ヒアルロン酸誘導体の含有量を上げることで、それらの発現が向上することを見出した (図 5)。さらに、幹細胞性を維持したまま、ゲル構造物の内部でほぼ均一な分布で増殖させることができるため、一定期間の培養後に分化誘導培地に切り替えることで特定の細胞に分化させることにも成功した。この結果に関しては、論文を掲載し

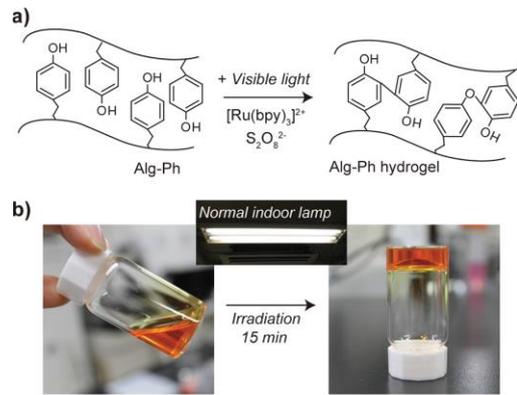


図 1. a)有効性を実証したゲル化方法、b)室内用蛍光灯下に静置して得られたゲル。

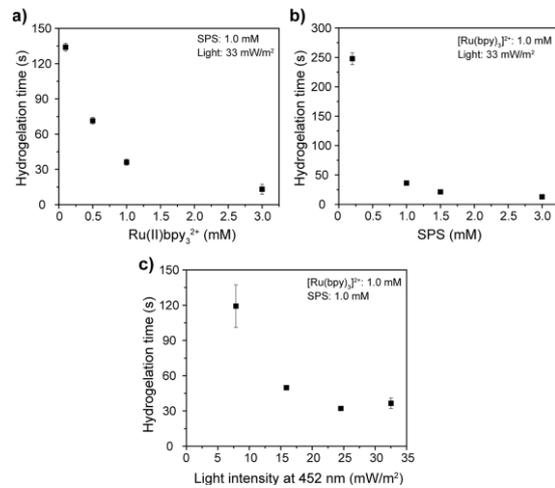


図 2. a)Ru 錯体濃度、SPS 濃度および c)光強度がゲル化時間に与える影響。

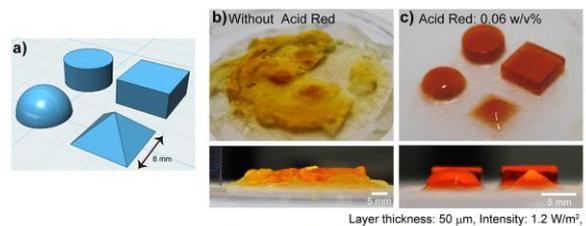


図 3. a)設計図に基づいて、b)acid red を含まないもしくは c)含むインクで造形した構造物。

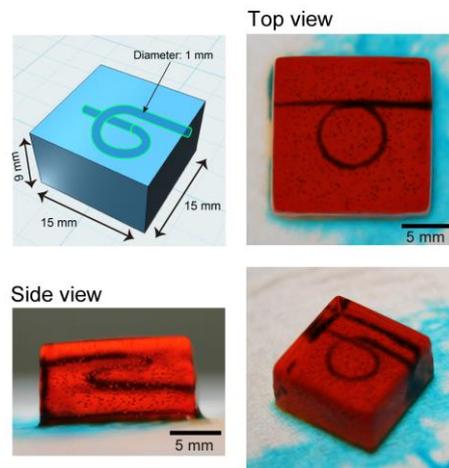


図 4. らせん状の血管様流路を有する構造物。

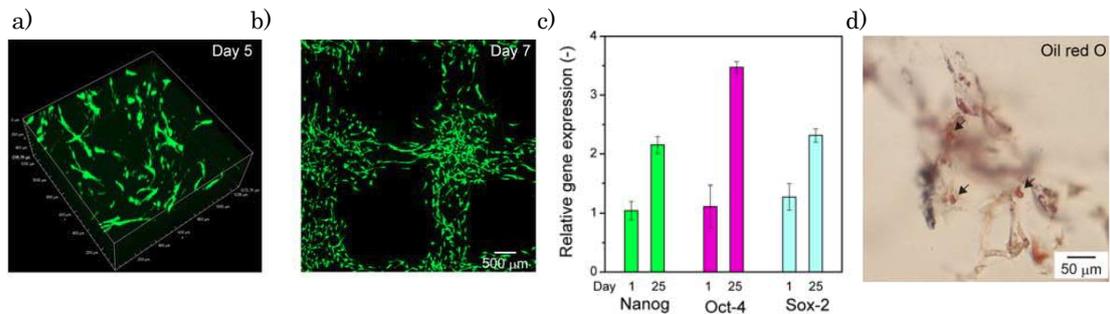


図 5. a, b) ヒト脂肪由来肝細胞がプリントされた構造物の内部で増殖する様子、c) 培養期間 1、25 日目の幹細胞マーカー遺伝子の発現、および d) 脂肪分化培地で培養することで脂肪細胞に分化した細胞。

た雑誌の 2017-2018 年度の最も読まれた論文上位 20 位以内に入った。

以上より、可視光硬化インクを使った 3D バイオプリンティング法の開発に成功し、幹細胞を使った組織工学に適用できることを実証することができた。

(3) 過酸化水素を含む空気中での西洋わさび由来ペルオキシダーゼを使ったバイオプリンティング技術の開発

西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応により得られるゲルは、上の検討で使用したフェノール性水酸基を導入した高分子を利用できるのと同時に、生体などへの適用を考えた場合に、残留する金属錯体の生体への影響を考慮する必要がないといった長所がある。一方で、反応に必要な過酸化水素を供給するための方法に問題があった。そこで新たに、図 6 に示すように、気相から過酸化水素を供給する方法を開発し、それを用いた 3D バイオプリンティングに成功した。この方法で得られる構造物中にマウス線維芽細胞 (10T1/2 細胞) を包括したところ、ゼラチンを適量含有させることで、増殖させることに成功した。さらに、アルギン酸誘導体のインクを加えた 2 種類のインクからプリンティングを行った後、アルギン酸分解酵素アルギン酸リアーゼを含む培養液に浸すことで、アルギン酸誘導体からなる部分のみを選択的に分解することに成功し、任意の内部中空構造を有する構造体の構築に成功した。また、この方法で得られるゲル構造物は、場溶液の中でも高い安定性を有することを実証することができた。用途毎に適したインクの検討も行った結果、ポリビニルアルコールをベースとするインクを用いて、長さ 2 倍程度の引っ張りにも耐えることのできる極めて高い耐変形性を有する構造物のプリントも行うことができた。このようにさまざまな材料からプリントが可能であることは、今後、より多くのインクを同時に使用することのできるプリンタを開発すれば、複雑な構造や局所的に強度の異なるような、これまでの技術では難しかった 3 次元構造物の構築ができるようになるかと期待される。

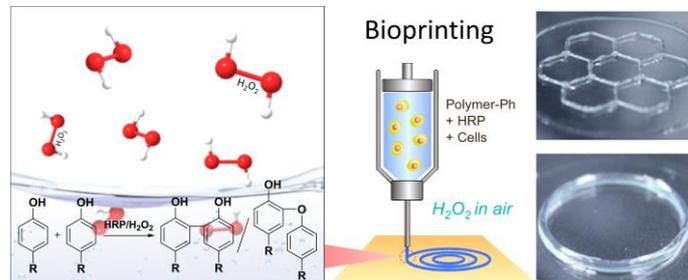


図 6. 開発に成功した気相から供給する過酸化水素を使ったバイオプリンティング法の模式図と、それにより得られたゲル構造物。

(4) インクジェットバイオプリンタを用いた微小組織の構築

インクジェット式プリンタを使った 3 次元組織作製に関する検討として、細胞の接着、非接着領域を高精度に作り分け、接着領域でのみ細胞を培養してディスク状や、繊維状に増殖させた。その後、アルギン酸の分解酵素で基板を分解することで、微小な組織体を作製することに成功した。今後、他の方式のバイオプリンティングとの融合を試み、より複雑な組織の構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ① Sakai S, Ohi H, Hotta T, Kamei H, Taya M; Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatinbased bioink through microextrusion and visible light-initiated crosslinking, *Biopolymers*, 109; e23080 (2018). (査読有り)
- ② Sakai S, Kamei H, Mori T, Hotta T, Ohi H, Nakahata M, Taya M; Visible Light-Induced Hydrogelation of an Alginate Derivative and Application to Stereolithographic Bioprinting Using a Visible Light Projector and Acid Red, *Biomacromolecules*, 2018:672-679 (2018). (査読有り)
- ③ Mir TA, Iwanaga S, Kurooka T, Toda H, Sakai S, Nakamura M; Biofabrication offers future hope for tackling various obstacles and challenges in tissue engineering and regenerative medicine: A Prospective, *International Journal of Bioprinting*, 5:1-7 (2018). (査読有り)
- ④ Sakai S, Mochizuki K, Qu Y, Mail M, Nakahata M, Taya M; Peroxidase-catalyzed microextrusion

bioprinting of cell-laden hydrogel constructs in vaporized ppm-level hydrogen peroxide, Biofabrication, 10:045007 (2018).

- ⑤ Khanmohammadi M, Sakai S, Taya M; 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, 97:308-316(2017). (査読有り)
- ⑥ Sakai S, Ueda K, Gantumur E, Taya M, Nakamura M; Drop-On-Drop Multimaterial 3D Bioprinting Realized by Peroxidase-Mediated Cross-Linking, Macromolecular Rapid Communications, 39:1700534 (2017). (査読有り)

[学会発表] (計 37 件)

- ① 望月佳, 境慎司, 中畑雅樹, 田谷正仁; 微量の過酸化水素を含む空気と HRP を用いた微量押し出し式 3D-Bioprinting 技術の開発, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 (2017).
- ② 境 慎司, 望月佳, 田谷正仁; 過酸化水素蒸気中での酵素による架橋形成反応にもとづく 3D バイオプリンティング技術の開発, 化学工学会 第 83 年会 (2018).
- ③ Ohi H, Sakai S, Taya M; Bioprinting of human adipose stem cell-laden hyaluronic acid/gelatin-based hydrogel constructs through micro-extrusion and visible light-irradiation, 2017 International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (ISOMRM) (2017).
- ④ Kamei H, Mori T, Sakai S, Taya M; Visible light induced alginate-based hydrogel formation catalyzed by ruthenium complex and application to 3D printing, 2017 International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (ISOMRM) (2017).
- ⑤ Gantumur E, Sakai S, Taya M; Cell encapsulation in microparticles by inkjetting and enzymatic cross-linking, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC) (2016).
- ⑥ Khanmohammadi M, Sakai S, Taya M; Enzymatic immobilization of low molecular weight hyaluronic acid in gelatin hydrogel: A strategy to promote endothelial cell migration, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC) (2016).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 3D プリンティングシステム用インク

発明者: 境慎司、吉井彩乃、永砂修、堀井和輝

権利者: 国立大学法人大阪大学, ながすな繭株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2019-57397

出願年: 2019

国内外の別: 国内

○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/sakailabo/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 境 慎司

ローマ字氏名: SAKAI SHINJI

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 基礎工学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20359938

研究分担者氏名: 松永 民秀

ローマ字氏名: MATSUNAGA TAMIHIDE

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 薬学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40209581

研究分担者氏名：小嶋 勝

ローマ字氏名：KOJIMA MASARU

所属研究機関名：大阪大学

部局名：基礎工学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：00533647