

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14284

研究課題名（和文）迅速な三次元組織体の構築を実現するための形状記憶造形法の開発

研究課題名（英文）Shape-memory building for rapid construction of 3D artificial tissue

研究代表者

中畑 雅樹（Nakahata, Masaki）

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：40755641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、三次元組織構築のための新たな足場材料として、細胞の共存下での自在変形・形状記憶および使用後の分解が可能なヒドロゲル材料の開発を目指し、二年間の研究に取り組んだ。一年目は、基盤材料となるヒドロゲルの材料設計を行い、マイルドな化学刺激として糖を用いて形状記憶可能な材料の開発に成功した。二年目は、自在変形性と細胞適合性、分解性を兼ね備えた材料設計の最適化を行い、実際に材料を自在変形させながらの培養および培養後の分解を、それぞれ細胞の生存下で行うことに成功した。これにより、開発した材料を用いた三次元組織構築のための土台となる材料設計を新しく提案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療・組織工学分野では、細胞を立体的に配置した三次元組織を構築するために、足場材料をできるだけ短時間で正確に造形し、適切なタイミングで分解することが求められる。現在の主流である積層造形法では造形に時間がかかり、サイズに制限があった。そこで本研究では、自在に変形し一時形状を固定可能な材料を用いて「折り紙」式に三次元組織を形成し、形成後に材料を分解することで三次元組織を得る「形状記憶造形」を提案し、そのための第一歩として基盤となる足場材料の開発に取り組んだ。これが実現すれば、生体外での人工臓器・組織構築法の新たな選択肢となり、社会に対する大きな波及効果が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：In this two-year research, we aimed to develop a new scaffold material for three-dimensional tissue construction: a hydrogel material capable of free deformation, shape memory and degradation after use in the presence of cells. In the first year, the material design of the hydrogel as a base material was carried out, and a shape memory material was successfully developed using sugar as a mild chemical stimulus. In the second year, we optimized the design of materials with free-deformability, cytocompatibility, and degradability. We also succeeded in culturing cells on the materials while free-deforming the material and degrading it after culturing cells under cytocompatible conditions. This allowed us to propose a new material design that would serve as a foundation for the construction of a three-dimensional structure using shape-morphing materials.

研究分野：高分子科学

キーワード：再生医療 三次元組織構築 ヒドロゲル 自在変形 適時分解

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器移植に代わる医療として、再生医療・組織工学分野では、細胞を立体的に配置した人工臓器・組織形成法の開発が喫緊の課題である。これまで三次元造形のために主に用いられてきた手法は、零次元(点:細胞そのものや細胞包括ビーズ、カプセル) / 一次元(線:細胞包括ファイバー、チューブ) / 二次元(面:細胞シート)のように、次元の低いビルディングブロックをボトムアップ的に積み上げるというものである。このような方法では、一層一層を積み上げていくために造形時間が長く、一般的には「1cmの厚みを造形するのに1時間」と言われていた。また、大きく(長さ数十cm)柔らかい(弾性率<1kPa)組織(例として肺)の造形においては、重力による構造物の変形が避けられず、設計通りの造形を行うことが困難である(図1)。さらに、細胞のみからなる三次元組織を得るためには、細胞足場材料を造形後に分解する必要がある。このように要求される特性の多さが当該分野の発展を阻んでいた。それぞれの解決に寄与する方法は個々に報告されてきたが、全てを満たす方法は代表者の知る限り報告されていない。「如何にして臓器サイズの柔らかい三次元組織を簡便に短時間で造形し、造形後に分解するか」という問いに答えるブレークスルーが求められていた。

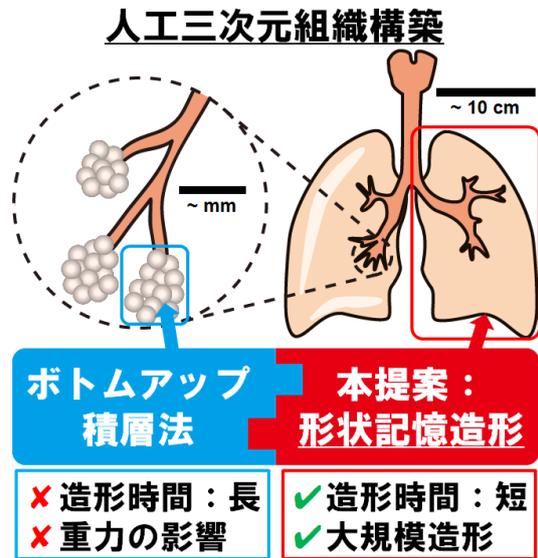


図1. 人工三次元組織構築の現状と本研究提案の目指すところ。

2. 研究の目的

本研究では、これに対する解決策として、分子間相互作用により形成された自在変形ヒドロゲルを用いた造形法を提案する。これは、「①自在変形ヒドロゲル内やヒドロゲル上で細胞を培養し、②細胞を増殖させた後に③「折り紙」方式で組み上げた形状を維持し、④ヒドロゲルのみを分解することにより細胞のみからなる三次元構造体を得る(図2)」方式による造形法である。一層一層を積み上げる造形法と比較して格段の生産性向上を図り、全てのプロセスを水溶液中で行うことで重力による構造物の変形を軽減させることにより、現状の問題を一挙に解決することを目指した。

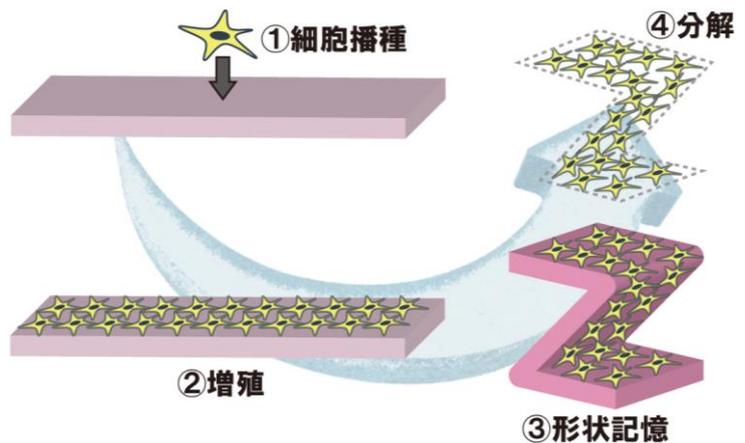


図2. 「形状記憶造形」の概念図。

形状記憶材料と細胞との関連研究として、材料表面に細胞を配列させるためのパターン形成^[1]などが行われてきたが、温度や光等によるバルク高分子材料の相転移を利用したものが主であり、細胞共存下で形状記憶可能なヒドロゲルの報告例は少ない^[2,3]。さらに、本研究の問いを解決するために必要な「細胞を内包した状態で形状記憶・分解可能なヒドロゲル」は全く報告されていない。本研究では、代表者独自の技術である可逆的な分子認識により架橋された高分子材料に端を発し、高分子に可逆的な結合部位を複数種類組み込むという材料設計により、細胞培養を行え、細胞に対して温和な刺激で形状記憶可能であり、さらには組織形成後に分解可能性までも付与された材料の創製に挑戦した。これにより、「形状記憶造形」を生体外での人工臓器・組織構築法の新たな選択肢として取り入れ、臓器移植に代わる医療として期待されている再生医療技術、ひいては社会に対する大きな波及効果を及ぼすことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 基盤材料の開発

まずは本研究の基盤材料となる、形状記憶を行える高分子ヒドロゲルの開発を目指した。生体高分子、あるいは生体適合性合成高分子を、①動的結合-解離のタイムスケールが比較的長い架橋として機能する分子間相互作用、②動的結合-解離のタイムスケールが比較的短いあるいは調整可能であり、一時的な架橋として機能する分子間相互作用、の二種類で架橋することにより形状記憶ヒドロゲルを得ることとした。架橋①と②については生体に対して毒性の無い分子をトリガーとして結合-解離を制御でき、互いに影響を及ぼさない分子間相互作用を選択した。架橋①により材料全体としての形状が保たれ、架橋②に対して競争的に相互作用する分子を含む水

溶液に浸漬することで一時的な架橋が組み換わり、形状が一時的に記憶される(図3左)。架橋の種類や導入量によって材料の力学物性を自在に制御できることを明らかにし、さらに架橋①と②をどちらも脱架橋することでゲルが分解できること(図3下)を目指した。

(2) 細胞足場材料としての応用

基盤材料を用いて細胞を含む三次元組織構築を行うために、材料の細胞適合性、接着細胞に対する接着性など、足場材料として必要な性質を評価した。細胞の共存下で自在変形や材料の分解を行い、細胞に影響なく足場材料の操作が可能であるかを確かめた。材料上に細胞を接着、増殖させた状態で自在変形、形状記憶を行い、その後材料を分解することで細胞および細胞外基質のみからなる三次元組織を得ることを目指した。

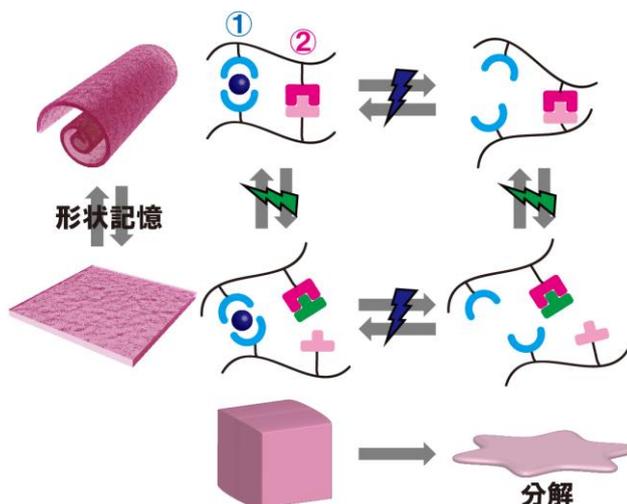


図3. 本研究で開発する自在変形・分解性ゲル。

4. 研究成果

(1) ゲルの合成、キャラクターゼーション

アルギン酸に3-アミノフェニルボロン酸を修飾した Alg-3APBA を合成した。Alg-3APBA とポリビニルアルコール(PVA) の水溶液を混合後、 Fe^{3+} または Sr^{2+} イオンを含む水溶液に浸漬することでヒドロゲルを調製した。ゲルの力学特性を、動的粘弾性測定により評価した。Alg-3APBA と PVA 水溶液の混合により粘度が上昇し、引き続き金属イオンによる架橋により系が完全にゲル化したことが動的粘弾性測定により確かめられた(図4)。また、糖を刺激としてゲルの弾性率を変調することができ、ボロン酸との相互作用の強さや濃度に応じてゲルの硬さを制御することができた。

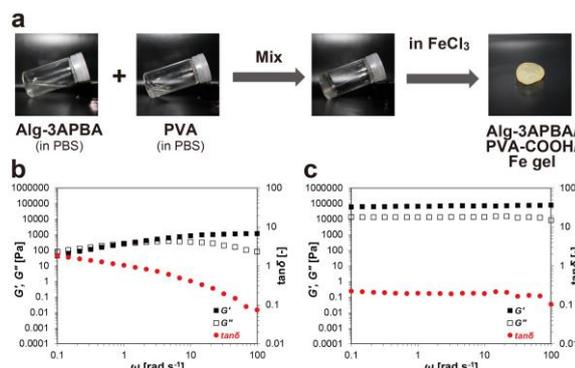


図4. 二種類のポリマーの混合による架橋形成と金属イオンによる架橋の導入によるヒドロゲル形成。

(2) ゲルの自在変形性

得られたゲルを、ボロン酸に対して強く結合する糖であるフルクトースを含む水溶液中に浸漬し、ゲルの形状を一時的に固定した。この状態でフルクトースを含まない水溶液に浸漬しフルクトースを洗浄するという簡便な操作によりゲルを自在に変形させることができた(図5a)。 Fe^{3+} により架橋したゲルと比較して、 Sr^{2+} により架橋したゲルは自在変形性が良好であった。

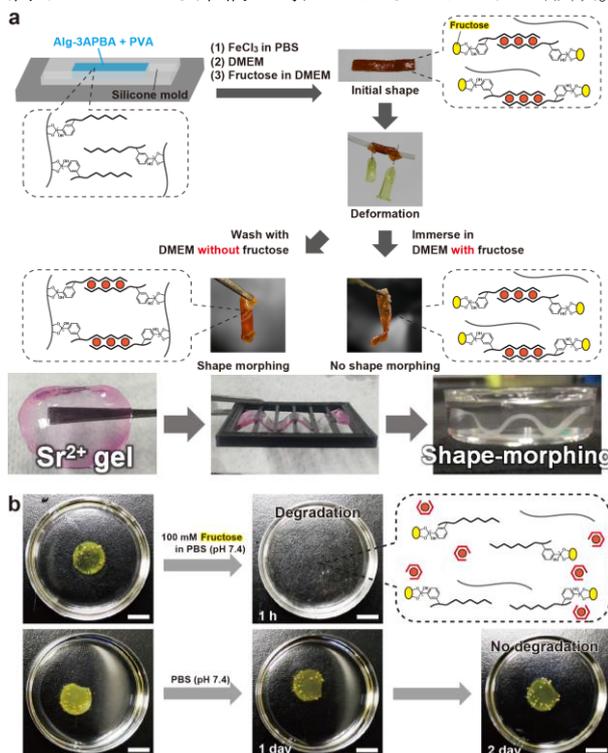


図5. (a) 糖を刺激として用いたゲルの自在変形性および (b) 架橋の分解によるゲルの分解性。

(3) ゲルの分解性

ゲルを構成する高分子間の架橋を阻害するために、フルクトース、金属イオンキレート剤を含む水溶液中にゲルを浸漬し、分解性を評価した。フルクトースおよびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を作用させることでゲルを完全に分解することができた(図5b)。 Fe^{3+} を用いた場合は完全分解に100 mM程度のEDTAを要した。これは多くの細胞にとって有害な条件であるため、この条件をそのまま細胞共存下での実験に適用することはできない。これに対し、 Sr^{2+} を用いた場合は、より細胞に対して害の少ない条件でゲルを完全分解することができた。

(4) ゲルの細胞適合性、細胞の動態評価

細胞培養用培地に浸漬したゲルに必要な応じて適切な細胞接着処理を施し、ゲルシートの片面上に線維芽細胞あるいは筋芽細胞を播種し、接着・増殖を評価した。フルクトースの添加・除去によりゲルを自在変形させ、細胞の動態を評価した。 Fe^{3+} を用いて架橋したゲルは、それ自体細胞接着性を有しており^[4]、ゲル上での細胞の接着・伸展・増殖が可能であった(図6)。 Sr^{2+} にて架橋したゲルは、それ自体では細胞接着性を持たなかったため、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) による酵素反応を用いて架橋可能なゼラチン誘導体^[5]をゲル上にコーティングしたところ、ゲルの自在変形性を損なわずに表面への細胞接着性を付与することができた。

さらに、細胞接着後にゲルを変形・形状記憶させることが、細胞の生存を損なうことなく可能であった(図7a)。また、細胞接着性コーティングを施した足場材料を細胞の共存下で分解したところ、細胞およびコーティング部分のみからなるシート状組織を得ることができた(図7b)。ゲルの変形に従って細胞の配向が制御できる可能性も示唆されており、実際にこれを積み上げた様々な三次元組織体の作製について、研究期間終了後も継続して検討を重ねている。

以上のように、本研究期間内で、糖をマイルドな刺激とした自在変形による細胞動態の制御に向けたヒドロゲルの設計指針を示すことができ、実際に細胞に対して温和な条件下で自在変形や足場の分解が可能であることが示唆された。今後はこれを応用して、当初の目標であった厚みのある三次元組織の構築に向けて引き続き取り組んでいく。また、材料と生体との「対話」を実現するために、細胞や組織の状態に応じてゲルの性質を動的に変化可能なシステムへと展開していく。

<引用文献>

- [1] M. Ebara, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 014804 (2015).
- [2] W. Nan *et al.*, *Soft Matter* **9**, 132 (2013).
- [3] H. Meng *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.* **36**, 533 (2015).
- [4] I. Machida-Sano *et al.*, *Biomed. Mater.* **4**, 025008 (2009).
- [5] S. Sakai *et al.*, *Biomaterials* **30**, 3371 (2009).

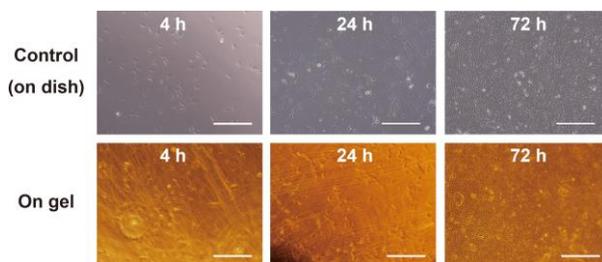


図 6. Fe^{3+} により架橋したゲル上での細胞接着・進展・増殖の様子。

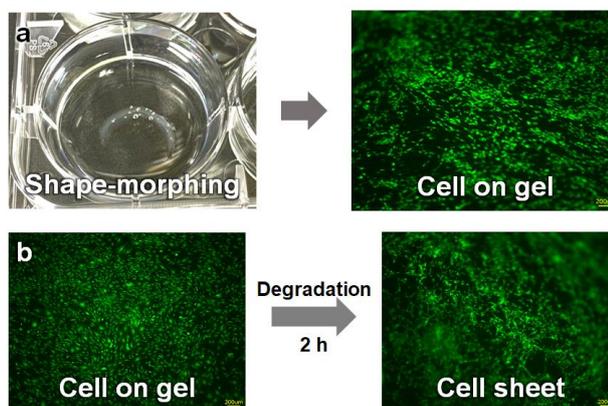


図 7. (a) Sr^{2+} により架橋し細胞接着コーティングを施したゲル上で自在変形しながら細胞を培養した様子、(b) 培養後に材料を分解した後の様子。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Motomu Tanaka, Masaki Nakahata, Philipp Linke, Stefan Kaufmann | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Stimuli-responsive hydrogels as a model of the dynamic cellular microenvironment | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Polymer Journal | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-020-0353-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Masaki Nakahata, Shinji Sakai | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Cross Linking Building Blocks Using a “Boronate Bridge” to Build Functional Hybrid Materials | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 ChemNanoMat | 6. 最初と最後の頁 141-151 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnma.201800534 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 中畑 雅樹 | 4. 巻 96 |
| 2. 論文標題 機能性ヒドロゲルの最前線 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 生物工学会誌 | 6. 最初と最後の頁 271-271 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 中畑雅樹, 境慎司, 田谷正仁 | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 細胞や生体に穏和なゲル形成とその利用法 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 中畑雅樹, 前田純貴, 武藤祐奈, 田谷正仁, 境慎司 |
| 2. 発表標題 糖により制御可能な自在変形ヒドロゲルの設計と細胞培養基材への応用 |
| 3. 学会等名 第68回高分子討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 武藤祐奈, 中畑雅樹, 境慎司 |
| 2. 発表標題 糖により制御可能な自在変形ヒドロゲルの設計と細胞培養基材への応用 |
| 3. 学会等名 化学工学会姫路大会2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中畑雅樹, 前田純貴, 境慎司, 原田明, 田谷正仁 |
| 2. 発表標題 二種類の可逆的な架橋により形成された形状記憶ヒドロゲルの細胞培養基材への応用 |
| 3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 中畑雅樹 |
| 2. 発表標題 分子間相互作用を利用した高分子材料の機能創発 |
| 3. 学会等名 材料化学システム工学討論会2018（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中畑雅樹, Marcel Hoerning, Philipp Linke, 山本暁久, Mariam Veschgini, Stefan Kaufmann, 高島義徳, 原田明, 田中求 |
| 2. 発表標題 可逆的な分子間相互作用を利用したメカノバイオマテリアルの開発 |
| 3. 学会等名 第66回高分子討論会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中畑雅樹, 境慎司, 田谷正仁, 高島義徳, 原田明, 田中求 |
| 2. 発表標題 可逆的な分子間相互作用によりチューニング可能な材料上での細胞動態制御 |
| 3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中畑 雅樹 |
| 2. 発表標題 生体分子認識を基盤とした生体構成要素と対話・融合する高分子材料の開発 |
| 3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|