

令和 2 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19941

研究課題名（和文）チキソトロピー性セルロースナノファイバーゲルを基盤とした生体組織作製系の創成

研究課題名（英文）Development of effective fabrication system for three-dimensional tissues based on thixotropic cellulose nanofiber gel

研究代表者

武田 直也（Takeda, Naoya）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60338978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：セルロースから作られる太さナノメートル、長さマイクロメートルのスケールの極微細繊維材料（セルロースナノファイバー、CNF）をゲル状態とした基盤材料について、構造ならびに粘性や弾性、また、力をかけると流動的なゾルとなり力から解放すると可逆的にゲルになるチキソトロピー性と呼ばれる基礎物性を詳細に解析した。さらに、独自開発した微小な装置で、CNFゲルを太さ百マイクロメートル、長さ数十センチメートルの長大な形状に加工し、この中に細胞を包埋して培養し分化・成熟させることで長大で立体的な筋組織と血管組織の構築を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲル状態にもなれる（乾燥状態でも使える）CNFは日本で開発された機能性材料であり、学界および産業界で用途開発が精力的に研究されている。これまでは強度向上などを目的に、他の材料に混ぜられて使用するなどが主だった。しかし本研究ではCNFゲル単独の材料用途として、新たにバイオテクノロジーの分野での有用性を示した。特に今後の発展が望まれる再生医療分野への応用である。この成果は学術的意義のみならず、CNF市場の拡大など社会的意義も非常に高い。

研究成果の概要（英文）：TEMPO-oxidized cellulose nanofibers (CNF) are extremely fine fibrous materials derived from cellulose. Its scale is nanometer in diameter and micrometer in length. It can reversibly form hydrogel without mechanical force and becomes fluidic sol when pressurized; these phenomena are called thixotropy. In this study, the micro/nano structures, viscoelasticity, and thixotropy was precisely analyzed to clarify the characteristics of the CNF gel materials. Furthermore, a very long fiber-shaped cell culture scaffold (hundred micrometers in diameter and tens of centimeters in length) of the CNF gel was prepared using an originally developed micro fluidic device. Cells were successfully embedded, stably retained, and effectively cultured in the CNF gel. Differentiation and fabrication of long and three-dimensional skeletal muscle tissue or luminal blood vessel was also successfully achieved by culturing each cell type in the fiber-shaped CNF gel scaffold.

研究分野：バイオマテリアル、高分子科学、細胞・組織工学、マイクロナノ・バイオテクノロジー、ソフト界面

キーワード：セルロースナノファイバー ハイドロゲル チキソトロピー性 三次元培養 三次元組織作製 マイクロ流体デバイス 筋 血管

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、移植可能な再生組織や薬剤評価に利用できるモデル組織の需要が高まっており、中でも筋肉や血管は多くの組織・臓器の機能維持に不可欠な部品であるため、構築方法の確立が強く望まれている。複雑な生体組織を倫理的問題なく生体外で構築するには、バラバラの複数種・多数の細胞を、三次元的に精緻に位置を制御して集積し、成熟・分化させる必要がある。筋肉(骨格筋)は細長い筋繊維(筋管)の束であり、血管は多層の管腔状構造を持つため、その構築には細胞・組織を配向でき、層状に配置できる長大な培養場が求められる。

これら長大で複雑な組織構築に最適な培養場として、直径百 $\mu\text{m}$ スケールで長さは数十 cm 以上のファイバー形状をもち、形状維持を担う外層と細胞担持を担う内層の同軸二層のハイドロゲル(ゲルファイバー)の培養場が期待されている。このハイドロゲルの作製には三次元層流を安定に送液できるマイクロ流体デバイスが有用である。さらに内層の材料としては、優れた細胞担持能を有しかつ、デバイス内の送液時には流動性のあるゾルとなり静置培養時にはゲル化する機能材料が必要となる。これまでの細胞担持には、一般の培養にも頻用される、培養温度でゲル化する細胞外基質由来のアテロコラーゲンを用いてきたが、細胞担持能が低く、細胞凝集塊を生じる問題があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、我が国で開発され、植物由来で生体適合性が期待でき、チキソトロピー性と高いアスペクト比(直径数 nm、長さ数 $\mu\text{m}$ )の TEMPO 酸化セルロースナノファイバー(CNF)ハイドロゲルを、細胞の担持・培養層に採用した。チキソトロピー性によりデバイス内での送液時の加圧でゾル化するが、射出されて圧力が解消した後はゲル化して細胞を担持できることを期待した。マイクロ流体デバイス研究でチキソトロピー性材料を用いた例はなく、一般的には非細胞接着性とみなされる多糖の誘導体である CNF を培養場に用いた例もほぼない。むしろ CNF は、強度向上などを目的に、他の材料に混ぜられて使用するのがこれまでの主要な用途だった。したがって本研究は、産学の化学分野で特に注目を集める CNF のバイオ分野での有用性を示す点で、学術的かつ社会的の両面で意義が高い。

本研究では、極性の高い CNF を安定に三次元層流化できる PDMS 製のマイクロ流体デバイスを新たに開発すると共に、CNF ゲルのレオロジー特性を詳細に解析して条件を最適化し、同軸二層ゲルファイバーの細胞担持相に CNF ゲルを用いた細胞培養場の作製を目的とした。さらに、ゲルファイバー培養場に筋芽細胞または血管内皮細胞を包埋して分化・成熟させることで、長大で複雑な筋組織ならびに血管組織を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) CNF ゲルファイバーを安定に作製するマイクロ流体デバイスの開発

独自にデザインし、MEMS 技術で作製した流路をもつ PDMS 製の基本ユニット層を 3 層重ねて、同軸二層ゲルファイバーを作製するマイクロ流体デバイスを構築した。アルギン酸ナトリウム水溶液と塩化カルシウム水溶液を第 2 層と第 3 層に導入して三次元層流により混じることなくデバイス内を流し、層流界面での接触によりアルギン酸がゲル化した安定な中空ゲルファイバー(同軸二層ゲルファイバーの外層)を作製した。さらに、第 1 層には様々な濃度の CNF ゾル液を流し、CNF ゲルの濃度(粘度)の最適化や流量比調節によるゲルファイバー径の制御を行った。こうして作製したゲルファイバーに細胞を連続的に担持・包埋して培養場とした。

#### (2) 種々の CNF ゲルの詳細なレオロジー解析

CNF の一部の 1 級水酸基は TEMPO 処理でカルボキシ基に酸化されているが、この酸化度をはじめファイバーの径や長さが異なる種々の CNF が存在する。これら各種 CNF について、以下の研究を実施した。まず、CNF の各分子は水素結合で凝集している。そこで、マイクロ流体デバイス内で適当に流動するゾルとするための前処理操作を確立した。CNF ゾルの粘性はレオメーターで測定した。また、様々な濃度の CNF についてレオメーターで粘弾性を測定し、貯蔵弾性率と損失弾性率の値からチキソトロピー性を解析すると共に、組織形成に適するゲルの物性の定量的な評価を行った。さらに、高アスペクト比の CNF がマイクロ流体デバイス内で流動する際のずり応力により配向するかについて、査型電子顕微鏡により評価した。この CNF の配向性と、培養細胞の挙動(配向性、組織形成能)との相関を解析した。

#### (3) CNF ゲルファイバー培養場による長大な生体組織の作製

ファイバーの径や長さならびに酸化度が異なる種々の CNF ゲルについて、濃度を変化させて同軸二層ゲルファイバー培養場を作製し、位相差顕微鏡で経時的に観察をして細胞の担持能や組織形成能を評価した。また、膜透過性に基づく生死細胞判定試薬を用いて細胞毒性を解析した。

まずは筋芽細胞を包埋して適切な培養液中で三次元培養し、成熟した筋管組織を作製した。また、血管内皮細胞を培養して、管腔化した毛細血管組織を作製した。ここにおいて成熟・管腔化を促すため、生理活性物質を産出する間葉系幹細胞との共培養も行った。これら組織は蛍光染色を施し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察すると共に三次元構造を詳細に解析した。さらに、移植医療応用を見据えてゲルファイバー培養場のラット背部皮下への埋植試験を行い、残存性や毒性の評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) PDMS 製積層型マイクロ流体デバイスによる細胞包埋 CNF ゲルファイバーの作製

PDMS 製の基本ユニット層の流路は、入口から分岐を繰り返して四方向から出口（直径 200  $\mu\text{m}$ ）に合流することで同軸の層流を形成するデザインである<sup>1</sup>。非ニュートン流体である CNF ゾル（ならびに細胞を懸濁した CNF ゾル）を安定して送液するために流路のサイズを適切に設定した。ゲルファイバーの射出方向についても、積層したユニット平面に対して入口と同一面に設けた装置と反対面に設けた装置の両者と検討し、操作性に優れるため同一面装置を採用した。これら基本ユニットの入口をずらして積層し、各層への流量の絶対値と層間の流量比を最適化することで、安定した同軸二層ゲルファイバー（外層/アルギン酸ゲル、内層/CNF ゲル）の作製を達成した。(2)に記述した CNF の前処理操作により細胞の沈降がない安定な懸濁液を長時間にわたり維持できるようになったため、長軸方向に均一に細胞を包埋したゲルファイバーの作製に成功した。

##### (2) 種々の CNF の構造とレオロジー解析ならびに前処理方法の確立

繊維長（100 nm ~ 2  $\mu\text{m}$ ）、繊維径（1.0 ~ 300 nm）、酸化度（定量化はしているが非開示）が異なる種々の CNF を作製し、AFM で定量的に構造を観察した。これら CNF を以下の 4 種類に分類した：標準型、短繊維型（100 ~ 500 nm）、低酸化型、低酸化・太型。これら CNF は高濃度条件では水溶液中でも凝集しやすいため、均一に分散させるための前処理を検討し、超音波処理を施す手法を確立した。振動数、出力、時間を最適化し、細胞を包埋したゲルファイバー作製に要する時間スケールにおいて、CNF ならび細胞のいずれも沈降せずに均一な分散状態を保つことに成功した。これら成果により、(3)に記述する組織作製の再現性が顕著に向上した。

これら CNF の濃度を变化させた試料について、レオメーターによる粘度およびせん断弾性の測定を行った。いずれの CNF もチキソトロピー性を発現した。一方で、粘度ならびに貯蔵弾性率および損失弾性率については、同一濃度条件において CNF 種類の違いで差が見られた。酸化度の低い CNF は値が大きく、対して、短繊維型 CNF は他の CNF よりも 1~2 オーダー低いという顕著な違いが得られた。同一 CNF でも高濃度においては粘度ならびに弾性率が増大したため、マイクロ流体デバイス内で流動が可能であり、細胞担持能に優れる濃度条件を最適化した。

##### (3) CNF ゲルファイバー培養場による長大な筋組織の作製

種々の CNF について CNF 濃度を变化させながら同軸二層ゲルファイバー培養場を作製し筋芽細胞を包埋したところ、評価した 3 週間の培養においては、一定の濃度以上で安定した細胞の保持と増殖が確認された。膜透過性に基づく生死細胞判定試薬の解析では、顕著な細胞毒性は検出されなかった。これより、分子集合による長線維化した CNF のゲルファイバーが組織形成培養場として適することを明らかにした。一方で、アテロコラーゲンを既報の濃度で導入した同軸二層ゲルファイバーでは、1 週間で細胞が凝集塊を形成し安定した培養を実現し得なかった。

濃度条件を最適化して各種 CNF ゲルファイバーで筋芽細胞を三次元培養すると、筋管組織が再現性良く形成された。培養 21 日時点で筋組織のミオシン重鎖を蛍光免疫染色したところ、全長が少なくとも 1.6 cm 以上である筋組織の形成が見出された。個々の筋管の長さは最長で 880  $\mu\text{m}$  であり、直径は単一細胞を同等であった。さらに、これら筋管組織は同一方向に配向して 10 本程度の束構造を形成していることも明らかにした。これらの筋組織構築は、繊維径や酸化度のことなる CNF において同等に観察された。ゲルファイバー中の CNF の状態を走査型電子顕微鏡により直接観察する手法を開発し、CNF はゲルファイバーの長軸方向に配向した構造となっており、一部は束状構造を形成していることが解明できた。一方で、繊維長が短い CNF の三次元培養場では筋管の形成はほとんど起こらず、CNF 分子の長さが組織形成に大きな影響を与えるとの知見を得た。さらに比較として、分散した単分子からなるカルボキシメチルセルロースのゲルを用いたところ、短繊維型 CNF と同じく筋管組織は形成されなかった。これらの結果より、細胞が CNF 長い繊維の配向を認識して配向・融合し筋管形成しているとの機構が考察された。

##### (4) CNF ゲルファイバー培養場による管腔構造をもつ長大な血管組織の作製

続いて、濃度条件を最適化した標準型 CNF ゲルファイバーで血管内皮細胞を培養したところ、筋芽細胞と同様に安定に保持・増殖し、21 日間の培養により全長が少なくとも 2.0 cm 以上である構造体が形成された。細胞の核と F-アクチンを蛍光染色して共焦点レーザー顕微鏡で詳細な構造解析を行ったところ、管腔構造をもち単一細胞層の壁からなる直径 100  $\mu\text{m}$  の長大な血管組織であることが明らかになった。さらに、生体での周皮細胞を模擬して間質細胞が再生血管組織の構造を成熟させることを意図し、間葉系幹細胞との共培養を行った。血管内皮細胞と間葉系幹細胞の比率を様々に变化させた条件で培養を行ったところ、血管内皮単独と同様に、管腔構造をもち単一細胞層の壁からなる直径 100  $\mu\text{m}$  の長大な血管組織の構築に成功した。さらに、構造を詳しく観察したところ、血管内皮再薄単独では血管壁における細胞の集合状態が比較的疎であったのに対し、間葉系幹細胞との共培養では細胞が密に集合し血管組織の長軸方向に配向していることが観察された。これより、生体と同様に再生血管組織の構築においても、間葉細胞が組織の成熟を促進することが示唆された。

#### (5) CNF ゲルファイバーの生体内への導入

移植医療応用を目指して、標準型 CNF を用いた同軸二層ゲルファイバーのラット背部筋膜下への埋植試験を行った。6 日間後に埋植部位の組織を採取し切片試料を HE 染色で解析したところ、ゲルファイバーの残存を確認した。またゲルファイバー周囲に炎症反応は見られたが、ラット個体への急性毒性は観察されず、今後のさらなる検討に期待がもたれた。

以上、本研究では、PDMS 製ユニットを積層させたマイクロ流体デバイスを新たに開発すると共に、超音波での前処理手法を確立して極性の高い CNF を安定的に三次元層流化し、CNF ゲルファイバー培養場の作製を実現した。さらに、CNF 濃度や粘弾性ならびに細胞密度などの条件を最適化して CNF ゲルファイバー内に細胞を長期間にわたり安定して保持・培養し、筋芽細胞または血管内皮細胞・間葉系幹細胞を包埋して分化・成熟させることで、長大で立体的な構造をもつ筋組織ならびに血管組織の構築を達成した。

#### < 引用文献 >

1. Dong Hyun Yoon, Daiki Tanaka, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Microfluidic Stamping on Sheath Flow, Small 2016, 12(24):3224 - 3228.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomo Tanaka, Keiichi Imato, Kenji Yoneda, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Naoya Takeda
2. 発表標題 Fabrication of long luminal tissues in three-dimensional gel scaffolds with oriented cellulose nanofibers
3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2018 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichi Imato, Kenji Yoneda, Tomo Tanaka, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Naoya Takeda
2. 発表標題 Fabrication of long myotube bundles in three-dimensional gel scaffolds with oriented cellulose nanofibers
3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2018 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田 直也
2. 発表標題 セルロースナノファイバーの再生医療応用 ~ チキソトロピー性ゲルでの細胞培養による組織作製 ~
3. 学会等名 BioJapan 2018 / 再生医療JAPAN 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田 直也
2. 発表標題 セルロースナノファイバー・ゲルでの細胞培養による生体組織作製
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoya Takeda
2. 発表標題 Thixotropic cellulose nanofiber gel scaffold for 3D cell culture and fabrication of engineered tissues
3. 学会等名 5 th Core-to-Core International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田 直也
2. 発表標題 TEMPO酸化セルロースナノファイバー・ゲル培養場による三次元生体組織の構築
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田 春霞、田中 智、尹 棟鉉、土戸 優志、今任 景一、関口 哲志、庄子 習一、武田 直也
2. 発表標題 再生組織構築における三次元培養足場としてのセルロースナノファイバー・ゲルの構造と機能物性
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 西田 春霞、田中 智、尹 棟鉉、土戸 優志、今任 景一、関口 哲志、庄子 習一、武田 直也
2. 発表標題 三次元培養足場としてのCNFゲルの材料物性評価と再生組織構築
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019 日本化学会秋季事業
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田 直也、西田 春霞、角田 敬正、関根 秀一、尹 棟鉉、今任 景一、土戸 優志、清水 達也、関口 哲志、庄子 習一
2. 発表標題 同軸二層構造セルロースナノファイバークラウドでの三次元組織の構築と移植応用に向けた動態解析
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 チキソトロピー性を有するゲルを用いる多層3次元細胞培養足場システム	発明者 武田直也、今任景一、他4名	権利者 学校法人早稲田大学、第一工業製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-83742	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>[受賞]</p> <p>1. 優秀ポスター発表賞：西田春霞、田中智、尹棟鉉、土戸優志、今任景一、関口哲志、庄子習一、武田直也、三次元培養足場としてのCNFゲルの材料物性評価と再生組織構築、第9回CSJ化学フェスタ2019 日本化学会秋季事業、2019年。</p> <p>2. 優秀ポスター賞：西田春霞、田中智、尹棟鉉、土戸優志、今任景一、関口哲志、庄子習一、武田直也、再生組織構築における三次元培養足場としてのセルロースナノファイバークラウドの構造と機能物性、第68回高分子討論会、2019年。</p> <p>[展示会]</p> <p>1. 武田直也、CNFの再生医療応用、セルロースナノファイバークラウドでの細胞培養による生体組織作製、日本化学会第99春季年会 ATPプログラム「セルロースナノファイバークラウドの社会実装に向けた研究最前線」、2019年。</p> <p>2. 武田直也、セルロースナノファイバークラウドの再生医療応用 - チキソトロピー性ゲルでの細胞培養による組織作製 -、BioJapan 2018 / 再生医療JAPAN 2018、2018年。</p>
---

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
研究分担者	今任 景一  (Imato Keiichi)  (80777970)	広島大学・大学院先進理工系科学研究科・助教   (15401)	
連携研究者	庄子 習一  (Shoji Shuichi)  (00171017)	早稲田大学・理工学術院・教授   (32689)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	関口 哲志 (Sekiguchi Tetsushi) (70424819)	早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・教授  (32689)	
連携研究者	尹 棟鉉 (Yoon Dong Hyun) (70711498)	早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・助教  (32689)	