

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：37120

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04169

研究課題名（和文）細胞積層型人工組織の創製と力学設計最適化

研究課題名（英文）Fabrication of cell-layered artificial tissue substitute and optimization of mechanical design

研究代表者

荒平 高章（Arahira, Takaaki）

九州情報大学・経営情報学部・准教授

研究者番号：30706958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞自身で組織化を促し均一な組織を構築する技術の開発を目的とし、その解決のためにバイオプリンティング技術を用いた。作製したバイオインクによる三次元構造体は市販品よりも優れた力学特性を示し、細胞分化能も優れていた。本研究で作製したバイオインクは骨芽細胞の増殖・分化を促進し、三次元構造体全体での組織化が効率良く行われることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の細胞培養手法における播種した細胞が足場材で局所的に分布し、組織化を行うという問題点を解決するため、バイオプリンティング技術に着目し、足場材内での細胞の分布を均一化し、均一な組織を作製することを目的としている。そのためのバイオインクを作製し、実際に三次元構造体をバイオプリンタで作製し、力学特性やin vitro評価等を実施した。その結果、本研究で作製したバイオインクが市販品よりも力学特性や細胞の組織化で優れていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to promote organization by cells and to construct uniform tissues. To solve this problem, bioprinting technology was used. Three-dimensional structures with bioink showed better mechanical properties than commercially available products. The bioink also showed superior cell differentiation ability. The bioink produced in this study promoted the proliferation and differentiation of osteoblasts, suggesting that the entire three-dimensional structure was organized efficiently.

研究分野：生体工学

キーワード：バイオプリンティング 足場材 力学特性 骨芽細胞 骨再生 Tissue engineering コラーゲン アルギン酸

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療分野において組織工学に基づく生体外での三次元組織構築に関する研究から、生体外で構築した組織を心臓、角膜、軟骨といったあらゆる生体組織に適用可能になるまでに至っている。しかし、三次元組織構築のためには、細胞が増殖し、組織化するための空間が必要であり、「足場材」がその役割を担っているが、生体との親和性・適合性の問題や、生体組織との置換性といった問題がいまだに解決されていないのが現状である。また、人工的に作製した生体組織は、本来の生体組織の力学特性や材料特性に近いものになっているとは言い切れず、本来の生体組織に近い力学特性、材料特性や構造を再現することが必要である。ここでいう材料特性とは、細胞の配向に伴う組織化の状態や周囲環境に対する適合性などを指す。これら力学特性や材料特性を担うものが組織工学で言う「足場材」である。この「足場材」に関しては材料の選定や作製方法による構造化の工夫といった様々な研究が行われている。申請者はこれまで、足場材で細胞を培養することで人工組織を構築する研究を実施してきた(Arahira et al. 2014, 2016, 2019)。しかし、足場材の構造の制御が困難である点に加え、細胞が内部まで侵入可能な構造にした場合、十分な力学特性を得るのが困難である点、さらに大きな組織を構築しようとすると内部への栄養供給が困難であるといった多くの問題に直面してきた。

これらの問題を解決する手段として、バイオプリンティングという研究分野が立ち上がり、様々な研究が実施されている(中村ら, 2015)。バイオプリンティングの中でも、申請者はインクジェット方式に基づき細胞塊で造形する技術に着目した。細胞塊であれば、細胞自身の力で外部の足場材の構造に依存することなく組織化を促すことが可能であり、その構造は細胞塊の配列で制御できる。また、足場材を母体として構築した組織は足場材の不均一構造から構築組織自体も不均一であることに対し、バイオプリンティングは一様な構造の組織を構築できることが期待できる。また、インクジェット方式を採用しているため、複数の細胞塊を準備しておくことで、様々な配列パターンで組織を構築できる。家庭用のインクジェットプリンターは複数の色のインクを画像データに基づいて混色することで様々な色を再現している。したがって、インクを混色せずに単色で吐出させることで元のインクのみを吐出できる。この原理を細胞塊に適用すれば、複数の種類の細胞塊を吐出させることが可能となる。目的の組織を作製するためには、その組織に適した細胞を用いることが望ましいが、膨大な細胞を要するため、時間とコストがかかる。そこで、この問題を解決するために、他の細胞への分化能を有する幹細胞を用いる。幹細胞は、周囲の細胞に影響し、その細胞に分化する性質があるため、幹細胞塊を目的の細胞塊とともに配列させることで、より少ない細胞で効果的に組織化できる。しかし、ここで問題となるのが、細胞塊の配列である。細胞塊の配列は、同種の細胞塊で並べる方法、異種の細胞塊を交互に並べる方法、異種の細胞塊をランダムに並べる方法の3つが考えられる。これらの細胞塊の配列の違いによる構築組織の力学特性や材料特性、構造を評価した研究はほとんどなく、実験的研究から得られた結果を最適化処理し、細胞塊の配列と力学特性、材料特性、構造との関連性について追究する。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞自身で組織化を促し均一な組織を構築する技術の開発を目的とし、その解決のためにバイオプリンティング技術を用いる。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 バイオインクの調製

精製水 100 g に Alg-Na 4 g を入れ、37℃ にて 2 日間溶解し、4.0 mass% の Alg-Na 水溶液を作製した。作製した Alg-Na 水溶液に恒温槽にて 37℃ に温めたコラーゲン溶液(5.4 mg/g)を 10 g または 30 g スターラーを使用して混合させた。

Alg-Na 水溶液 4.0 mass% のみの溶液を AC0 とした。コラーゲン溶液を -60℃ 冷凍庫にて凍結させ、凍結乾燥機にて凍結乾燥させることでコラーゲン溶液の溶媒を取り除き、コラーゲンファイバーを作製した。精製水 100 g に作製したコラーゲンファイバーを 1 g または 3 g 入れ、37℃ にて 3 日間溶解して 1.0 mass% と 3.0 mass% のコラーゲン水溶液を作製した。作製した 2 つのコラーゲン水溶液に Alg-Na を 4 g 混合させ、37℃ にて 2 日間溶解させてバイオインクを作製した。コラーゲンファイバー 1.0 mass%・Alg-Na 水溶液 4.0 mass% の溶液を AC1、コラーゲンファイバー 3.0 mass%・Alg-Na 水溶液 4.0 mass% の溶液を AC3 とした。また、市販のバイオインクとの比較のため CELLINK 社の CELLINK Bioink を Bi とし、コントロール群として使用した。

#### 3.2 バイオインクを用いた三次元構造体の作製

3D バイオプリンタは CELLINK 社の INKREDIBLE を使用した。三次元構造体の形状は円柱状とし、三次元構造体作製のために 3D Builder を使用し 3D モデル(径 12 mm、高さ 3 mm)を

作成, 3D モデルを Repetier-Host を使用し G コードに変換, INKREDIBLE によりバイオインクを吐出し, 上から塩化カルシウム( $\text{CaCl}_2$ )10 g を精製水 100 g に溶解した  $\text{CaCl}_2$  水溶液 1.0 mass% を滴下し 1 時間架橋させ, 三次元構造体を作製した.

### 3.3 三次元構造体の基礎評価

作製したバイオインクを用いて作製した三次元構造体において力学試験機(10 N のロードセルで 1 mm/min)を使用して力学試験を行った. 力学試験機によって計測された“荷重-変位値”を“応力-ひずみ値”に変換し, “応力-ひずみ曲線”を作成した. 応力-ひずみ曲線からひずみの値が 0.1~0.3 の部分の傾きにおいて, 弾性率を求めた. 応力-ひずみ曲線のひずみの値が 0~0.3 の部分において, ひずみエネルギーを求めた. 作製された三次元構造体の表面構造を観察するために走査電子顕微鏡(FE-SEM)を用いて表面構造の観察を行った. ひずみエネルギー(n=4), 弾性率(n=4)および質量(n=3)に対して一元配置分散分析を行い, Fisher LSD 法により有意差を算出した. 有意差は  $p < 0.05$  とした.

### 3.4 細胞含有三次元構造体の in vitro 評価

試料 1 個あたり  $30 \times 10^4$  cell となるように 10  $\mu\text{l}$  の培地を各バイオインクに均等になるように薬さじで混合し, シリンジに詰め, バイオプリンタ用チューブに補填して 3.2 と同様に三次元構造体を作製した. 以降細胞を懸濁させたバイオインクで作製した三次元構造体をそれぞれ Bic, AC0c, AC1c, AC3c とする. 作製した Bic, AC0c, AC1c, AC3 においては, 1 時間  $\text{CaCl}_2$  を 1 g 混合させた培養液 10 ml に浸漬させてインキュベーター内で保存し, 十分に架橋させ, 培養液を 2 ml 入れ, インキュベーター内で細胞培養を開始した.

細胞培養群において力学試験機(10 N のロードセルで 1 mm/min)を使用して力学試験を行った.

力学試験機によって出された値から 3.3 と同様にして, 応力-ひずみ曲線の作成および, 弾性率を求めた. 細胞固定のために, 培養期間が終了した試料 1 個に対して 10 ml のホルマリンに対して 1 g の  $\text{CaCl}_2$  を混合させた溶液に浸漬させた. 細胞固定した試料をパラフィンブロック作製後, 細胞核, 骨組織, 軟骨組織の一部が染色される HE 染色の作製を行った. 骨分化に関する遺伝子発現量をリアルタイム PCR 反応にて評価した. 本研究においては, 骨分化に関連する BMP2, Collagen-Type1, Runx2 の遺伝子発現量を測定した. 測定の際には, Actb をハウスキーピング遺伝子とした.

## 4. 研究成果

図 1 に細胞を含有していないバイオインクのみで作製した試料における応力ひずみ曲線を示す. ひずみ値に対する応力値で比較すると Bi が最も低く, AC3 が最も高い傾向を示した. 図 2 に図 1 の応力ひずみ曲線の初期線形領域の傾きより算出した弾性率の結果を示す. AC3 が最も高い弾性率を示し, Bi と AC0 よりも有意に高い値となった. これはコラーゲン含有量の増加によって三次元構造体の構造強化につながったと考えられる. この結果は図 3 に示す走査型電子顕微鏡画像による表面構造観察からも明らかである. AC0 ではアルギン酸によるネットワーク様構造が確認されているが, コラーゲンを含有した AC1, AC3 では, そのネットワーク構造表面にさらにコラーゲン線維状組織が確認できる. これらが構造体全体に分布することで弾性率が增大したと考えられる.

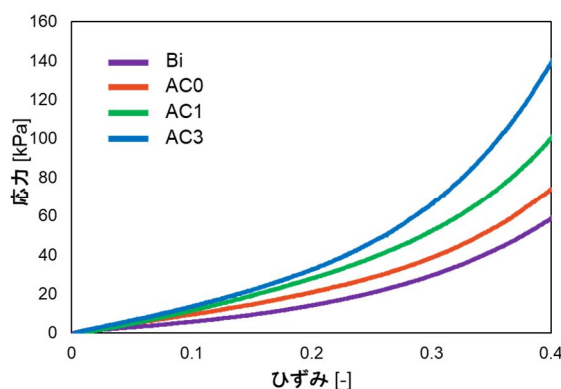


図 1 応力ひずみ曲線

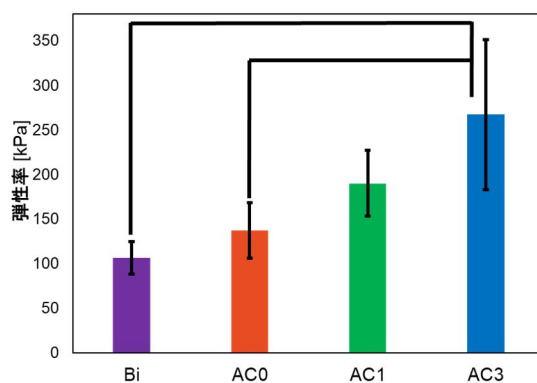


図 2 圧縮弾性率 ( $p < 0.05$ )

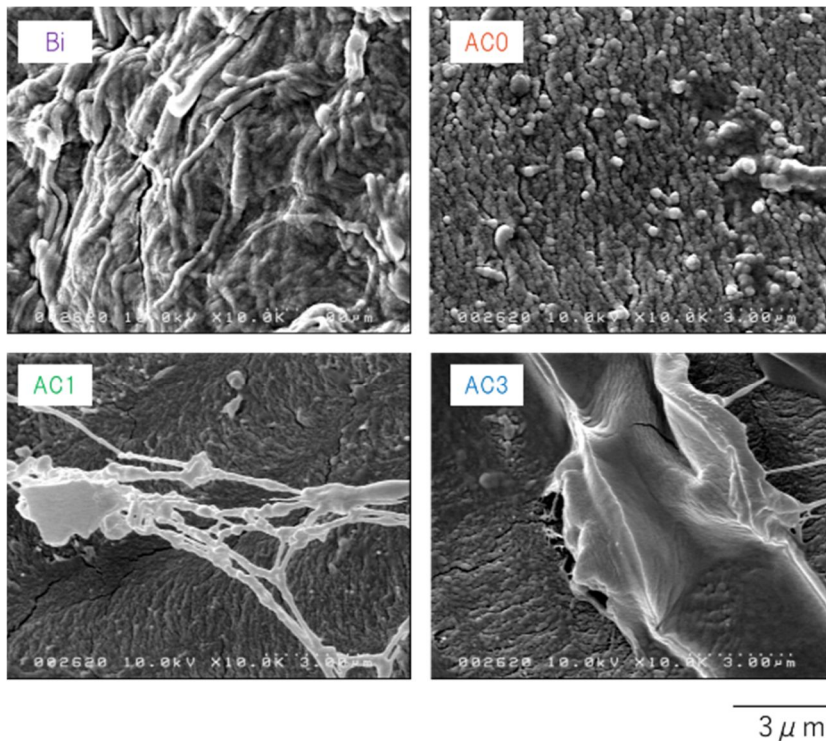


図3 表面構造観察

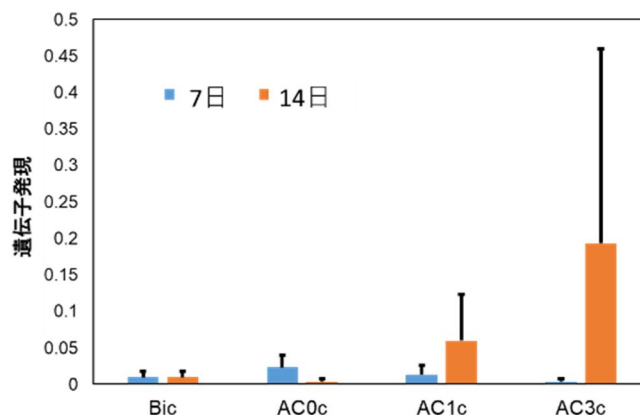


図4 遺伝子発現解析

図4に *in vitro* 実験結果の一部として、BMP2の遺伝子発現解析結果を示す。BMP2は骨分化マーカーとして骨関連研究では広く用いられている評価指標である。培養7日ではどの群においてもあまり発現が確認できなかったが、14日になるとコラーゲン含有三次元構造体の発現が増大した。これは、コラーゲンが骨芽細胞の増殖・分化を促進したと考えられる。本報告には掲載していないが、組織染色像においてもコラーゲン含有三次元構造体AC1, AC3において他の群よりも組織化が良好であっただけでなく、他の遺伝子発現量(Runx2)もBMP2と同様の結果を示していた。

以上より、本研究で作製したバイオインクは骨芽細胞の増殖・分化を促進し、三次元構造体全体での組織化が効率良く行われることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takimoto Kurumi、Arahira Takaaki、Todo Mitsugu	4. 巻 16
2. 論文標題 Development and characterization of three-dimensional layered structures with gel beads for bone tissue engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Results in Materials	6. 最初と最後の頁 100317 ~ 100317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rinma.2022.100317	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 -

1. 著者名 Arahira Takaaki、Takimoto Kurumi、Todo Mitsugu	4. 巻 6
2. 論文標題 Development and Characterization of Alginate/Collagen Composite Bioinks for Bone Tissue Engineering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology and Biomedicine	6. 最初と最後の頁 160-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26502/jbb.2642-91280080	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 瀧本くるみ、東藤貢、荒平高章
2. 発表標題 骨再生のための三次元ゲルビーズ積層構造体の作製
3. 学会等名 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurumi Takimoto, Takaaki Arahira
2. 発表標題 Fabrication and characterization of 3D laminated gel beads scaffold for bone tissue engineering
3. 学会等名 ISSCR International Symposia virtual（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurumi Takimoto, Takaaki Arahira, Mitsugu Todo
2. 発表標題 Development of novel bioink for bone regeneration and application to artificial bone tissue
3. 学会等名 6th International Conference on Materials and Reliability (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧本くるみ, 荒平高章
2. 発表標題 3D バイオプリンタを用いた人工骨組織構築の試み
3. 学会等名 第49回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧本くるみ, 東藤貢, 荒平高章
2. 発表標題 人工骨組織作製のための 3D バイオプリンタ用バイオインクの設計
3. 学会等名 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6th International Conference on Materials and Reliability, 2022. (Young Researcher Award受賞)
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------