

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20198

研究課題名（和文）新規細胞導入法を用いた細胞含有多孔質材料の開発と組織再生・3次元培養への応用

研究課題名（英文）Development of cell-containing porous material using novel cell transfer method and its application to tissue regeneration and three-dimensional cell culture

研究代表者

根岸 淳（Negishi, Jun）

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：60722634

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）：多数の繋がった孔をもつ多孔質材料が、組織再生や細胞培養の基材として利用されている。しかし、一部の多孔質材料には細胞が浸潤しないことが問題となっている。

本研究では、金属や食品加工分野で使用されている含浸技術を用いて、高分子および生物組織由来の多孔質材料に細胞を導入する新たな手法を確立した。さらに、細胞を導入した多孔質材料が組織再生を促進すること、細胞培養基材として利用可能なことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による様々な多孔質材料への細胞導入法の確立は、細胞の3次元培養や組織の再生への貢献が期待される。組織や臓器を模倣した材料を用いた3次元培養は、細胞機能の解明や創薬研究におけるスクリーニングへの応用につながる。また、患者自身の細胞を多孔質材料に導入する新たな治療法につながり、欠損した組織や臓器の再構築に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Porous scaffolds with a large number of connected pores are used as base materials for tissue regeneration and cell culture. However, the problem is that the cells do not infiltrate some porous scaffolds. In this study, using impregnation techniques used in the fields of metals and food processing, a new method for introducing cells into polymer and biological porous scaffolds were established. Moreover, the cell-introduced scaffolds promoted tissue regeneration, and can also be used as a cell culture material.

研究分野：生体医工学・組織工学

キーワード：多孔質材料 細胞導入 含浸技術 3次元培養

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

機能不全になった組織や臓器の治療法として様々な組織への細胞治療が検討され、単層から数層の細胞移植が実現しつつある。しかし、大量の細胞移植では血液不足に起因する生着率低下や細胞自身の力学的強度の低さが問題となり、組織再生が困難となる。ヒトや動物の組織は「細胞」と「細胞外マトリックス」で構成されている。細胞外マトリックスは細胞の支持や細胞機能調節の役割を有し、3次元的な組織再生には細胞外マトリックスの役割を担う足場材料が必要と考えられている。

連通孔をもつ多孔質材料は、材料内部までの細胞や組織の浸潤が可能であり、生体内での組織再生や細胞の3次元培養に有用である。しかし、移植した材料の周辺に細胞が存在しない場合や多孔質材料の素材や孔径によっては、細胞が浸潤しにくいことが報告されている。この問題の解決策として、多孔質材料への細胞播種、細胞の遊走による多孔質材料への細胞導入が行われているが、時間を要すること、遊走性が低い細胞は適用外なことや孔径 100 μm 以下の材料への細胞浸潤が望めないことが課題である。また、細胞を分散させたコラーゲン溶液などをゲル化させた細胞含有ゲルが作製されているが、溶液がゲル化する際に細胞毒性を示さない素材しか適用できないこと、力学的強度が低いことが問題となっている。

当研究室では、金属加工分野などで使用されている含浸法を生体材料研究に応用し、多孔質材料の複合化や薬剤導入に含浸法が有用なことを明らかにしてきた。以上から、本研究では、含浸法による種々の多孔質材料への細胞導入および細胞含有多孔質材料による組織再生と3次元培養の基盤確立に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、多孔質材料に対して含浸法を用いて細胞を導入、培養試験と動物試験を行い、以下の項目を目的とした。

- ①. 含浸法による完成した多孔質材料への細胞導入技術の確立
- ②. 多孔質材料への細胞導入による3次元培養系の確立
- ③. 細胞含有多孔質材料による組織再生の実現可能性の解明

3. 研究の方法

脂肪由来幹細胞の懸濁液を含浸処理(真空、加圧、真空加圧)し、その後、形態観察と生細胞数測定および分化誘導試験を行い、各含浸処理の脂肪由来幹細胞の機能への影響を評価した。また、含浸処理を用いて細胞を導入した細胞含有多孔質材料の培養試験と動物試験を行い、細胞増殖、細胞分化と組織再生について評価した。

4. 研究成果

(1) 各含浸処理群および未処置群の脂肪由来幹細胞懸濁液を培養皿に添加、一定期間培養した。すべての処理群で細胞の接着および伸展が確認された。また、含浸処理群と未処置群の脂肪由来幹細胞を維持培地または分化誘導培地で培養後、脂肪細胞分化を Oil Red O 染色で評価した。維持培地ではすべての群で赤く染色される油滴は確認されず、分化誘導培地ではすべての群で赤く染色された油滴が細胞内に認められた。

以上から、含浸処理は脂肪由来幹細胞の接着や伸展に影響せず、また、分化に関しても影響を与えない可能性が示唆された。

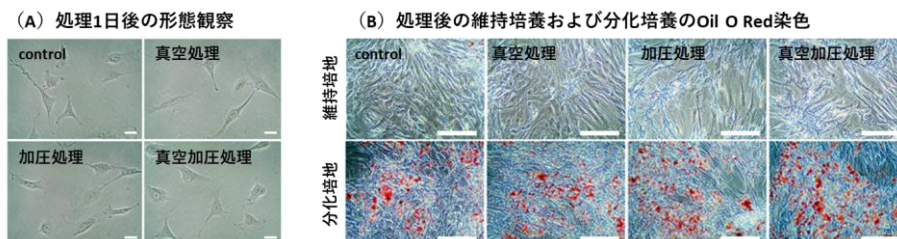


Fig 1. 各処理後の細胞形態 (A) と Oil Red O 染色 (B)、スケールバー : 100 μm

(2) 含浸処理または浸漬処理を用いてコラーゲン材料に脂肪由来幹細胞を導入、5日間培養後の材料内部の生細胞と死細胞を染色した。浸漬処理を含むすべての群で、材料表面および内部に生細胞が認められた。材料表面ではわずかに死細胞が観察されたが、材料内部には死細胞が観察されなかった。また、材料全体の生細胞の数は真空処理群が最も多くなっていた。

以上から、含浸処理、特に真空処理がコラーゲン材料全体への脂肪由来幹細胞導入に有用であることが示唆された。

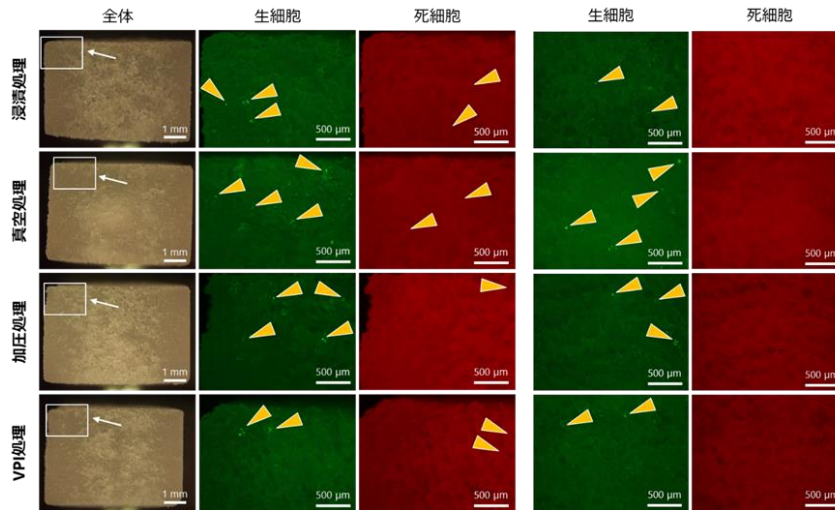


Fig 2. 細胞導入コラーゲン材料の Live & Dead 染色

(3) 脂肪由来幹細胞を真空加圧処理または浸漬処理でコラーゲン材料へ導入、脂肪分化誘導培地で培養した。脂肪細胞分化誘導 14 日目において、浸漬処理群および真空加圧処理群の脂肪細胞マーカー (*C/EBPα*, *Leptin*) の発現量は、2 次元培養の発現量と同等だった。

以上から、真空加圧処理で導入された脂肪由来幹細胞が、コラーゲン材料表面だけではなく内部でも脂肪細胞に分化したことが示唆された。

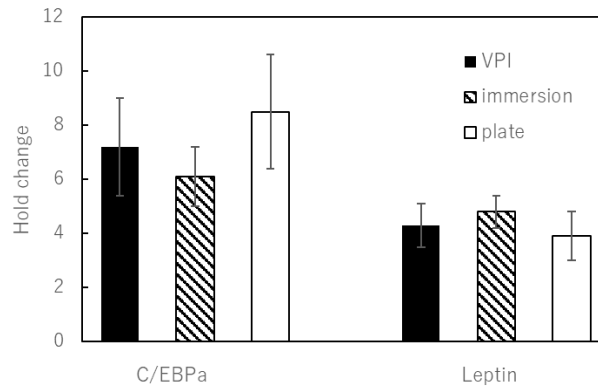


Fig 3. 脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料の脂肪分化誘導後の脂肪細胞マーカー発現量

(4) ヒトや動物の組織から細胞のみを除去した脱細胞化組織が、生体環境を模倣した材料として研究に利用されている。しかし、一部の脱細胞化組織では、播種された細胞が材料内部まで浸潤しないことが知られている。本研究では、浸漬処理および含浸処理を用いた脱細胞化骨髄への細胞導入を検討した。浸漬処理した脱細胞骨髄では、培養 1 日目と 5 日目で細胞数の増加は認められず、表面にわずかな細胞が観察されたが、内部には細胞が観察されなかった。一方、真空処理で細胞導入した脱細胞化骨髄では、培養 1 日目から 5 日目にかけて細胞数が増加し、材料表面と中央部両方で細胞が観察された。また、材料表面の細胞は分散して接着していたが、中央部の細胞は細胞同士が凝集した状態だった。

以上から、真空処理が脱細胞化骨髄全体への細胞導入に有用なことが示唆された。

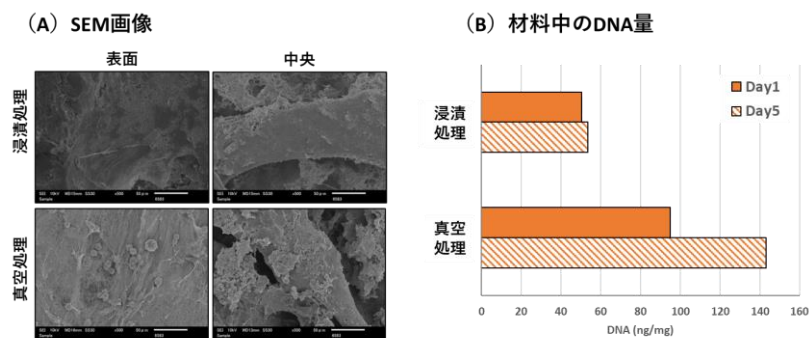


Fig 4. 細胞導入脱細胞化骨髄の SEM 画像 (A) と DNA 量 (B)

(5) 脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料とコラーゲン材料をラット皮下に埋植し、生体内での組織再生を評価した。埋植 14 日目の H&E 染色評価において、細胞を含有していないコラーゲン材料表面に細胞が認められたが、材料中心部には細胞および細胞外マトリックスの産生は認められなかった。脂肪由来幹細胞含有コラーゲン材料の表面と材料中心部ともに細胞が認められ、材料内部の細胞外マトリックスの産生も観察された。

以上から、真空加圧処理を用いて作製した細胞含有材料が、3次元組織の再生に有用であることが示唆された。

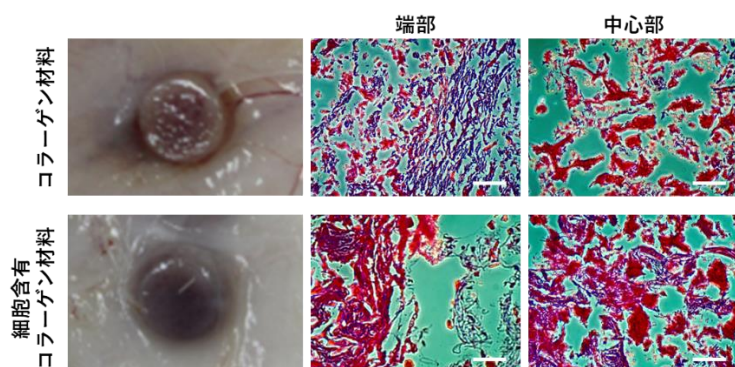


Fig 5. ラット皮下埋植 14 日後のコラーゲン材料、スケールバー：100 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanagisawa Kotaro, Funamoto Seiichi, Hashimoto Yoshihide, Negishi Jun	4. 巻 26
2. 論文標題 Introduction of Cells into Porous Poly-L-Lactic Acid Scaffolds Using Impregnation Techniques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C: Methods	6. 最初と最後の頁 608 ~ 616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEC.2020.0262	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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