

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21888

研究課題名(和文)3次元細胞成形体の細胞機能を高める挑戦的バイオマテリアルの開発

研究課題名(英文)Development of challenging biomaterials to enhance cell functions of 3-dimensional cell constructs

研究代表者

田畑 泰彦(Tabata, Yasuhiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：熱脱水処理によって架橋したゼラチンハイドロゲル分枝繊維を作製した。マウス細胞株3T3E1細胞を分枝ゼラチンハイドロゲル繊維とともに、細胞非接着性培養皿上で培養することで、繊維を均一に含む3次元細胞成形体が調製できた。分枝ゼラチンハイドロゲル繊維を含まない3次元細胞成形体では、培養時間とともに成形体内部の細胞機能が低下、細胞が死滅した。これに対して、分枝ゼラチンハイドロゲル繊維を含ませた3次元細胞成形体内部では細胞の増殖が見られ、細胞のミトコンドリア活性の上昇が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に、3次元細胞集合体では、内部の栄養・酸素供給が十分ではなく、細胞が死滅、あるいは機能低下が問題となっている。本研究ではこの問題を解決するために、細胞と枝分かれハイドロゲル繊維との共培養を行い、繊維が均一に分散した3次元細胞成形体を調製する。この分枝繊維が成形体内で栄養・酸素を供給するpathとなり細胞の生存と生物機能が改善される。分枝ハイドロゲル繊維を利用して体内の血管構造を模倣するこの研究により、生物機能をもつ細胞の3次元培養が可能となり、再生医療関連分野にもたらす学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Branched gelatin hydrogel fibers were prepared by dehydrothermal crosslinking. When 3T3E1 cells of a mouse cell line were incubated with the hydrogel fibers on the culture dish of which surface had been treated to make it cell non-adhesive, 3-dimensional(3D) cell aggregates homogeneously incorporating hydrogel fibers were obtained. For the 3D cell aggregates without the fibers incorporation, the function of cells in aggregates decreased with time while cells died.

On the contrary, cells present in the 3D cell aggregates incorporating hydrogel fibers, proliferated well while an enhanced mitochondria activity of cells was observed.

研究分野：生体材料学

キーワード：3次元細胞成形体 枝分かれハイドロゲル繊維 バイオマテリアル 徐放化細胞増殖因子 細胞機能向上

1. 研究開始当初の背景

細胞は体の基本単位である。しかしながら、生物機能発現の基本単位は細胞の集まりである。これまでの研究からも細胞を 3 次元的に相互作用させることで、高い生物機能や代謝機能を示すようになることがわかっている。しかしながら、3 次元細胞体のサイズが大きくなるとともに内部への栄養、酸素供給ならびに老廃物の排泄が悪くなり、3 次元細胞体内部の細胞環境が悪化、細胞の生物機能が低下、細胞が死滅することが問題となっている。この問題点を解決することが望まれている。本研究の独創的および挑戦的な点は、栄養・酸素の path となるハイドロゲル繊維を利用して、ハイドロゲルの網目構造を 3 次元細胞成形体内に作り、細胞機能を向上させることである。この挑戦が成功すれば、これまで難しかった 3 次元細胞成形体の培養が可能となり、創薬研究に応用できる新しい研究ツールとなることは疑いない。ハイドロゲル網目構造が 3 次元成形体内での細胞機能の維持、向上に有効かどうか探索的性質が強く、新しい分野を築くための芽生え的な性格が強いと考えられる。加えて、これまでの既存技術であるハイドロゲルからの細胞増因子の徐放や培養装置との組み合わせによって生理学的に細胞機能を増強する。すでに細胞足場や流路との組み合わせによって、3 次元細胞成形体の作製が報告されているが、人工材料と細胞との親和性、成形体内部の環境などの点に工夫の余地が残されており、必ずしも細胞機能の増強は達成されていない。幹細胞の生物学が進み、いかに優れた細胞が得られたとしても、細胞機能を維持する技術がなければ、生物医学研究、細胞移植治療のさらなる発展は期待できない。

本研究の目的では、3 次元細胞成形体の細胞の生存と機能を高めるための細胞と組織工学バイオマテリアルとの組み合わせ技術を開発することである。3 次元細胞集合体では、内部の栄養・酸素供給が十分ではなく、細胞が死滅、あるいは機能低下が問題となっている。本研究ではこの問題を解決するために、細胞と枝分かれハイドロゲル繊維との共培養を行い、繊維が均一に分散した 3 次元細胞成形体を調製する。この分枝繊維が成形体内で栄養・酸素を供給する path となり細胞の生存と生物機能が改善される。分枝ハイドロゲル繊維を利用して体内の血管構造を模倣することである。本研究により、生物機能をもつ細胞の 3 次元培養が可能となり、再生医療関連分野にもたらす学術的、社会的意義はきわめて大きい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、3 次元細胞成形体の細胞の生存と機能を高めるための細胞と組織工学バイオマテリアルとの組み合わせ技術を開発することである。一般に、3 次元細胞集合体では、内部の栄養・酸素供給が十分ではなく、細胞が死滅、あるいは機能低下が問題となっている。本研究ではこの問題を解決するために、細胞を分枝ハイドロゲル繊維との共培養を行い、繊維が均一に分散した 3 次元細胞成形体を調製する。本研究の挑戦的な点は、分枝ハイドロゲル繊維を利用して体内の血管網構造を模倣することである。すでに、ハイドロゲル粒子を均一に組み込んだ 3 次元細胞凝集体について研究を行っている。ハイドロゲル粒子が栄養・酸素の供給 path として作用した結果、1mm 直径をもつ大きな細胞凝集体においても内部の細胞は生存していることを確認している。これらのことは、ハイドロゲル材料が栄養酸素の供給 path として優れた特性をもっていることを示している。しかしながら、添加粒子の数が増えるにつれて細胞の 3 次元相互作用の維持に限界が見られた。細胞の相互作用は細胞機能の維持には必須である。そこで、ハイドロゲルの形状を工夫して、相互作用を抑制せず、栄養酸素の供給できる形状を考える必要がある。体内では血管が網目構造をとっている。そこで、ハイドロゲルでこの網目構造を模倣することを考えた。分枝ハイドロゲル繊維を 3 次元細胞成形体に均一に組み込むことができれば、細胞成形体内でハイドロゲル繊維の網目構造が形成され、それが栄養・酸素を供給する path となり、細胞の生存と機能が改善されるのではないかという発想に至った。

3. 研究の方法

本研究の目的は、3 次元細胞成形体の問題であった培養時での細胞の機能低下、死滅を抑制するための挑戦的バイオマテリアルの開発である。この目的のために、体内の血管網構造を模倣したハイドロゲル繊維を利用したネットワーク構造をデザイン、創製した。本研究の独創的および挑戦的な点は、細胞自身のもつ自己集合する特性を利用して調製される 3 次元細胞成形体内部の細胞への栄養、酸素の供給を改善するために、分枝ハイドロゲル繊維を組み込むことにより、体内の血管網構造を模倣することである。この方法論がうまく働くかどうかを調べる点は挑戦的であるが、この研究成果により、生物機能をもつ細胞の 3 次元培養が可能となり、再生医療関連分野に大きな変革と転換をもたらすと強く信じる。さらに、ハイドロゲル内に細胞増因子を含浸させ、成形体内部から因子を作用させるとともに、培養装置との組み合わせによって生理学的に細胞機能を増強する。本研究では、生体親和性のゼラチンのエレクトロスピニングによりゼラチ

ンハイドロゲル繊維不織布を作製した。この不織布を細断することで分枝ゼラチンハイドロゲル繊維を調製した。ハイドロゲル繊維の分枝度、繊維径、および分解性などの性質が3次元細胞成形体内の細胞の生存、機能の改善に与える影響について評価した。この組織工学バイオマテリアル技術により、3次元細胞成形体の栄養酸素状態を改善し、in vitroにおいて細胞能力を高める。次に、ハイドロゲル繊維に細胞増殖因子などを含浸させ、3次元組織化細胞体内で細胞に作用させたり、培養装置を組み合わせたりすることで細胞機能をさらに高めることを試みた。細胞成形体内に組み込ませる分枝ゼラチンハイドロゲル繊維は、これまでの共同研究企業である日本毛織株式会社から供給を受けることができた。すでに、ハイドロゲル繊維のデザインや、分枝繊維の調製法について検討を進めて、供給していただいた。これまでの共同研究開発の成果として、分枝していないゼラチン繊維からなるゼラチンハイドロゲル不織布 (GenoCel™) の商品化は実現している。

4. 研究成果

3次元細胞成形体内に組み込ませるためのゼラチンからなる分枝ハイドロゲル繊維を作製、熱脱処理によって架橋した。架橋の程度によって繊維の分解性を制御する。次に、3T3E1細胞を分枝ゼラチンハイドロゲル繊維とともに、細胞非接着性培養皿上で培養した。その結果、期待通りに繊維を均一に含む3次元細胞成形体を調製できた。細胞成形体内に酸素プローブを置くことで酸素分圧を評価した。高い酸素状態では、ミトコンドリア内の酸化リン酸化でATPが産生される。しかし、低酸素では、解糖系によってATP産生が行われる。この代謝の切り替えをしているのがピルビン酸脱水系酵素 (PDH) である。このPDH活性を測定することで細胞内の酸素状態を評価したところ、繊維を均一に含んだ3D細胞形成体内の酸素分圧が高く、ミトコンドリアの活性、およびATP産生が増加していることがわかった。繊維を含まない3D細胞成形体では、成形体内部の酸素分圧が低く、細胞が死滅していたゼラチンハイドロゲル繊維に塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含ませた後、3D細胞成形体を調製した。その結果、bFGFを含ませることにより、成形体内の細胞増殖の促進が認められた。ラット骨髄から単離した未分化間葉系幹細胞に対して同じ評価を行ったところ、前述の3T3E1細胞と同じ結果が得られた。これらの結果は、当初の期待通りに、ハイドロゲル繊維を加えることで3D細胞成形体内部の栄養酸素の供給がよくなり、細胞の生存率、増殖率、および細胞機能が向上したことを示している。

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 1件）

1. 著者名 Koichiro Nakamura, Kimiaki Nobutani, Naoki Shimada, and Yasuhiko Tabata	4. 巻 26
2. 論文標題 Gelatin Hydrogel-Fragmented Fibers Suppress Shrinkage of Cell Sheet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C: Methods.	6. 最初と最後の頁 216-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.tec.2019.0348	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村耕一郎、延谷公昭、島田直樹、田畑泰彦
2. 発表標題 ゼラチンハイドロゲル断片化繊維を利用した細胞シートの収縮抑制
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

〔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
---------	---------