

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21902

研究課題名（和文）酸素生成・組織化時間制御機能を有する担体を導入した血管化培養組織の構築

研究課題名（英文）Construction of a vascularized cultured tissue by introducing oxygen-generating biomaterial.

研究代表者

梶原 稔尚 (Kajiwara, Toshihisa)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10194747

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）：培養組織構築において、血管網構築までの間、一時的に細胞に酸素を供給出来る新しい手段の確立を目指し、過酸化カルシウムを含有したコラーゲンゲルの調製と生成される酸素の放出挙動について定量的解析、ならびに細胞を用いた性能評価を行った。作製した酸素生成コラーゲンゲルは最大120時間程度の酸素生成を確認し、また1%酸素雰囲気下での肝細胞の生存を支持した。以上の結果、本手法で作製したコラーゲンゲルは細胞に対し一時的に酸素を供給可能な培養基材として有望であ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

培養組織内部に機能的な血管網を構築することは、再生医療において培養組織を移植用グラフトとして普及させるための必須の技術である。一方、細胞の酸素要求と組織構築や血管網構築に対する時間スケールのギャップが大きく、血管化培養組織構築の有効な方法の確立には至っていないのが現状である。本研究は培養組織内部での血管網構築までの間に一時的に酸素を供給出来る代替手法を提案するものであり、新しい血管化培養組織形成プロセス構築への貢献、ひいては培養組織を用いた再生医療の実現化への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new technique for providing oxygen to cells in cultured tissue formation until a vascular network is established. We created a collagen gel containing calcium peroxide and quantitatively analyzed its oxygen-release behavior. Our oxygen-generating collagen gel was able to produce oxygen for up to 120 hours, and it helped to improve the survival of hepatocytes in a hypoxic environment where oxygen levels were only 1%. Based on our findings, this collagen gel could serve as a temporary culture substrate for providing oxygen to cells.

研究分野：化学工学、高分子化学

キーワード：組織工学 バイオマテリアル ハイドロゲル 酸素供給 三次元培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器や組織の欠損や機能障害・不全に対し、「細胞」を用いてそれらの臓器や組織の再生をねらう治療概念は再生医療とよばれる。再生医療の中心となる治療は細胞移植治療である。この場合、細胞を単離・分散状態のまま移植したとしても、生着性が不良なことが多く、あらかじめ培養条件下において組織様構造物（培養組織）を形成させ、移植することが有効な手段として考えられている。このような培養組織を構築する方法として様々な方法が報告されてきた。一方、再生医療に利用されている培養組織の例は未だ少ない。これは、培養組織内部への酸素・栄養素の供給は拡散が支配的となり、生体組織に匹敵するような細胞密度で厚みのある培養組織を構築しようとすると、その内部にて酸素・栄養素の枯渇が生じてしまうためである。

(2) ここで、生体内において組織を構成する多くの細胞は、毛細血管を流れる血液との間で物質交換を行うことによって生存し、特異的機能を発揮する。このように組織の発生・構築において毛細血管網の構築は欠かせないものであり、培養組織の構築においても内部での血管網構築が注目されてきた。

(3) 培養組織体内部での血管網構築は、血管を構成する内皮細胞によるネットワーク形成と管腔化を実現する環境が重要であることはもちろんであるが、構造形成までの時間スケールが大きな問題である。内皮細胞の組織化には少なくとも数日～数週間を要する。一方、細胞が消費する基質として律速因子となるものは酸素であり、酸素は供給が止まると数分～数時間で枯渇してしまう。この時間スケールの差を解決できる組織形成誘導プロセスを構築しなくては、血管化組織の誘導は不可能である。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らは、この時間スケールのギャップを埋める方法として、血管網構築までの間、酸素供給に関する一時的な代替手段を提供することが出来れば、血管化組織誘導の実現に大いに貢献すると考えた。そのような方法として、培養組織内部で一時的に酸素を放出可能なハイドロゲルの調製に着目した。

(2) 一時的な酸素生成法として、本研究では過酸化水素 (H_2O_2) に由来する酸素生成に着目した。そして、 H_2O_2 を生成する無機過酸化物として過酸化カルシウム (CaO_2) に着目し、 CaO_2 を導入したコラーゲンゲルの調製とそこから生成される酸素の放出挙動を定量的に解析することにより、本手法の組織形成プロセスへの応用の妥当性を評価した。

(3) 一方、新しい組織形成プロセスとして、スキヤホールドフリーの状況下で迅速に培養組織の構築を目指し、間葉系幹細胞を用いたボトムアップ法による組織形成法の開発について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) コラーゲンゲルは Cellmatrix Type I-A (新田ゼラチン) を使用した。コラーゲンゲル溶液 (コラーゲン溶液、濃縮培地、再構成用緩衝液) に対し、HEPES 緩衝液に溶解した過酸化カルシウム、PBS に溶解したカタラーゼを準備し、コラーゲンゲル溶液に対しそれぞれ 40%、10% の容量比で混和し、酸素放出コラーゲンゲル溶液とした。混合溶液は 37 °C で 30 分インキュベートする事で酸素生成コラーゲンゲルを調製した。

(2) 酸素生成コラーゲンゲルからの酸素放出挙動解析のために、測定セル、DO センサーからなる測定系を構築し、開放系ならびに閉鎖系で酸素濃度の経時的測定を行った。

(3) 開放系での測定では、測定用セル底部に酸素放出ゲル 1 mL を添加し、その上に 5%- O_2 、5%- CO_2 雰囲気中で平衡化した PBS 2 mL を添加した。セル内に酸素センサーを設置後、気相を 5%- O_2 、5%- CO_2 雰囲気として PBS 中の溶存酸素濃度の経時変化を測定した。

(4) 閉鎖系での測定では、測定セル内を密閉状態とし、測定用セル底部に酸素放出ゲル 1 mL を添加し、ゲル上部空間を 5%- O_2 、5%- CO_2 雰囲気中で平衡化した PBS で平衡化した PBS で満たし、酸素センサーを用いて PBS 中の溶存酸素濃度の経時変化を測定した。

(5) 初代ラット肝細胞を調製後、酸素放出コラーゲンゲル溶液に混和し、12 ウェルプレートの

各ウェル内に 1 mL 添加し、30 分間ゲル化を行った。その後、1mL の培地を添加し、1%O₂、5%CO₂ 雰囲気下で培養を行った。ゲル内での細胞数は 5×10⁵ cells とした。培養 24 時間後に培地を回収し、漏洩した LDH の量を測定することにより系内での細胞生存率の評価を行った。

(4) スフェロイド培養容器 (EZSPHERE™, AGC テクノグラス) を用いてヒト脂肪由来間葉系幹細胞を 1 日間培養し、スフェロイドを作製した。作製したスフェロイドを回収後、血漿分離用中空糸 (旭化成メディカル) からなる自作の培養デバイス (培養空間体積: 1.3×10⁻³ cm³) に注入した。スフェロイドを固定化した中空糸は培養ディッシュ内で巡回培養を行い、スフェロイド同士の融合による紐状培養組織の形成を誘導した。同様に初代ラット肝細胞とヒト間葉系幹細胞からなる混合スフェロイドを作製し、中空糸デバイス内での紐状培養組織の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 1.04 mM から 14.9 mM の範囲で過酸化カルシウムをコラーゲンゲルに混和した酸素生成コラーゲンゲルを調製し、開放系にて放出された酸素濃度の経時的測定を行った。その結果を Fig. 1 に示す。この結果、いずれの条件においても測定初期に PBS 中の酸素濃度が急激に上昇し、その後緩やかに低下し、最終的には 5%O₂ 雰囲気下での平衡酸素濃度に漸近した。過酸化カルシウム濃度を増加することにより、最大酸素濃度および放出期間が延長され、最大酸素放出期間はおおよそ 120 時間であった。一方、ゲルにカタラーゼを添加した系では、溶存酸素の最大値は低下し、酸素放出期間の短縮が確認された。これは、カタラーゼの添加により過酸化カルシウムより生成した過酸化水素から酸素への分解が促進され、ゲル作製に要する 30 分間で酸素の最大放出が行われたためであると考えられる。

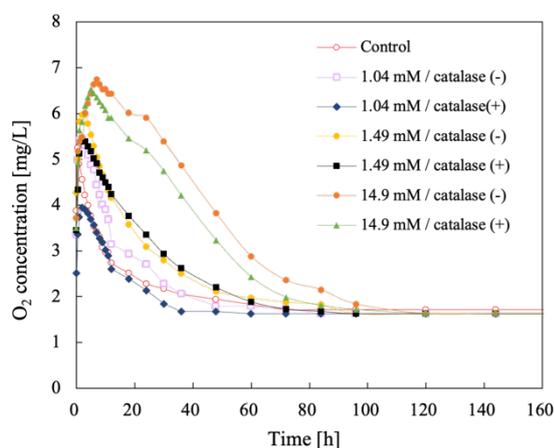


Fig. 1 開放系での溶存酸素濃度の経時変化

(2) 次に、閉鎖系での溶存酸素濃度の濃度変化より酸素移動容量係数を推算した。閉鎖系での溶存酸素濃度曲線の接線の傾きが、コラーゲンゲル層から溶液へと酸素が溶存する酸素移動速度 (OTR) を表すと仮定すると、

$$OTR = \frac{dC}{dt} k_L a (C^* - C)$$

$$\ln \frac{(C^* - C)}{(C^* - C_0)} = -k_L a \cdot t$$

C^* : 飽和溶存酸素濃度 [mol·m⁻³]

C : 溶存酸素濃度 [mol·m⁻³]

$k_L a$: 酸素移動容量係数 [s⁻¹]

t : 時間 [s]

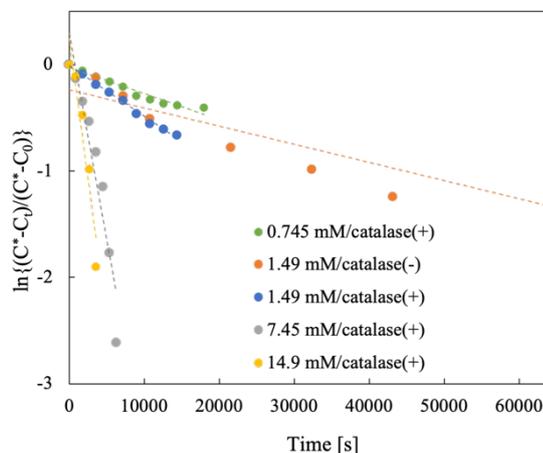


Fig. 2 閉鎖系での溶存酸素濃度の経時変化 ($k_L a$ 推算用プロット)

となる。この式に基づき、0.745mM から 14.9 mM の範囲での過酸化カルシウムを用いた条件でのプロットを Fig. 2 に示す。さらに Fig. 2 より算出した $k_L a$ 値を Table 1 に示す。

Table 1 算出された $k_L a$ 値

	Catalase (+)				Catalase (-)
CaO ₂ [mM]	0.745	1.49	7.45	14.9	1.49
$k_L a$ [s ⁻¹]	2.19×10 ⁻⁵	4.18×10 ⁻⁵	3.86×10 ⁻⁴	5.19×10 ⁻⁴	9.35×10 ⁻⁶

(3) 次に算出された $k_L a$ 値より次式を用いて培養可能な細胞数の推算を行った。

$$X = \frac{k_L a \cdot C^*}{Q} \quad \begin{array}{l} X : \text{細胞密度} [\text{cells} \cdot \text{cm}^{-3}] \\ Q : \text{酸素消費速度} [\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \end{array}$$

今、初代肝細胞の酸素消費速度を $4.0 \times 10^{-16} [\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$ とすると、過酸化カルシウム濃度が 1.49 mM 、 14.9 mM (カタラーゼ添加条件) での本系内での培養可能な細胞密度はそれぞれ $2.1 \times 10^4 [\text{cells} \cdot \text{cm}^{-3}]$ 、 $2.6 \times 10^5 [\text{cells} \cdot \text{cm}^{-3}]$ と算出された。ここで得られた細胞密度は、本研究で用いた測定セル内での培養可能な細胞密度となる。そこで次に、測定に用いた系での気液界面から細胞がゲルに包埋され、周囲のゲルから酸素を供給出来る系を想定し、界面積を換算した結果、 $10^8 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ オーダーでの細胞密度下において、細胞の生存に必要な酸素供給が短期的には可能であることが示唆され、高密度培養への適用の可能性が示された。

(4) 酸素生成コラーゲンゲル (過酸化カルシウム濃度: 1.49 mM 、 14.9 mM) に対し初代ラット肝細胞を $5 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ の密度で包埋し、 $1\% \text{ O}_2$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 雰囲気下で培養を行った。培養 24 時間後に系内に漏洩した LDH より、系内での生存率を算出した結果を Fig. 3 に示す。ここで、過酸化カルシウムを添加しない対照実験での生存率は 20.5% (Fig. 3 の点線) であった。この結果、過酸化カルシウム添加量の増加に伴い、生存率の向上が示された。このことは、低酸素環境下での細胞の生存支持に本研究で調製した酸素生成コラーゲンゲルが有効であったことを示唆している。

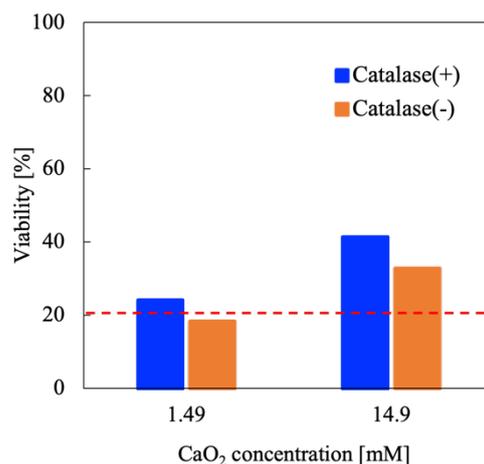


Fig. 3 各培養条件での生存率評価

(5) Fig. 3 において、カタラーゼ非添加の条件で添加の条件と比較して生存率が低下していることから、過酸化カルシウムの分解過程で生成される過酸化水素の影響であると考えられる。系内での過酸化水素濃度を測定した結果、カタラーゼ条件下では過酸化水素はほぼ検出されず、カタラーゼ非添加条件下では測定結果にばらつきが生じるものの、 $100 \mu \text{ M}$ 以下で推移することが示された。このことから、細胞傷害性を考慮するとカタラーゼの添加は必須であり、今後は細胞種による過酸化水素の感受性の違い、カタラーゼ添加条件の最適化の検討が必要である。

(6) 間葉系幹細胞からなるスフェロイドを中空糸デバイスに充填し 1 日間培養後、中空糸内部から吸引により内容物の回収を行った。その結果、紐状の培養組織が回収された (Fig. 4)。紐状培養組織は回収過程でほぼ切断されることなく回収可能であり、また、回収後もピンセットでの操作が可能な程度の力学的強度を有していた。同様に肝細胞と間葉系幹細胞からなるスフェロイドを中空糸デバイスに充填し、培養した系では中空糸培養 2 日目に紐状培養組織の回収が可能であった。この結果、スキャホールドフリーな紐状培養組織の迅速な形成誘導を達成した。

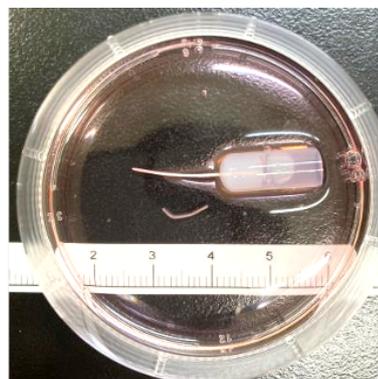


Fig. 4 中空糸デバイスから回収した紐状培養組織

(7) 以上の結果、本研究で調製した過酸化カルシウム含有コラーゲンゲルは細胞に対し一時的に酸素を供給可能な培養基材として有効であることが示唆された。また新しい組織形成プロセスとして、間葉系幹細胞を用いたスフェロイドをビルディングブロックとして積み上げるボトムアップ法について検討した結果、迅速な紐状培養組織形成を達成した。本検討では血管内皮細胞の利用には至らなかったが、間葉系幹細胞に加え、血管内皮細胞を導入することにより、紐状組織内部への血管内皮細胞の配置が可能となる。さらに酸素生成コラーゲンゲルを組み合わせることにより、組織形成の間に一時的に細胞への酸素供給が実現できる。今後、酸素放出期間の延長のために過酸化カルシウムの徐放制御等、さらなる工夫が必要であると考えられるが、本研究の遂行は血管化された培養組織を構築する新たなプロセス提案に貢献できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土光悟史, 励騰暢, 堺裕輔, 水本博, 井嶋博之
2. 発表標題 ヘモグロビンと過酸化物質からなる新規酸素キャリアを用いた培養初期における播種肝細胞への低酸素状況の改善
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2022年度九州ブロック研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島内崇太郎, 山本涼太, 水本博, 梶原稔尚
2. 発表標題 スフェロイドを用いたボトムアップ法による迅速組織形成法の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2022年度九州ブロック研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 励騰暢, 水本博, 梶原稔尚
2. 発表標題 酸素徐放可能な細胞足場材料の作製とその酸素供給能評価
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2022年度九州ブロック研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tengchang Li, Ryowa Saito, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Preparation of an oxygen release hydrogel and its functional evaluation for animal cell culture
3. 学会等名 The 33rd International Symposium on Chemical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水本博, 山本涼太, 島内崇太郎, 中野翔太, 梶原稔尚
2. 発表標題 ボトムアップ法によるscaffold-free培養組織の迅速形成
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 励騰暢, 齊藤凌我, 水本博, 梶原稔尚
2. 発表標題 一時的に酸素徐放が可能な細胞足場材料の作製とその機能評価
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島内崇太郎, 山本涼太, 水本博, 梶原稔尚
2. 発表標題 間葉系幹細胞を用いた培養組織の迅速形成
3. 学会等名 日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井形真也, 谷口諒, 水本博, 梶原稔尚
2. 発表標題 中空系内三次元培養によるiPS細胞の効率的な内胚葉分化の試み
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2021年度九州ブロック学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水本博, 山城寿, 梶栗尚明, 梶原稔尚
2. 発表標題 初代肝細胞の中空系内三次元培養における生存率および機能発現解析：内径およびアポトーシス阻害剤添加効果
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水本 博、谷口 諒、井形 真也、梶原 稔尚
2. 発表標題 中空系を用いたiPS細胞の増殖と内胚葉分化誘導
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水本 博、谷口 諒、井形 真也、梶原 稔尚
2. 発表標題 中空系内三次元培養によるiPS細胞の内胚葉分化誘導
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山城寿、梶栗尚明、水本博、梶原稔尚
2. 発表標題 肝細胞の中空系内三次元培養における生存率解析とその向上に関する検討
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水本博、中野翔太、梶原稔尚
2. 発表標題 間葉系幹細胞からなる紐状組織形成法の開発
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会・第36回日本生体磁気学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口諒、水本博、梶原稔尚
2. 発表標題 中空系内三次元培養を用いたiPS細胞の内胚葉分化誘導
3. 学会等名 化学工学会九州支部オンライン学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野翔太、水本博、梶原稔尚
2. 発表標題 中空系を鋳型とした間葉系幹細胞由来三次元組織の形成誘導
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2020年度九州ブロック学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水本博、谷口諒、梶原稔尚
2. 発表標題 中空系を用いたiPS細胞の高密度培養と内胚葉分化
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	水本 博 (Mizumoto Hiroshi) (90346817)	九州大学・工学研究院・准教授 (17102)	

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