

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0112

研究課題名（和文）機能的三次元組織バイオプリンティングのための生物活性インクライブラリの獲得

研究課題名（英文）Development of a bioactive ink library for functional three-dimensional tissue bioprinting

研究代表者

境 慎司（SAKAI, SHINJI）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：3Dプリンティングは、複雑な内部構造を持つ構造体の造形を可能とする。特に、インクに細胞を含ませて用いるバイオプリンティングは、従来技術では造形できなかった機能的な組織や臓器の代替物の作製を実現する技術として期待されている。そして、その実現には、プリンタの進化とともにインクの進化が不可欠である。本研究では、フランスの研究グループと共同研究にて、新たな生物活性物質を天然資源の中から見出し、それに必要な機能を付与し、あらたなインク材料を獲得することを目的として検討を行った。この検討の結果、ポリグルクロン酸をはじめとする複数の多糖を見出し、主要なものについては特許出願と学術論文の発表に至る成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3Dプリンティングは、複雑な内部構造を持つ構造体の造形を可能とする。特に、インクに細胞を含ませて用いるバイオプリンティングは、現状はまだ不可能なものの、従来技術では造形できなかった機能的な組織や臓器の代替物の作製を実現する技術として期待されている。特に、社会的には、この技術の成熟は移植待機患者の命を救うこと、医療コストの削減や治療の質の向上にも寄与すると期待されている。本研究の成果として有望なインク材料を獲得できたことは、バイオプリンティングに重要な前進をもたらすものと期待される。

研究成果の概要（英文）：3D printing enables the modeling of structures with complex internal structures. In particular, bioprinting, which uses cells in ink, is expected to be a technology that will enable the fabrication of functional tissue and organ substitutes that cannot be modeled with conventional technologies. In addition to the evolution of printers, the evolution of inks is indispensable to realize this technology. In this study, in collaboration with a research group in France, we investigated the possibility of finding new bioactive substances from natural resources, giving them the necessary functions, and obtaining new ink materials. As a result of this study, several polysaccharides were discovered, including polyglucuronic acid, and major results were obtained that led to patent applications and the publication of scientific papers.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオプリンティング 組織工学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

3D バイオプリンティングは、細胞を含む生物活性インクを用いて、生体組織や臓器の構造を三次元的に再現する技術である。この技術は、細胞やバイオマテリアルを精密に配置し、複雑な組織構造を構築することを可能にする。また、再生医療や薬剤開発の分野で新たな可能性を開拓する手段として注目されている。このようなことから、世界中で研究が活性化しており、2019年4月には、テルアビブ大学のグループが、*Advanced Science* 誌にて、患者から採取した組織の成分と細胞を含むインクを用いて、心臓を模倣した構造の組織を造形したことを報告し(*Adv Sci* 1900344 (2019))、日本でも各種メディアで紹介された。また、同年5月には、ライス大学のグループが *Science* 誌にて肺を模倣した構造体の造形を報告し(*Science* 364:458 (2019))、同誌の表紙で紹介されるとともに、やはり多くのメディアで紹介された。しかし、これらの最先端とされる研究成果であっても、形状は組織や臓器の再現に近づいている一方で、機能に関しては生体のものと比較できるようなレベルにはなかった。この原因については、生体の臓器や組織では、様々な種類の細胞が精密に適所配置されることで機能を発現しているのに対して、精密な細胞配置を実現する 3D プリント法および、細胞種毎に適切な環境を与える機能を有するインクが十分に開発されていないためと考えられていた。

研究代表者は、約 10 年前から、細胞に穏和な酵素反応を経て得られる多糖やタンパク質のゲルを使った再生医療・組織工学に関する研究を行っていた。そして、その酵素反応をインクの定着(ゲル化)に適用するバイオプリンティング技術の開発に成功し、世界に先駆けて、異なる高分子を主成分とする複数のインクを用いた 3 次元構造体の造形に成功していた (*Macromol Rapid Commun* 39:1700534(2018))。一方、この酵素反応を経てゲル化するバイオプリントで使用可能なインクのレパートリーは、機能的な組織や臓器の代替物の作製という視点からは未だ不十分であった。このような状況下において、本研究の共同研究先と 2019 年 4 月に共同研究を開始した。この共同研究を通して、本研究の共同研究先がフランスをはじめとする世界中の微生物・植物等から、さまざまな物質を抽出し、その生物活性を明らかにするとともに、その利用を目指した研究を展開してきたことを知り、双方の研究を融合することで、より高い機能を持った組織体の構築につながるインクの獲得ができるようになるに至った。

2. 研究の目的

上述したように 3D バイオプリンティングは、細胞を含む生物活性インクを用いて、生体組織や臓器の構造を三次元的に再現する技術である。この技術は、細胞やバイオマテリアルを精密に配置し、複雑な組織構造を構築することを可能にする。また、再生医療や薬剤開発の分野で新たな可能性を開拓する手段として注目されている。そして、この技術が広く社会で利用されるようになるためには、3D プリンタの進化とともにインクの進化が不可欠である。本研究では、インクの進化に不可欠な新たな生物活性物質を天然資源の中から見出し、それに必要な機能を付与することで、それらの材料からなるインク材料を獲得することを目的とした。すなわち、機能的な組織の形成に必要な各種細胞応答を誘導する生物活性物質を、海外共同研究者がさまざまなバイオリソースから獲得してくる物質の中から見だし、インクとして利用可能な機能を付与するとともに有用性を実証し、より機能的な構造体のバイオプリンティングを達成することを目的とした。

3. 研究の方法

フランスの共同研究先で有望性を見出したポリグルクロン酸、ウルバン、昆虫由来キトサンなどの多糖に関して、インクに使用するために必要となるフェノール性水酸基、メタクリレート基の化学修飾を行った。また、線維芽細胞増殖因子などのサイトカインの安定性を高めたり、それらの徐放に寄与したりする効果が知られている硫酸基の修飾も、各官能基の導入量を制御しながら行った。これらの化学修飾が想定通り進んだことの確認は、NMR や Uv-vis 法を使った評価により行った。また、微量の過酸化水素存在下で西洋わさび由来ペルオキシダーゼが触媒する架橋形成反応の速度を評価するための、水溶液のゲル化時間測定や、得られるゲルの力学的強度測定などを行った。さらに、得られるゲルの中に動物細胞を包括し、その生存・増殖を調べることで、化学修飾後の材料の細胞毒性を評価した。さらに、水溶液を用いた 3D バイオプリンティングを実施することで、造形性の面からのインク材料としての有用性の評価も行った。

これらの研究に加え、共同研究先が所有する微生物培養槽を用いて、pH、温度などの培養条件が得られる細胞外多糖の特性に与える影響や、多糖の収量に与える影響に関して検討を行い、将来の実用化において不可欠な大量調製に関する知見を得るための実験を実施した。

4. 研究成果

主たる成果として、ポリグルクロン酸に関する成果を示す。このポリグルクロン酸は、アルファアルファ根粒菌 *S. meliloti* M5N1CS を培養槽で培養した際に、菌体外に精製される多糖である。これまでに、ポリグルクロン酸はバイオインク材料として使用されたことが無いため、まず、水溶液の粘度特性を評価した。その結果、Fig 1 に示すように、バイオインク材料として頻用され

るアルギン酸ナトリウム水溶液よりも、剪断力をかけた際に生じる粘度の低下の程度が大きく、押し出し式バイオプリント用インク材料に適した特性を有していることを明らかにすることができた。次いで、等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いた解析により、西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応に必要な官能基を修飾しなくても、カルシウムイオンと接触させることで水溶液をゲル化できることを明らかにした (Fig 2)。すなわち、ポリグルクロン酸は、化学修

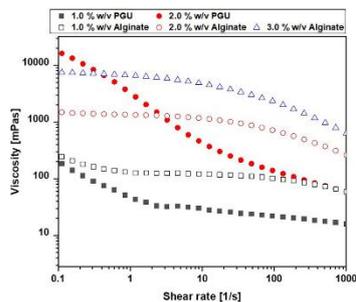


Fig 1. Shear rate-viscosity profiles of 1.0 and 2.0 % w/v PGU solution and 1.0, 2.0, and 3.0 % w/v sodium alginate solution at 25 °C. (Ref 1)

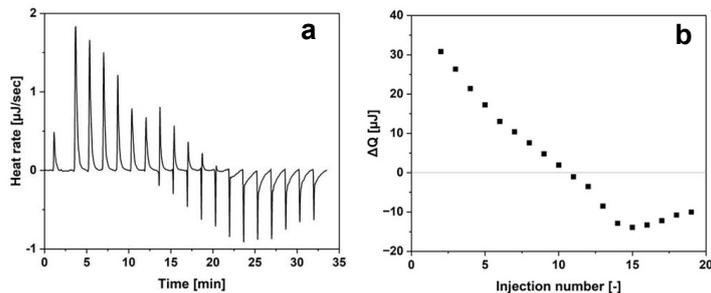


Fig 2. (a) ITC thermogram of binding interaction of 10 mM HEPES solution (pH 7.4) containing 0.1 % w/v PGU to 10 mM HEPES solution (pH 7.4) containing 10 mM CaCl₂. (b) Binding isotherms of the area of each peak in ITC thermogram. (Ref 1)

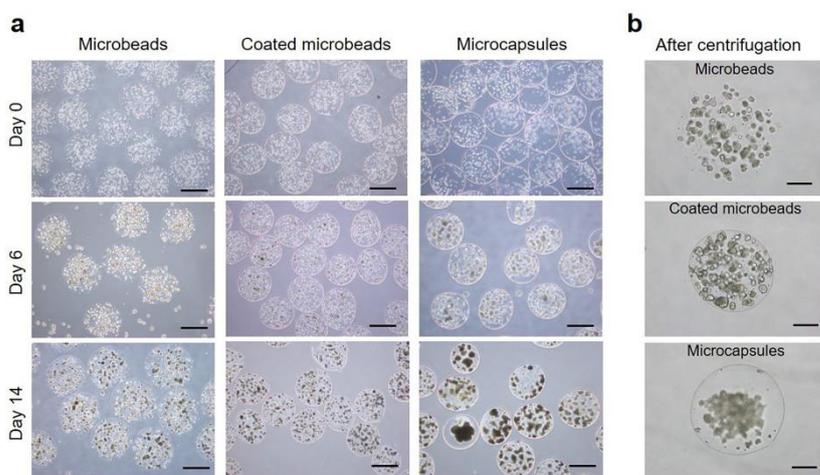


Fig 3. (a) Micrographs of PGU microparticles encapsulating HepG2 cells on days 0, 6, and 14. Scale bars 500 μm. (b) Photomicrographs of PGU microparticles on day 6 after centrifugation at 1500 rpm for 2 min. Scale bars 200 μm.

飾を行わなくてもバイオプリント用のインクとして利用できることを見出した。この知見に基づいて、細胞を分散させたインクとしてカルシウムイオンを含む水溶液に、微細な液滴として滴下したところ、細胞の生存を損なうことなくゲルビーズが形成され、その内部で細胞が増殖することを見出した (Fig 3)。

続いて、このようにインクジェット式バイオプリントのインク材

料として有望な特性を有するポリグルクロン酸に対して、押し出し式バイオプリント用インクとして利用するために、西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応で架橋することができるフェノール性水酸基を導入した (Fig 4a)。その結果、これまでに合成していたアルギン酸やヒアルロン酸などの他の高分子の場合と同様に、透明度の高いゲルを得ることができた (Fig 4b,c)。また、他のインク材料と同様に、ゲル化時間を酵素濃度、高分子濃度、過酸化水素濃度により容易に制御できることや、力学的特性についても制御できることを明らかにすることができた (Fig 5)。このポリグルクロン酸誘導体に関して、西洋わさび由来ペルオキシダーゼと一緒に水溶液に

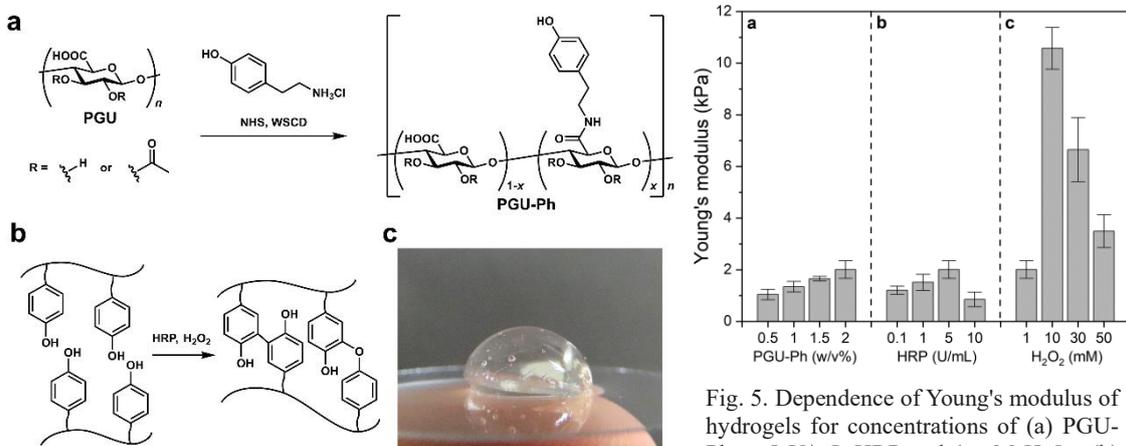


Fig 4. (a) Synthetic scheme of PGU-Ph, (b) cross-linking scheme of PGU-Ph through HRP-mediated reaction, and (c) photo of PGU-Ph hydrogel obtained through HRP-mediated reaction. (Ref 2)

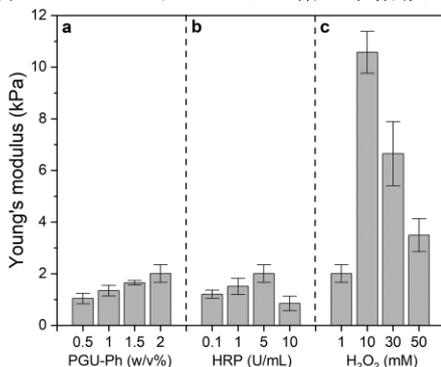


Fig 5. Dependence of Young's modulus of hydrogels for concentrations of (a) PGU-Ph at 5 U/mL HRP and 1 mM H₂O₂, (b) HRP at 2.0 w/v% PGU-Ph and 1 mM H₂O₂, and (c) H₂O₂ at 2.0 w/v% PGU-Ph and 5 U/mL HRP. (Ref 2)

溶解し、過酸化水素を含む空气中に押し出し式バイオプリンタを用いて吐出したところ様々な形状の構造物をプリントできた (Fig 6)。さらに、その構造物中に含ませたマウス線維芽細胞は、ほぼ増殖せずに1週間以上生存し、ヒト肝臓ガン由来細胞は増殖した。このことから、ポリグルクロン酸誘導体のみを含むインクは、接着性の弱い細胞の増殖に適した環境を与えることがわかった。

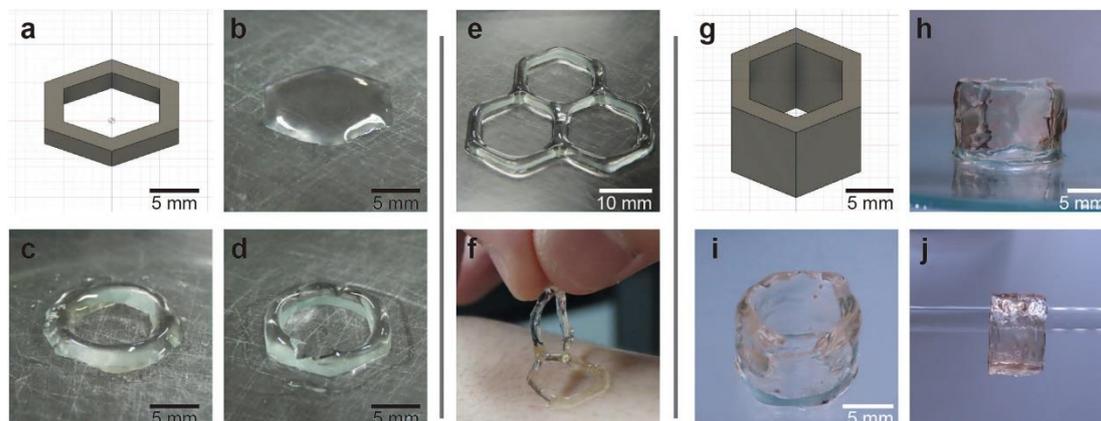


Fig 6. (a) Blueprint of a hexagonal cell with 2 mm height, and photos of (c) 1.0 w/v% and (b, d) 2.0 w/v% PGU-Ph inks extruded onto substrates based on the blueprint in air (b) non-containing and (c, d) containing H_2O_2 . Photos of printed 2.0 w/v% PGU-Ph constructs with (e) triple hexagonal cells and (f) picked double hexagonal cells put on skin. (g) Blueprint of a hexagonal cell with 10 mm height, and (h, i) photos of 2.0 w/v% PGU-Ph hydrogel constructs taken from different viewpoints and (j) the hydrogel construct threaded with glass tube. (Ref 2)

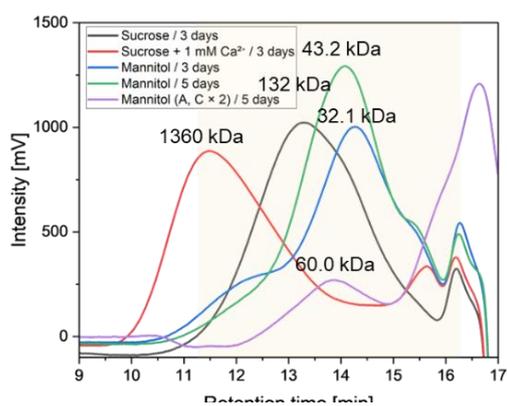


Fig 7. GPC chromatograms and molecular weight of polyglucuronic acid cultured under different conditions.

このポリグルクロン酸誘導体に対して、硫酸基を修飾したところ、線維芽細胞成長因子に対する親和性の高いゲルを得ることができ、このゲルは生体に埋め込んだ際に血管新生を促進する機能があることを見出すことができた。同様の方法により、ウルバンやラムナン硫酸、シュガービートペクチン、キトサンについても新たなインク材料として獲得することができた。

特にポリグルクロン酸については、培養槽を用いた培養条件と得られるポリグルクロン酸の物性に関する検討も実施し、培養液中にスクロースやマンニトールなどを添加することによって、収量や分子量を制御できることを明らかにすることができた。

き、今後のポリグルクロン酸の大量製造につながる知見を獲得することができた。

参考文献

- 1) Goto, R.; Nakahata, M.; Delattre, C.; Petit, E.; El Boutachfaiti, R.; Sakai, S. Fabrication of cell-laden microbeads and microcapsules composed of bacterial polyglucuronic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023, 244, 125481, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125481.
- 2) Sakai, S.; Kotani, T.; Harada, R.; Goto, R.; Morita, T.; Bouissil, S.; Dubessay, P.; Pierre, G.; Michaud, P.; El Boutachfaiti, R.; et al. Development of phenol-grafted polyglucuronic acid and its application to extrusion-based bioprinting inks. *Carbohydr. Polym.* 2022, 277, 118820, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118820.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sakai Shinji, Morita Takahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 One-Step FRESH Bioprinting of Low-Viscosity Silk Fibroin Inks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 2589 ~ 2597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.2c00269	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 -
1. 著者名 Mubarak Wildan, Elvitigala Kelum Chamara Manoj Lakmal, Sakai Shinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Tuning Myogenesis by Controlling Gelatin Hydrogel Properties through Hydrogen Peroxide-Mediated Cross-Linking and Degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 387 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gels8060387	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 Elvitigala Kelum Chamara Manoj Lakmal, Mubarak Wildan, Sakai Shinji	4. 巻 14
2. 論文標題 Human Umbilical Vein Endothelial Cells Form a Network on a Hyaluronic Acid/Gelatin Composite Hydrogel Moderately Crosslinked and Degraded by Hydrogen Peroxide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 5034 ~ 5034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym14225034	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 Goto Ryota, Nakahata Masaki, Sakai Shinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Phenol-Grafted Alginate Sulfate Hydrogel as an Injectable FGF-2 Carrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 818 ~ 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gels8120818	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 Sakai Shinji, Kotani Takashi, Harada Ryohei, Goto Ryota, Morita Takahiro, Bouissil Soukaina, Dubessay Pascal, Pierre Guillaume, Michaud Philippe, El Boutachfaiti Redouan, Nakahata Masaki, Kojima Masaru, Petit Emmanuel, Delattre Cedric	4. 巻 277
2. 論文標題 Development of phenol-grafted polyglucuronic acid and its application to extrusion-based bioprinting inks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 118820 ~ 118820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2021.118820	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 該当する

1. 著者名 Sakai Shinji, Harada Ryohei, Kotani Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Freeform 3D Bioprinting Involving Ink Gelation by Cascade Reaction of Oxidase and Peroxidase: A Feasibility Study Using Hyaluronic Acid-Based Ink	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1908 ~ 1908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11121908	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 Mubarak Wildan, Elvitigala Kelum Chamara Manoj Lakmal, Nakahata Masaki, Kojima Masaru, Sakai Shinji	4. 巻 11
2. 論文標題 Modulation of Cell-Cycle Progression by Hydrogen Peroxide-Mediated Cross-Linking and Degradation of Cell-Adhesive Hydrogels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 881 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11050881	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 Goto Ryota, Nakahata Masaki, Delattre Cedric, Petit Emmanuel, El Boutachfaiti Redouan, Sakai Shinji	4. 巻 244
2. 論文標題 Fabrication of cell-laden microbeads and microcapsules composed of bacterial polyglucuronic acid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 125481 ~ 125481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2023.125481	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 後藤良太, Cdric Delattre, 堀口一樹, 小嶋勝, 境慎司
2. 発表標題 ポリグルクロン酸の細胞包括マイクロ粒子への応用
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日高光将, Zhang Colin, 小嶋勝, 中畑雅樹, 堀口一樹, 岡野泰典, 境慎司
2. 発表標題 高度な細胞培養足場構築を目的としたマルチマテリアル3Dバイオプリンティング用単一ノズルの開発
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 Elvitigala Kelum Chamara Manoj Lakmal, Wildan Mubarak, 堀口一樹, 小嶋勝, 境慎司
2. 発表標題 Human umbilical vein endothelial cell behavior on Gelatin-Ph/HA-Ph composite hydrogel obtained via
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤良太, Cedric Delattre, 堀口一樹, 小嶋勝, 境慎司
2. 発表標題 新規多糖の骨組織工学への応用
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 粉谷 聖, 堀口 一樹, 小嶋 勝, 境 慎司
2. 発表標題 支持材料とインクの交互積層による可視光架橋3Dバイオプリンティング手法の開発
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 境 慎司
2. 発表標題 酵素を使った3Dバイオプリンティング
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 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 境 慎司
2. 発表標題 酵素を使った医療・ヘルスケアのためのものづくり
3. 学会等名 第15回 メタボロームシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 崇裕・中畑 雅樹・小嶋 勝・境 慎司
2. 発表標題 3Dバイオプリンティングによる水性二相系インクを用いたヒドロゲルファイバーの作製
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 原田 涼平・中畑 雅樹・小嶋 勝・境 慎司
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた気泡を孔源とする多孔質ヒドロゲル構造体の作製
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 KITATANI Yuki, SHIRAIISHI Yasuhiro, NAKAHATA Masaki, KOJIMA Masaru, HIRAI Takayuki, SAKAI Shinji
2. 発表標題 Biocompatible solar hydrogelation mediated by resorcinol-formaldehyde resins and horseracdi h peroxidase
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidaka Mitsyuki, Kojim Masaru, Nakahata Masaki and Sakai Shinji
2. 発表標題 Photocurable chitosan ink with rapid gelation for extrusion-based/vat polymerization-based printings
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wildan Mubarak, Masaki Nakahata, Masaru Kojima, Shinji Sakai
2. 発表標題 Influence of Hydrogen Peroxide-Mediated Crosslinking and Polymer Degradation to Cells Adhesion
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wildan Mubarak, Masaki Nakahata, Masaru Kojima, Shinji Sakai
2. 発表標題 Modulation of Cells Adherence by Hydrogen Peroxide-Mediated Crosslinking and Polymer Degradation
3. 学会等名 The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 POLYMERIC COMPOUND OF GLUCURONIC ACID WITH PHENOLIC GROUPS, GELFORMING COMPOSITION COMPRISING SUCH A COMPOUND AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME	発明者 DELATTRE C, SAKAI S, et al	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、BNT230997EP00 ELD/AB	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	小嶋 勝 (Kojima Masaru) (00533647)	大阪大学・基礎工学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	中畑 雅樹 (Nakahata Masaki) (40755641)	大阪大学・基礎工学研究科・助教 (14401)	

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		
フランス	University of Clermont Auvergne	University of Picardy Jules Verne	