

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650112

研究課題名（和文） 細胞鋳型による人工細胞外マトリクスの 3 次元配列制御に関する研究

研究課題名（英文） Study on three-dimensional arrangement control of an artificial extracellular matrix by imprinting cell surface morphology

研究代表者

小林 尚俊 (KOBAYASHI HISATOSHI)

独立行政法人物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・グループリーダー

研究者番号：90354266

研究成果の概要（和文）：

角膜実質の超微細構造の発生メカニズムに関して、個体発生時の体積膨張に起因する組織への張力とそれに応答する細胞の骨格構造が鋳型になり形成するという作業仮説を証明するために、発生環境を模倣した流動式培養システムとナノファイバーECMモデル構築を行った。モデルECMに対して培地が流れる水圧により力学刺激を導入することで、細胞が外力に応答しながら周囲の人工ECMを束ね再配列を行う様子が観察され、細胞の関与した構造形成の逐次変化を観察可能なシステムが出来上がった。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism for generating the superstructure of corneal stroma was investigated. In a part of the generating the superstructure, we are hypothesizing as follows, the cells rearrange the ECM and play a role as the mold of the superstructure. To prove the hypothesis, we developed the new artificial ECM model using electrospun nanofibers and combined with fluid type culture system to give the condition similar to the tissue generation. In this system, the cell and the artificial ECM seems to be gotten the tensioning force by the medium flow, it's mimicking the force that created by the expansion of the tissue in the process of tissue generation. Under the condition, many cells bundled the nanofibers up and rearranged the ECM direction. A part of the structure looks similar to the natural corneal superstructure. We believe this system will be powerful tool to investigate more detail mechanism to create the superstructure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学 高次構造組織化

1. 研究開始当初の背景

日本国内では年間2万人以上の患者が、角膜移植の対象疾患で移植治療を待っているが、角膜移植が行われるのは年間1600人程度である。

この現状は、移植用角膜の不足が主要因であり角膜実質代替材料の開発が強く望まれている。移植用角膜の代替材料の研究として、透明な高分子系材料を用いた人工角膜の開発と

再生医学の側面からの角膜再生の研究がこれまでなされてきた。人工角膜の開発においては、提案者も一定の成果を挙げてきたが、長期安定に機能する材料開発には未だ到っていないのが現実である（参考文献：1. Materials Science & Engineering, C, 24, 729-735(2004)、2. J. Biomed. Mater. Res. B, Appl. Biomater., 56-63(2006)。再生医療からの取り組みでは、角膜上皮、角膜内皮再生の試みは臨床応用にまで到達し、大きな成果が得られている（参考文献：Nishida et al, NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 351 (12): 1187-1196(2004)。しかし、角膜のほぼ90%を占める実質部分の再生に関しては、フランスを中心としたEUプロジェクトで磁場配向コラーゲンの研究やカナダのMay Griffithらによる生体高分子、合成高分子相互間入型の人工実質の開発試みられているが未だ臨床にたる再生技術は開発されていない。

2. 研究の目的

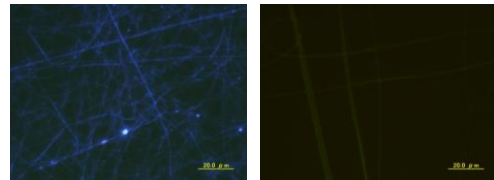
我々は、移植用角膜が必要量の十分の一に満たない現状を鑑み、長期間にわたって生体で安定に機能する角膜実質代替人工材料の構築法に関し研究をすすめている。角膜が透明なのは、コラーゲン繊維が光の乱反射を起こさない間隔で並んでいるためである。本研究では、角膜固有の構造（コラーゲンが高度に配向し、その層が90度回転するように積層した多層構造体）を細胞の特性を利用して人工的に構築する手法に関する基礎研究を行った。我々は、角膜発生初期段階に於ける爆発的な体積の増加とそれに伴った組織、細胞及び細胞外マトリクスへの張力が角膜の固有構造を作り上げるひとつの要因であると推定し、この作業仮説を、角膜の発生を模倣した環境で培養した細胞とインテグリンレセプターと結合可能な合成ナノ繊維を使って実証することを試みた。

3. 研究の方法

細胞表面のインテグリンレセプターと相互作用可能な表面を有するナノファイバーを電界紡糸技術を用いて調整し、モデル人工ECMの合成を行い、蛍光ラベルしたモデルECMを用いて、角膜実質細胞の平板および3D培養を行った。この平板および3次元ゲル培養に対して、角膜用に改良を加えるバイオリクターを用いてストレスを与えるとともに、角膜発生初期に見られる生体分子の変化を再現する環境を整えることで、細胞を鋳型とした構造形成が起こるか、また、ナノファイバーをベースとした無定形3次元マトリクスからの配向構造の出現が観察されるかを共焦点レーザー顕微鏡などを用いて詳細に検討した。角膜実質組織構造構築に及ぼす応力の果たす役割を明確にするとともに、角膜実質再生に対する基礎的知見を収集した。

4. 研究成果

研究準備として、人工ECMモデルとしてのナノ繊維の合成を行った。本実験を行うために最適な系を探索するために、多数のバイオポリマー、合成高分子材料などのナノファイバー化の検討を進めた。より明確な可視化が行えるように、電界紡糸用の高分子溶液に蛍光色素を添加し紡糸する方法の検討を行った。一例としてECMの主成分であるコラーゲンのDAPI色素含有コラーゲン再生ナノ繊維の蛍光顕微鏡像を示した（図1参照）。この手法を用いることで人工ECMの可視化が可能であった。

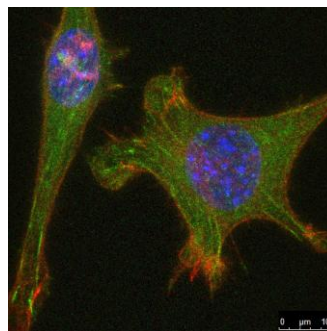


1) DAPI 添加 2) 無添加自家蛍光

図1：DAPI含有コラーゲンファイバーの蛍光顕微鏡写真

次に、細胞核、細胞内骨格構造をマイクロフィラメント (F-Actin)、微小管 (Tubulin) で、Integlinレセプターの局在状態 (接着班) をVinculinで染め分ける条件を整えた (図2)。

次に、PDMS細胞培養基材上で家兎から採取した角膜実質細胞を培養し、2次元1軸引っ張り付加を与えられる培養モデルを構築した。細胞接着を促すために、PDMSシート上に0.5mg/mlのコラーゲン溶液を滴下し、60分間吸着処理を施した後に、余剰溶液を除き、風乾処理を行った後に、PBS (-) で洗浄処理を行い基材とした。続いて、基材を図3に示す1軸延伸可能な治具へ取り付け、実験に供した。



青:核、緑:F-actin、オレンジ: Vinculin

図2細胞骨格とレセプターの局在状態

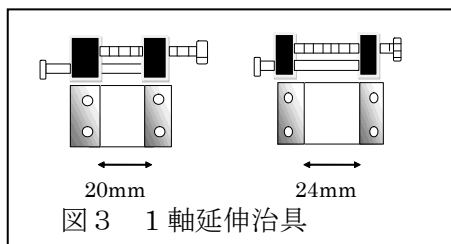
今回は、雛角膜から採取した角膜実質様細胞をモデル細胞として用いた。

DMEM-1000mg グルコース 10%FBS

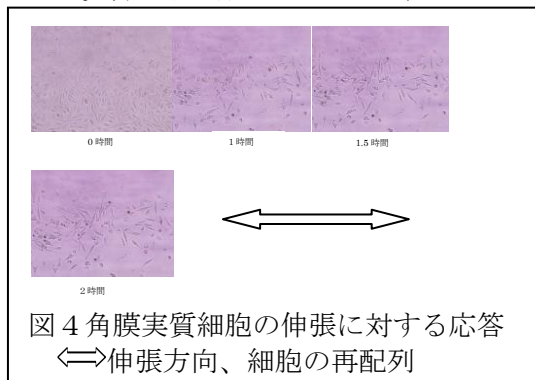
2%PC/SM培養液中に 5×10^4 の細胞を分散させ、上記治具にセットした基材上に播

種し、2時間培養を続けた。その後、20%の延伸を行い、その後、5分ごとに写真撮影を続け細胞の形態変化、配向性の変化の観察を行った。結果を図4に示した。伸張を加えた直後から細胞の運動性が大きくなり、ランダムに接着していた角膜実質様細胞が、張力の方向に対して30-60度の角度で接着する細胞の数が増加した。これらの現象は、2時間をピークに減少に転じ、再度ランダムな接着へ移行する様子が観察された。この培養システムを用いて、引っ張り刺激を受ける細胞の応答を検討した結果、これまでに他の研究で示されているように2次元の引っ張りに対して角膜実質細胞も一定の方向を向いた配列構造をとり、外力に応答することが判明した。しかしながら、刺激に対する応答は一過的であり繰り返し刺激、刺激によるECM等の配列の継続的変化がない限り細胞を鋳型とした構造形成は起こりえないと結論された。

次に、これらの結果を踏まえ、人工ECM基材としてナノファイバーモデルの構築を行った。角膜実質部は、コラーゲンのナノファイバーの周りに、硫酸化多糖であるデコリンが結

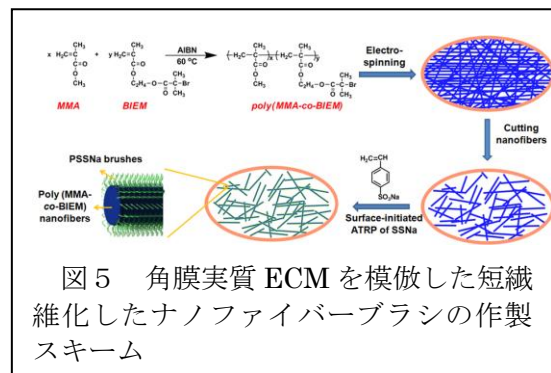


合したファイバーブラシ構造を有し、高濃度の糖鎖に対する水の浸透圧を利用して角膜内への房水の引き込みを行い、一方で角膜内皮細胞のポンプ機能の働きで侵入した房水を掻き出すことで角膜の含水率を約80%に保っている。含水率が保たれることで、コラーゲ

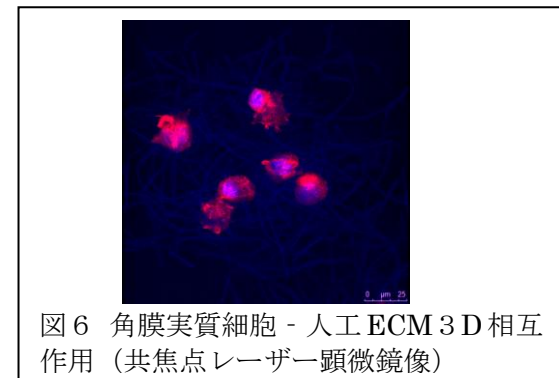


ンファイバーのファイバー間距離が保たれ、結果として規則的な格子構造が維持されるために角膜は透明な高次構造体となっているわけである。ナノファイバーの配向制御を行う前に、コラーゲン繊維-デコリン複合体をミミックした足場材料の構築を試みた(図5参

照)。モデルファイバーとして、MMA-BIEMのランダム共重合体をラジカル重合により合成して、これを原料として電界紡糸を行い、ナノファイバー表面にATRPの開始基を持つナノファイバーを合成した。その後、このナノファイバー不織布をホモジナイザーを用いてカットし、この短繊維に対してスチレンスルホン酸ナトリウムの表面リビングラジカル重合をATRP法を用いて行った。結果として、ナノファイバー上に、水溶性高分子鎖であるSSNaが高分子ブラシ状態でグラフトされた平均直径2μm、繊維長200μm程度のマルチ分散した新たな角膜ECM模倣材料を創製することができた。角膜実質細胞と高分子電解質から



なるナノファイバー-ブラシの短繊維を一定条件のもと混合し培養を行うと細胞-ナノファイバーの集合体形成を認め、数日間の培養では細胞生存、高次構造体の維持が確認された。この状態を詳細に検討するために繊維と細胞の状態の可視化を実現するために、あらかじめ繊維を蛍光ラベルし細胞との3D相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図6参照)。



その結果、平板培養や、ゲル培養とは大きく異なる、細胞がナノ-マイクロファイバーを立体的に握りこむ様子(細胞と人工繊維状ECMの3D相互作用)が可視化された。この技術を展開して外場からの力を加えることで細胞の3D応答が可視化できる可能性を示せた。最後に、細胞の鋳型化が起こるのかを検証す

るために、電界紡糸ナノファイバー不織布を用いた3D バイオリアクターシステム構築を行った。

市販の還流培養装置の流路を培養液が3Dファイバー構造体の中を一方向に通過するようにし(図7参照)、3D足場に一定のテンションがかかるように工夫した培養器で、培養基材部にファイバー不織布をセットして角膜実質細胞を播種し、3週間の培養を行った。培養の概要は以下の通りである。円筒形の培養チャンパー部に上記で作製したナノファイバー人工ECMを挟み込むように設置し、そこにヒヨコ角膜実質細胞様細胞を 1×10^4 個播種したファイバーサンプルを設置し、10%FBS, 2%抗生物質(PC/SM)及び $50 \mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸を添加したDMEM Low glucoseを流速 1.41 ul/min で培養を行った。

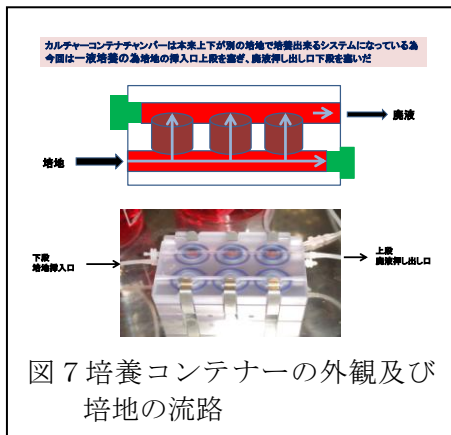


図7 培養コンテナの外観及び培地の流路

流動式培養システムとナノファイバー人工ECMを組み合わせた培養システムであるために、播種細胞および人工ECMには、メディウムの流れにより発生するテンションが培養中常にかかることになる。また、テンションの懸り方培養ホルダー部分が円筒形であるため、風船が膨らむように球面上に等張にかかると考えることができ、これは、提案当初のモデルに近い力学刺激が細胞に与えられるシステムであると考えられる(図8参照)。

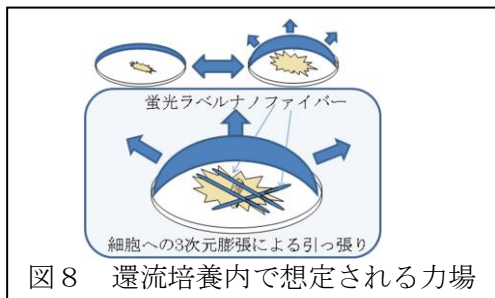


図8 還流培養内で想定される力場

培養を続ける中、経時的にナノファイバーと細胞の相互作用の様子を観察した結果、生着細胞は周囲のナノファイバーを引き寄せ束ねるような様子を示すSEM像が観察された(図9)。今回用いた円筒形のリアクターでは、通過する培地でナノファイバー不織布は

ある種風船が膨らむような力のかかり方をする。細胞のモデルファイバー引き込みは、角膜の層構造形成と超微細構造形成のメカニズムを解き明かす手がかりと成り得る。個体発生当初の体積増加により引き起こされるECMへの張力とそれに応じた細胞の応答が引き起こす周囲環境の再構築(ニッチ構築)の結果として角膜実質の超微細構造が形成されると推定される。3週間後のファイバーを観察すると、生体角膜実質の持つ、ECMが細胞周囲でクロスする超微細構造に類似した構造をとっている部分も見受けられた。しかし、細胞が鋳型となってファイバーの配向が層によって90度回転してゆく構造の形成メカニズムは証明できておらず更なる検討を要する。

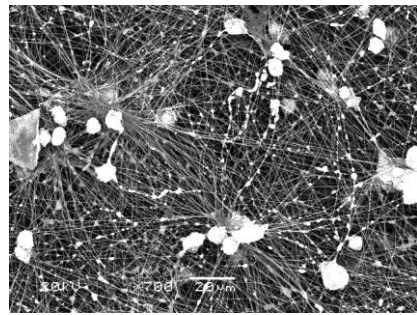


図9 培養3週間後のSEM像
細胞がナノファイバーを束ね再配列

まとめ

今回の一連の研究において、ナノファイバーをモデルECMとしてそこに外場からの力学刺激を導入することで、細胞が外力に応答して周囲の人工ECMを束ねながら再配列を行う様子が観察され、細胞の関与した構造形成の逐次変化を観察可能なシステムが出来上がった。しかしながら、本来本研究で予定していた、角膜の超微細構造構築のメカニズムを解明するという目標は未だ十分とは言えず、本挑戦的萌芽研究で生み出した新たな研究手法を用いて今後詳細な検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Yoshiwaka C, Zhang K, Zawadzak E, Kobayashi H, A novel shortened electrospun nanofiber modified with a 'concentrated' polymer brush, *Sci. Technol. Adv. Mat.*, Vol.12(1), 015003-1~015003-7(2011), 査読有
2. Tiwari A, Terada D, (他5名、5番目), An ultra sensitive saccharides detection assay using carboxyl

- functionalized chitosan containing Gd2O3, Eu3+ nanoparticles probe, Anal Methods-Uk, Vol. 3, 217-226(2011), 査読有
3. Terada D, Kobayashi H, (他 4 名), Transient charge-masking effect of applied voltage on electrospinning of pure chitosan nanofibers from aqueous solutions, Sci. Technol. Adv. Mat., Vol. 13(1), 015003-015001-015009(2011), 査読有
 4. Hattori S, Terada D, (他 6 名、6 番目), Influence of sterilizations on silk protein-based materials for developing a novel artificial cornea, Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterial, (on line) DOI:10.1680/bbn.11.00006(2011)、査読有
 5. Chen S, Hirota N, (他 5 名、3 番目), Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields, Acta Biomater, Vol. 7(2), 644-652 (2011)、査読有
 6. Tiwari A, Terada D, Yoshikawa C, Kobayashi H, An enzyme-free highly glucose-specific assay using self-assembled aminobenzene boronic acid upon polyelectrolytes electrospun nanofibers-mat, Talanta, Vol. 82(5), 1725-1732(2010)、査読有
 7. Kishida A, Funamoto S, (他 8 名、8 番目), Tissue engineering with natural tissue matrices(5th Forum on New Materials, 2010, Part E, Stafa-Zuerich, Switzerland), Advances in Science and Technology, Vol. 76, 125-132(2010)、査読有
 8. Hashimoto Y, Funamoto S, (他 8 名 7 番目), Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering, Biomaterials, 31(14), 3941-3948(2010)、査読有
 9. Chen S, Ikoma T, (他 4 名、3 番目), In vitro formation and thermal transition of novel hybrid fibrils from type I fish scale collagen and type I porcine collagen, Sci. Technol. Adv. Mat, Vol. 11(3), 35001-1~4(2010)査読有 [学会発表] (計 24 件)
 1. Kobayashi H, Nano fibrous materials for tissue engineering scaffolds, ICNANO 2011, 2011/12/18-12/23, Delhi, India
 2. Hattori S, Novel approaches for fabricating artificial corneal stroma using silk protein derived materials, International conference on nanomaterials and nanotechnology, 2011/12/18-12/23, Delhi, India
 3. Terada D, Silk nanofibers for corneal tissue engineering, The XXIInd Congress of The International Sericultural Commission, 2011/12/01-12/05, ChiangMai, Thailand
 4. Hattori S, Development of novel artificial cornea using silk-derived materials, XXII nd Congress of the International Sericultural Commission, 2011/12/01-12/05, Chiang Mai, Thailand
 5. 寺田堂彦, シルクナノファイバーからなる角膜再生材料の開発, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011/11/21-11/22, 京都
 6. 服部晋也, 絹タンパク質を用いた新規人工角膜開発の試み, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011/11/21-11/22, 京都
 7. 寺田堂彦, シルクフィブロインナノファイバーからなる角膜組織再生用足場材料, 第 60 回高分子討論会, 2011/09/28-2011/09/30, 岡山
 8. 服部晋也, ナノファイバー足場が細胞に及ぼす影響について, 第 60 回高分子討論会, 2011/09/28-09/30, 岡山
 9. 寺田堂彦, シルクのナノファイバー化と角膜再生材料としての評価, 平成 23 年度繊維学会年次大会, 2011/06/08-06/10, 東京
 10. Terada D, Silk nanofibers as biomaterial for corneal regenerative medicine, TERMIS-EU 2011 Annual Meeting, 2011/06/07-06/10, Granada, Spain
 11. 寺田堂彦, 各種シルクのナノファイバー化および角膜再生材料としての可能性試験, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011/05/25-05/27, 大阪
 12. 服部晋也, 絹材料を用いた新規人工角膜の生体内埋植の組織評価, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011/05/25-05/27, 大阪
 13. Kobayashi H, Advanced Materials approaches for corneal regeneration, 1st International congress on Advanced materials2011, 2011/05/14-05/16, Jinan, China
 14. 小林尚俊, 生体材料応用に向けた新規電界紡糸ナノファイバーの開発: [2]強磁場を用いた配列化, つくば医工連携フォーラム 2011, 2011/01/26, つくば
 15. 寺田堂彦, シルクナノファイバーを用い

- た角膜組織再生スキャフォールドの開発、つくば医工連携フォーラム 2011、2011/01/26、つくば
16. 吉川千晶、生体材料応用に向けた新規電界紡糸ナノファイバーの開発：[1]表面修飾と短繊維化、つくば医工連携フォーラム 2011、2011/1/26、つくば
 17. Kobayashi H, Challenges to develop highly functionalized reliable medical materials/devices from nanofiber to 3D structure: to develop artificial cornea, DCR University of Sc & Tech Seminar, 2010/11/02, Sonipat, India
 18. Kobayashi H, Top down and bottom up approaches to develop reliable artificial cornea, Indo-Japan seminar on Smart nanobiomaterials, 2010/11/01, Delhi, India
 19. Kobayashi H, Nanofiber based biomedical materials and thier applications, RD Girls Collage seminar, 2010/10/29 Bharatpur, India
 20. Kobayashi H, Nanofiberbased biomaterials and their applications, Hindustan college of science and technology, 2010/10/28, Agra, India
 21. Kobayashi H, Recent outcome about development of reliable artificial cornea, Top down and bottom up approaches, Banaras Hindu University seminar, 2010/10/26, Agra, India
 22. Kobayashi H, Biocompatible nano-fibrous materials application to tissue engineering scaffolds, Indo-Japan seminar at NSC on Nanomaterials in Biomedicals, 2010/10/22, Allahabad, India
- 他 2 件
- [図書] (計 4 件)
1. Tiwari A, Kobayashi H, Wiley-Scrivener, Intelligent Nanomaterials, Chapter 1, pp. xxii~xxiv (2012)
 2. 小林尚俊、吉川千晶、シーエムシー出版、6 章：バイオマテリアルの表面修飾・ナノ-ミクロ-マクロ構造制御技術。In: ものづくりからみる再生医療-細胞研究・創薬・治療-。Edited by 田畑泰彦 監修、pp. 142-151 (2011)
 3. 吉川千晶、小林尚俊、辻井敬亘、株式会社 エヌ・ティー・エス、医用材料のための表面改質。In: 新訂版 ラジカル重合ハンドブック、2010、pp. 757~768
 4. Tiwari A, Terada D, Yoshikawa C, Kobayashi H, Hauppauge New York: NOVA Publishers, Chitosan Derived Smart Materials, Chitosan: Manufacture、

Properties、and Usage、
pp. 255-288 (2010)

[産業財産権]
○出願状況 (計 3 件)

①名称：短繊維足場材料、短繊維-細胞複合凝集塊作製方法及び短繊維-細胞複合凝集塊

発明者：小林尚俊、吉川千晶
権利者：独立行政法人物質・材料研究機構
種類：特許
番号：特願 2011-102759
出願年月日：2011 年 5 月 2 日
国内外の別：国内

②名称：繊維片製造方法

発明者：小林尚俊、吉川千晶、Zhang K
権利者：独立行政法人物質・材料研究機構
種類：特許
番号：特願 2010-197279
出願年月日：2010 年 9 月 3 日
国内外の別：国内

③名称：高分子ファイバーの製造方法

発明者：小林尚俊、寺田堂彦
権利者：独立行政法人物質・材料研究機構
種類：特許
番号：特願 2010-108171
出願年月日：2010 年 5 月 10 日
国内外の別：国内

[その他]
http://samurai.nims.go.jp/KOBAYASHI_Hisatoshi-e.html

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 小林 尚俊
(KOBAYASHI HISATOSHI)
独立行政法人物質・材料研究機構
国際ナノアーキテクニクス研究拠点
研究者番号：90354266
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者
吉川 千晶 (YOSHIKAWA CHIAKI)
物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・研究員
研究者番号：10447930
寺田 堂彦 (TERADA DOHIKO)
物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・ポスドク研究員
研究者番号：10454555
服部 晋也 (HATTORI SHINYA)
物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・ポスドク研究員
研究者番号：30469762