

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700554

研究課題名（和文） 微小パターンを有する複合型ハイドロゲル材料の作製と細胞の高度組織化

研究課題名（英文） Fabrication of Complex Hydrogel Materials with Microscale Patterns for Cell Organization

研究代表者

山田 真澄（YAMADA MASUMI）

千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30546784

研究成果の概要（和文）：

微小なパターンを有する複合型ハイドロゲル材料を作製するための、マイクロ流体デバイスを利用した新規手法を提案した。複合型ファイバー、ストライプ状シート、極微小粒子、平板状パターンなどの作製を行い、たとえば非実質細胞との高密度共培養による初代肝細胞の機能向上や、微小ECM粒子を含むヘテロスフェロイドの形成、個別のゲル材料の複合化などを行った。さらに、ハイドロゲルによって形成された流路構造を利用し、血管組織モデル作製法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

We developed microfluidic systems for preparing complex hydrogel materials embedding micrometer-patterns with different physicochemical properties. Complex hydrogel fibers, stripe-patterned sheets, cell-sized ECM particles, and planar patterns were fabricated. These materials were applied to, for example, the coculture of primary hepatocytes and non-parenchymal cells, the formation of heterogeneous spheroids incorporating ECM particles, and the preparation of relatively large tissues by combining these unit materials. In addition, strategies for preparing vascular tissue models have been proposed using microfluidic devices made of hydrogel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：バイオマテリアル マイクロ流路 ハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

3次元的な組織・臓器を生体外で構築するための試みが、数多くなされている。たとえば細胞シートの積層化、脱細胞化臓器の利用、高分子やハイドロゲルのスキャホールド作製、ハイドロゲルビーズの集積化など、多くの研究者が独自のアプローチによって生体外における組織構築に挑戦している。しかしながら、血管網を内包し、多種類の細胞パターンによって構成される組織を生体外にお

いて作製するためには、高密度・正確・高速に複数種の細胞を立体的に配置し、さらに細胞を取り囲む3次元的な微細環境の物理・化学的な性質をマイクロメートルスケールで制御する必要があり、これらを全て満たす実用的手法は、世界的に見ても未だ開発の初期段階にあると言える。

これまでに、細胞をパターン化して培養するための様々な試みが報告されてきたが、そのほとんどは平面上のパターン形成に限ら

れていた。一方、ハイドロゲルなどを利用した3次元的な培養については、成分の均一な培養系が主であり、細胞の微細環境を異方的に制御することは困難であった。例外として、3次元的なハイドロゲル材料の局所的な物理・化学的性質を変化させるための、光反応性リガンドを導入したゲルに対する光パターンニング法などが報告されているが (Luo ら, *Nat Mater*, 2004; Kloxin ら, *Science*, 2009 など) 解像度や操作性において課題があった。

一方近年、微細加工技術によって作製したマイクロ流体デバイスを利用し、ミクロスケールの微小な材料 (微粒子・ファイバーなど) を合成する研究が報告されている。マイクロ流路を用いて直径 100 μm 程度のハイドロゲル粒子やファイバーを作製する手法などが提案されており (例として Takeuchi ら, *Adv Mater*, 2008; Su ら, *Lab Chip* 2009 など), たとえば細胞を播種あるいは内包したハイドロゲルビーズを集積化することで、比較的大きな細胞集塊状構造を作製する研究も行われている。我々の研究グループでは、アルギン酸・コラーゲン等の天然ハイドロゲル材料を用い、異方的・複合的なハイドロゲルファイバーを正確かつ簡便に作製するためのフルイディクス手法の開発を行ってきた。微細加工技術によって作製された流路構造に対し、異なる成分・細胞を含むゾル溶液と、ゲル化剤溶液をそれぞれ連続的に導入し、多相並行層流系の流量バランスを調節することによって、直径数 μm ~数百 μm の、断面が物理的強度・化学的組成の異なる複数の部分によって構成された機能的ハイドロゲルファイバーを作製することができる。このような異方的な細胞埋包ファイバーは、均一な成分のファイバーと比較して、複合的な線形細胞組織や細胞ネットワーク (たとえば血管モデルなど) を構築する上で非常に効果的であり、たとえば血管網を内包する機能的組織を構築する上で、有用な基礎技術の一つとなるものと期待される。

2. 研究の目的

上記のような異方的ハイドロゲル材料を利用して、より複雑でサイズの大きい組織構造を作製するためには、直線的な構造であるファイバー状の素材のみならず、ミクロスケールで構造がヘテロな、微粒子状、シート状、ブロック状など、複雑な異方的パターンを有するハイドロゲル素材を正確に作製するための技術開発が不可欠である。そして、それらをボトムアッププロセスによって複合化し、さらに既存の細胞培養技術 (平面的細胞

シート形成手法やスフェロイド形成技術) と組み合わせることができれば、生体外での3次元的組織構築という難題に挑戦しうるのはではないか、と期待される。

そこで本研究では、まず、①平面型・多層型・あるいはアレイ状のマイクロ流体デバイスを設計・作製し、マイクロメートルスケールで異方的なパターンを有するハイドロゲル材料 (複合微粒子・極微小微粒子・より複雑な複合ファイバー・複合シート・ブロックなど) を作製するための手法を開発し、②作製した各複合素材を用い、細胞培養・機能評価を行うとともにユニットとなる微小組織を形成する。さらに、③鋳型を用いたハイドロゲルの複合モールドニング、シート状素材のマルチラミネーション (積層化)、微小ゲル材料のパターン化技術といったプロセスを開発し、さらに④場合によっては微小組織構造を作製する既存技術 (細胞シート技術、スフェロイド形成技術など) を活用することで、複合的な3次元的生体組織の構築を行う、ということを目指した。具体的には、管腔状血管モデルの作製、神経再生用導管の構築、肝細胞機能維持のための共培養環境の作製などを行い、個別技術としての有用性を実証するほか、より複合的な3次元的モデル組織として、肝細胞索・類洞構造を模倣した肝小葉構造組織の構築や、血管様構造を内包する組織の構築を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、まず微小パターンを有する異方的ハイドロゲル材料を作製するための個別フルイディクス技術の開発を行った。微細加工技術を利用して、マイクロ流体デバイスを作製し、毛糸球状ハイドロゲル粒子、極微小ハイドロゲル粒子、複合型ハイドロゲルファイバー、ハイドロゲルシート、などを作成するための新規プロセスの開発を行った。まず (1) 毛糸玉状粒子は、球形粒子と比較してゲル部分の空間占有率が低く、酸素・栄養分の供給効率を大幅に高めるため、細胞の播種・集積化による高密度の組織構築を可能とすると期待される。油-水 2 相系を利用し、流路内で部分的にゲル化したファイバーを液滴に封入して切断し折りたたむことで作製を試みた。また、ゲルのマトリックス内部に細胞を高密度で包埋し培養することで、バルクのハイドロゲル材料との比較を行った。

(2) 極微小粒子の作製では、これまでに報告された、マイクロ流路を用いて作製されてきた単分散ハイドロゲル粒子 (直径約 100 μm) よりもはるかに小さい、直径 5~20 μm 程

度の細胞サイズの微粒子の作製を試みた。具体的には、混合可能な2種類の溶液を用いて非平衡な液滴を形成し、液滴中の成分を連続的に徐々に溶解することで径を縮小し、その後ゲル化を行う新規手法を提案した。(3) 複合ファイバーは、これまでの平面的な流路構造ではなく、機械加工によって作製した2次元的な垂直型ノズルアレイから、異なる成分・細胞を含むゾル溶液を、連続的にゲル化剤水溶液に押し出すことによって作製する手法を開発した。そして応用として、複数の神経網を並行に配置した神経導管の作製を試みた。(4) 複合シートは、微小なノズルアレイを用い、(3)と同様の操作を行うことで作製を行った。また作製した異方的パターン化シートにおいて、肝細胞—内皮細胞の共培養を行い、配向培養による細胞機能の維持・変化の解析を行った。なおこれら(1)～(4)を作製するための材料として、主にアルギン酸Ca(あるいはBa)ゲルを利用したが、必要に応じてコラーゲン等のECM成分を添加したほか、細胞接着性のRGDペプチドを結合したアルギン酸を利用した。

また、各材料に対する細胞の埋包・播種による個別組織モデルの構築と細胞機能評価を行った。肝構造を模倣した複合的組織の構築においては、株化細胞を用いた評価を行った後に、ラット由来のプライマリ細胞を用いた実験を行った。細胞の機能評価として、免疫アッセイ、組織染色、定量的PCRを利用した遺伝子発現解析などを行った。さらに、ハイドロゲルによって形成された流路構造を作製するための新規手法を提案し、血管組織モデルの作製を試みた。また、個別のハイドロゲル材料(たとえば異方的ファイバー)を複合化し、肝小葉モデルを作製するためのプロセス開発を試みたほか、複合的・非球形な細胞集塊を形成する手法の構築および応用を行った。

4. 研究成果

当初の目標としていた機能性・複合型ハイドロゲル構造の作製については、主にアルギン酸を用いて、ファイバー状、粒子状、シート状のハイドロゲル構造体の作製手法を確立し、またそれらに細胞を包埋することによって、新規3次元細胞培養基材としての応用可能性を示すことができた。組織の単位モデルとして、まず肝組織については、肝細胞と非実質細胞を内包することによって複合型肝組織体の形成を行い、アルブミン産生・尿素合成などの肝機能が長期に渡って維持されることを確認することができた。また、

培養時における酸素濃度の影響を評価し、35%の高酸素条件において機能がすることが確認された。さらに肝細胞の持つ他の機能についても遺伝子発現解析を行ったところ、非実質細胞との共培養系において、薬物代謝酵素であるCYPの活性が向上していることが確認された。さらに、プライマリ細胞以外にも、ヘパトーマ細胞を用いた実験も行い、その有用性を実証することができた。

神経組織については、直径100 μm 程度のファイバーの外周部に柔軟部を複数並行に配置した複合型ハイドロゲルファイバーを作製し、モデル細胞PC12を包埋して培養実験を行うことによって、複合ファイバー内で神経突起伸長方向の制御が可能であることを確認し、実際の神経束構造を模倣した構造の作製可能性を示すことができた。さらに、異方的なファイバーの内部に癌細胞と正常細胞を高密度で包埋することで、3次元的环境における癌細胞の浸潤挙動を観察するための新規ツールとしての応用を行った。

また、機能的粒子・シート状粒子についても、それらの作製のための基盤技術の確立を行うことができた。また、ECMによって構成された数ミクロン程度の微粒子を作製し、細胞と混合して非接着性の微小ウェル内で培養することによって、複合型の細胞集塊を形成することができた。遺伝子発現解析を行ったところ、ECM粒子(たとえば微小コラーゲン粒子)の存在下では、肝細胞のアルブミン合成能等が向上することが確認された。また、ストライプ状のパターンを有するハイドロゲル材料について、作製条件を詳細に検討することによって、アレイ状の線形組織体の構築が可能となった。さらにまた、親疎水性のパターンを利用した基板上へのハイドロゲルパターンニング法について、性質の異なる複数種のゲル材料をパターン化することで、接着の性質の異なる細胞であっても形態を制御して培養できることを実証した。

また、これらのハイドロゲル材料を単位材料として利用し、より複合的な組織体を構築するための組織工学的展開を試みた。ゼラチンあるいはコラーゲンによって形成された薄層平板状のハイドロゲル材料を積層化し、酵素によって架橋することで、比較的サイズの大きい3次元細胞培養環境の形成を試みた。また、細胞を包埋あるいは接着させたハイドロゲルファイバーを束ねて微小な流路内で灌流培養を行うことによって、生体の組織をより高度に模倣した培養系の構築を行った。さらに、血管内皮細胞を接着させたハイドロゲル部材を多種のハイドロゲル基

材中に包埋することで、血管網を内包する組織体の形成を行ったほか、多層の血管構造を模倣したゲル材料を作製するためのプロセス開発を行った。

以上の結果から、マイクロ流体デバイス技術、あるいは微細加工技術を用いて作製したこれら個別のハイドロゲル材料は、生体組織における微小環境を模倣した培養ツールとして有用であることが確認された。今後さらに、これら個別の材料を組み合わせることによって、より複雑でサイズの大きい組織を作製するためのプロセスを提案できるものと期待される。

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 4 件)

- (1) A. Miyama, M. Yamada*, S. Sugaya, and M. Seki, "A Droplet-based Microfluidic Process to Produce Yarn-ball-shaped Hydrogel Microbeads", *RSC Advances*, in press (2013).
- (2) S. Sugaya, S. Kakegawa, S. Fukushima, M. Yamada*, and M. Seki, "Micropatterning of Hydrogels on Locally Hydrophilized Regions on PDMS by Stepwise Solution Dipping and *in situ* Gelation", *Langmuir*, 28, 14073–14080 (2012).
- (3) M. Yamada, R. Utoh, K. Ohashi, K. Tatsumi, M. Yamato, T. Okano, and M. Seki, "Controlled Formation of Heterotypic Hepatic Micro-Organoids in Anisotropic Hydrogel Microfibers for Long-Term Preservation of Liver-Specific Functions", *Biomaterials*, 33, 8304–8315 (2012).
- (4) M. Yamada*, S. Sugaya, Y. Naganuma, and M. Seki, "Microfluidic Synthesis of Chemically and Physically Anisotropic Hydrogel Microfibers for Guided Cell Growth and Networking", *Soft Matter*, 8, 3122–3130 (2012).

[学会発表] (計 20 件)

- (1) 山田真澄, 岩瀬優輝, 関 実, 「微細ハイドロゲル管路構造を利用した血管組織モデルの作製」, 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013 年 3 月
- (2) 関 実, 山田真澄, 「マイクロフルイデイクスを用いた複合ゲル材料の作製と細胞アセンブリ」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 仙台, 2012 年 11 月
- (3) S. Sugaya, M. Yamada, and M. Seki,

"Manipulation of Cells and Cell Spheroids Using Collagen Hydrogel Microbeads Prepared by Microfluidic Devices", 2012 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2012), 名古屋, 2012 年 11 月

- (4) M. Iwase, M. Yamada, and M. Seki, "Construction of Vascular Tissues via Multilayer Cell Deposition inside Hydrogel Microchannels", 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2012), 沖縄, 2012 年 10 月
- (5) A. Kobayashi, K. Yamakoshi, Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, "Microfluidics-based Formation of Heterogeneous Hydrogel Sheets for High-density Coculture of Multiple Cell Types", 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2012), 沖縄, 2012 年 10 月
- (6) 菅谷紗里, 山田真澄, 関 実, 「微小コーゲンハイドロゲル粒子を用いたヘテロ細胞集塊の作製」, 化学工学会第 44 回秋季大会, 仙台, 2012 年 9 月
- (7) 山田真澄, 「ハイドロゲル材料とマイクロフルイデイクスによる細胞アセンブリの新展開」, 超高速バイオアセンブラ第 1 回若手研究者シンポジウム, 京都, 2012 年 7 月
- (8) Y. Naganuma, M. Yamada, S. Sugaya, and M. Seki, "Fluidic Preparation of Patterned Hydrogel Fibers Using Micronozzle-array Devices for Neural Cell Guidance", IEEE The 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2012), パリ, フランス, 2012 年 1 月
- (9) 山田真澄, 長沼洋次, 小林あおい, 関 実, 「マイクロノズルアレイ構造を利用した複合型細胞埋包ハイドロゲル材料の作製」, 化学工学会第 77 年会, 東京, 2012 年 3 月
- (10) 山田真澄, 「マイクロ流体システムによる細胞操作・マテリアル合成の新展開」, 学振 151 委員会 未踏・ナノデバイステクノロジー ナノバイオフィュージョン分科会研究会, 東京, 2011 年 12 月
- (11) M. Yamada, Y. Naganuma, E. Yamada, S. Kakegawa, S. Sugaya, and M. Seki, "Fabrication of Complex Hydrogel Materials by Utilizing Microfluidics and Micromolding", 2011 MRS Fall Meeting, Boston, USA, 2011 年 12 月
- (12) S. Sugaya, A. Miyama, M. Yamada, and M. Seki, "Fabrication of Functional Hydrogel Microbeads Utilizing Non-equilibrium Microfluidics for Biological Applications", 2011 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2011), 名古屋, 2011 年 11 月
- (13) M. Yamada and M. Seki, "Microfluidics and

Microfabrication Technology for Highly Precise Cell Manipulation and Cultivation”, 2011 International Symposium on Micro-NanoMechatronics, and Human Science (MHS2011), 名古屋, 2011年11月

(14) 小林あおい, 山田真澄, 関 実, 「扁平型マイクロノズルを利用した異方的ハイドゲルシートの作製と細胞の高密度共培養への応用」, 第24回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 大阪, 2011年11月

(15) M. Yamada, R. Utoh, K. Ohashi, M. Yamato, T. Okano, and Minoru Seki, “Formation of Complex Hepatic Organoids Using Microfabricated Anisotropic Hydrogel Fibers”, 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2011), 2011年10月, シアトル, 米国, 2011年10月

(16) A. Miyama, S. Sugaya, M. Yamada, and M. Seki, “Microfluidic Production of Yarn-ball-shape Hydrogel Microbeads and Its Application to High-density”, Cell Cultivation”, 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2011), 2011年10月, シアトル, 米国, 2011年10月

(17) Y. Naganuma, M. Yamada, S. Sugaya, and M. Seki, “Synthesis of Complex Alginate Hydrogel Fibers Utilizing Microfluidic Devices for Controlling Cell”, Growth Directions, International Conference on Biofabrication 2011 in Toyama, 富山, 2011年10月

(18) M. Yamada and M. Seki, “Synthesis of Functional Polymer/Hydrogel Materials Utilizing Non-equilibrium Microfluidics”, The 14th Asian Chemical Congress (14 ACC), バンコク, タイ, 2011年9月

(19) 山田真澄, 鶴頭理恵, 大橋一夫, 大和雅之, 岡野光夫, 関 実, 「微小ハイドロゲルファイバーを利用した肝細胞・非実質細胞複合組織体の作製」, 化学工学会第43回秋季大会, 名古屋, 2011年9月

(20) 三山文葵, 山田真澄, 菅谷紗里, 関 実, 「毛糸玉状マイクロハイドロゲルビーズを担体とした高密度細胞培養」, 化学工学会第43回秋季大会, 名古屋, 2011年9月

[図書] (計1件)

(1) 山田真澄, 関 実, マイクロフルイディクスを利用した複合型ハイドロゲル材料の作製と応用, ケミカルエンジニアリング, 化学工業社, 2011年7月号 (Vol. 56, No.7), 16-20 (2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 細胞評価用ハイドロゲル基材および細

胞評価手法

発明者: 関 実, 山田真澄, 北川陽一

権利者: 千葉大学

種類: 特許出願

番号: 2013-028485

出願年月日: 平成25年2月16日

国内外の別: 国内

名称: 血管組織およびその作製方法

発明者: 関 実, 山田真澄, 岩瀬優輝

権利者: 千葉大学

種類: 特許出願

番号: 2012-181261

出願年月日: 平成24年8月18日

国内外の別: 国内

名称: 複合型肝細胞組織体およびその作製方法

発明者: 山田真澄, 関 実, 山田理恵, 大橋

一夫, 大和雅之, 岡野光夫

権利者: 千葉大学・東京女子医科大学

種類: 特許出願

番号: 2011-122973・2011-123856

出願年月日: 2011年5月31日・6月1日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 真澄 (YAMADA MASUMI)

千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 30546784