

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2014

課題番号：25706010

研究課題名(和文)階層構造を有するマイクロハイドロゲルの創製

研究課題名(英文)Preparation of microhydrogel with hierarchic structures

研究代表者

松永 行子(津田行子)(Matsunaga, Yukiko)

東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：00533663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：機械的強度に優れた三次元構造物をハイドロゲルのみで構築する新規手法の開発を目指し、本研究では複数のゲル線維が集合した束状ゲルの合成法を着想した。温度応答性高分子であるヒドロキシプロピルセルロース(HPC)とアルギン酸ナトリウム(Na-Alg)の混合溶液からなる相分離溶液を調製し、マイクロ流路デバイスを用いた動的ゲル化によるゲルファイバーを作製した。高分子凝集体はフロー方向に引き伸ばされ、最終的にアルギン酸分子を除去することでHPCのみからなる束状の構造体の作製に成功した。束状構造ゲルは非束構造に比べ高い機械強度を有し、かつ細胞足場として利用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：This research describes a microfluidic device-based approach using a phase-separated polymer blend solution with rapid cross-linking process for fabrication of biomimetic bundle structured gel fibres as a candidate for cell culture scaffold that are able to mimic hierarchic tissue structures. As raw materials for bundled gel fibre, two natural derived biocompatible polysaccharide polymers are employed. The resulting bundled gel fibres are approximately 200 ~ 400 micrometer in diameter, consisting of 100 ~ 10000 aligned continuous microfibrils, creating a composite fibrous material with enhanced mechanical properties which is a unique feature of three-dimensionally cross-linked multiple complex hierarchic fibres. As a result of cell culture study, the cells formed cylinder-like shape along the fibre orientation. We believe that these results promise to be a great candidate for tissue scaffolds but also wide biomaterial applications such as tissue engineering.

研究分野：組織工学

キーワード：マイクロ流路 組織工学 細胞足場 セルロース

1. 研究開始当初の背景

組織工学において再構成組織の生物学および機械的特性の獲得には、組織および組織を取り巻く細胞外マトリックス層の微細構造の模倣が必須であると考えられている。これまでの組織構築法は、ミリメートル以上のマクロサイズのゲルを作製し、そこに細胞を播種するものであり、均一な細胞密度の組織が得られない、組織の階層的微細構造を再現できない等の問題があった。

一方、これまで我々は、マイクロ流体デバイスを用いて均一直径 (100 μm) のハイドロゲルビーズあるいはハイドロゲルファイバー形成手法を提案し、これらのゲルに細胞を接着させ、マイクロ組織ユニットによるボトムアップ組織構築法を展開している。具体的には、高速三次元立体組織形成、均一な細胞密度、およびユニットの組み合わせにより数十~数百マイクロメートルオーダーで階層構造組織形成を実現し、次世代組織工学における強力ツールであることを示してきた。

しかし、単に細胞の配向性、階層性を再現しただけでは生体と同等の力学特性を得ることは難しく、生体を構成する分子レベルに基づいたナノ、マイクロ構造および配向性に着目する必要がある。生体組織中では、細胞外マトリックス層は、タンパク質などのナノレベルの両親媒性分子が物理的、化学的環境下で自己集合することにより形成され、組織部位特有の力学特性を獲得していると考えられている。

そこで、本研究では分子の相分離パターン現象を利用して階層構造をもつハイドロゲルファイバーを創製することに着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高分子の相分離現象を利用して階層構造を有するマイクロハイドロゲルを創製することである。マイクロ流体デバイス中に、親疎水性、粘性等異なる二成分の流体を導入し、流れ場で瞬時にゲル化を行うことによりナノからマイクロスケールレベルで階層的に変化した構造を有するハイドロゲルの形成手法を確立する。形成メカニズムを解明し制御した階層性ハイドロゲルを作製することで、最終的には、マイクロ工学とバイオマテリアルとの融合を図り、組織医療のための細胞培養足場およびマイクロアクチュエータへの応用を目指す。

3. 研究の方法

相転移動力学における知見によると、静置状態において形成した分子の凝集体はシェアの影響を受けやすく、流れに沿って繊維状に配向することが知られている。この効果を利用し束状のゲルを得るために、本研究では温度応答性高分子の凝集体形成能とマイクロ流体デバイスにおけるシェアストレスに着目し、動的な環境において高分子凝集体をゲル化することによる束状ゲルファイバー

の作製を検討した。

温度応答性高分子には、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を選択した。HPC は下限臨界溶液温度 (LCST) を約 40°C 前後に持つ温度応答性的高分子であり、塩の添加でも相分離することが知られている。生体への毒性が低く、化学的にも不活性であることから、医薬品添加剤や食品添加物としても用いられている高分子である。

マイクロ流体デバイスでゲルファイバーを得るためには、プレゲル溶液とゲル化剤の接触点において瞬時にゲル化が起こる必要がある。そこで本研究では、ゲル化時間が極めて短いアルギン酸ナトリウム (Na-Alg) を犠牲層として用いる 2 ステップのゲル化方法を採用した。シェアストレスによって形成される高分子凝集体の束状構造を Ca-Alg ゲルによって一度保持し、その後、束状のパターンを維持したまま凝集体の架橋を行い、最終的に構造の保持に使用していた Ca-Alg ゲルを除去することによって束状のゲルファイバー作製について種々の検討を行った。

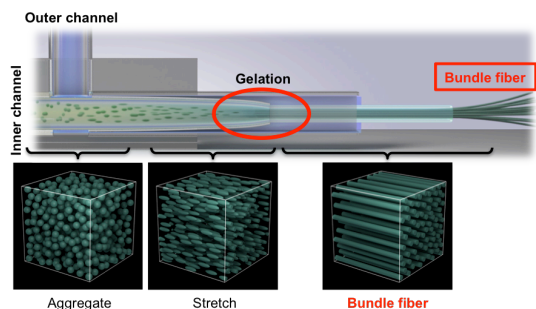


図 1. 束状構造ゲルの作製コンセプト

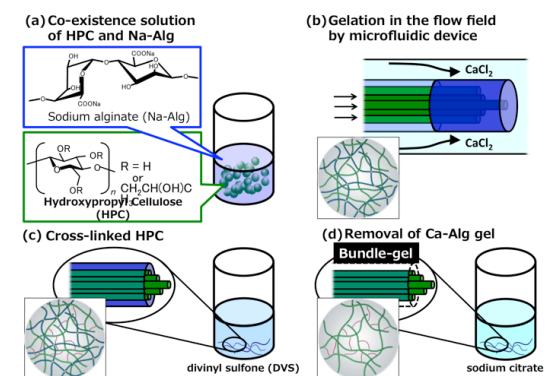


図 2. HPC-Alg ポリマーブレンド溶液の同軸フロー型マイクロ流体デバイスを用いた動的ゲル化による束状ゲル構造の作製

4. 研究成果

HPC と Na-Alg の相分離溶液を同軸フロー型マイクロ流体デバイスに送液し、Alg を塩化カルシウム水溶液と接触させることでゲル化した。Ca-Alg ゲル内部に保持された HPC 凝集体を化学架橋後、クエン酸ナトリウム水溶液に浸漬し外殻の Ca-Alg ゲル領域を除去した。HPC と Na-Alg の混合比率を調整し、

直径約 2 μm の線維が積層した束状ゲルファイバー(直径約 300 μm)の調製に成功した。本ポリマーブレンドの相分離形成の有無および相分離パターン形状については、HPC と Na-Alg の比率、温度、pH が大きく影響することが判明した。

得られた束状ゲルは、引張試験結果より、HPC のみで作製したゲルファイバーに比べ高強度およびしなやかに伸長可能であることが示された。また、HPC と Na-Alg のポリマーブレンド比を変化させた場合、相分離パターンの形状が変わるため、束状ゲル構造を構成する 1 本 1 本の線維直径変化に寄与していることが判明した。

また、本束状構造ゲルファイバー上に線維芽細胞を播種すると、HPC ゲル表面では細胞は接着性を示さないが、束状ゲル表面上では細胞接着性を示し、かつ線維方向に沿って配向性を示した。これは、束状構造ゲルを構成する際、相分離溶液中の HPC 分子は Na-Alg の添加により分子が凝集しているため、作製した束状構造ゲルの機械特性が高まり、細胞にとってはより硬い表面となり接着性が増したと考えられる。Na-Alg 存在下での HPC 分子の凝集については、原子間力顕微鏡により観察している。一方で、本束状構造ゲルは温度応答性を有し、60°C に加熱することでゲルファイバーが 30% 伸縮し、かつ機械強度が増すことが示された。

以上のように、HPC と Na-Alg の相分離溶液をマイクロ流路デバイスと組み合わせることで、容易に束状構造ゲルファイバーを作製できることを示した。また、相分離の状態を種々変化させることで、構成する束の構造を制御可能となり、結果的に束状ゲルの機能性を変化させることが示された。本研究成果はゲルのマイクロレベルでの階層構造を通じて、組織工学への応用や生体適合性アクセサリ材料としての利用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 24 件)

①立澤彩佳,金英鎮,菊池明彦,松永行子,“ポリマーブレンド溶液の相分離パターン変化による束状構造ゲルファイバーの作製と特性評価”,第 14 回日本再生医療学会総会,横浜,2015.3.9 (口頭)

②松永行子,“MEMS 組織工学による三次元組織構築の新たな展開”,第 24 回インテリジェント材料/システムシンポジウム,東京,東京女子医科大学先端生命医科学研究所,2015.1.19 (招待講演)

③松永行子,“ボトムアップ組織工学”,第 8 回高度物理刺激と生体応答に関する研究分科会特別講演会,福岡,九州大学伊都キャンパス,2015.1.20 (招待講演)

④Young-Jin Kim, Yuta Takahashi, Norihiko Kato, Yukiko T. Matsunaga, “Cellulosic Smart Bundled Gel Fiber with Switchable Properties for Biomaterials Applications”, IPC2014, Tsukuba, Japan, 2014.12.3 (ポスター)

⑤松永行子,“Body on a chip -臓器チップがもたらす健康社会”,女子中高校生生理系進路選択支援事業【最先端の工学研究に触れてみよう!】,東京,東京大学生産技術研究所,2014.11.14 (招待講演)

⑥立澤彩佳,金英鎮,菊池明彦,松永行子,“生体組織の束状構造を創る”ポリマーブレンド溶液の相分離パターン変化による束状構造ゲルファイバーの微細構造制御,細胞を創る研究会 7.0,東京,東京大学,2014.11.13 (ポスター)

⑦Yukiko T. Matsunaga, Young-Jin Kim, “Gel Fibers Fabricated with a Combination of Microfluidic Device and Phase-Separated Polymer Solution”, 2014 BMES Annual Meeting, 2014, San Antonio, Texas, 2014.10.24

⑧Young-Jin Kim, Yuta Takahashi, Norihiko Kato, Yukiko T. Matsunaga, “Temperature-responsive bundled gel fiber using dynamic microfluidic gelation of a phase-separated polymer network”, TERMIS-AP Meeting 2014, Deagu, Korea, 2014.9.25 (ポスター)

⑨松永行子, “Microvascular Chip for the Dynamic Analysis of Tissue Complex Behavior”, 機能性錯体化学研究会, 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.8.5 (招待講演)

⑩松永行子, “生体組織構築による生命動態の見える化”, 日本学術振興会産学協力研究委員会第 174 委員会「分子ナノテクノロジー」第 47 回研究会, 東京, 品川, 2014.6.4 (招待講演)

⑪Young-Jin Kim, Yuta Takahashi, Norihiko Kato, Yukiko T. Matsunaga, “Temperature-responsive cellulosic bundled gel fiber as a 3D scaffold for tissue engineering”, 3D Tissue Fabrication, Tokyo, Japan, 2014.5.20 (ポスター)

⑫松永行子, “組織工学の新たな展開: in vitro 病態モデルの構築”, 奨励会特別研究会, Invited, 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.5.15 (招待講演)

⑬ Young-Jin Kim, N.Kato, Yukiko T. Matsunaga, "Generation of bundled gel fibers from combination of dynamic microfluidic gelation system and phase-separated polymer blend", JST Taiwan-Japan Workshop on "Bioelectronics" and "Biophotonics, 2014, Tokyo, 2014.4.8 (ポスター)

⑭ 高橋悠太, 加藤紀弘, 松永行子, "流れ場でのゲル化が生み出す「束状ゲル」", 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 船堀, 東京, 2013. 12. 05. (口頭)

⑮ 松永行子, "ボトムアップで組織の階層構造をつくる-Fabrication of hierarchical tissue models using the bottom-up tissue engineering", 第 36 回日本分子生物学会年会, (神戸ポートアイランド) 2013.12.3 (招待講演)

⑯ 松永行子, "マイクロ流体技術による in vitro 階層化組織モデルの構築", 第 35 回医用高分子研究会講座 (東京), 2013.11.27 (招待講演)

⑰ 松永行子, "生体組織再構築のためのボトムアップ組織形成術", 次世代ナノシステムの創製 3 研究領域合同公開シンポジウム, 品川, 東京, 2013.10.07. (ポスター)

⑱ 高橋悠太, 加藤紀弘, 松永行子, "動的ゲル化法による束状ゲルの創製", 第 24 回医用高分子シンポジウム, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京, 2013.10.07. (ポスター)

⑲ 松永行子, "細胞社会の再構築による生命現象の解明", 第 2 回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 東大生研, 2013.06.12. (招待講演)

⑳ 高橋悠太, 加藤紀弘, 松永行子, "マイクロ流路デバイスを用いたゲルの三次元構造制御", 第 26 回高分子年次会, 京都国際会館, 京都, 2013.05.30 (口頭)

㉑ 松永行子, "再生医療へ向けた組織形成のためのマイクロ流体技術", 日本表面科学会, 摩擦の科学研究会, (成蹊大学) 2013.05.25 (招待講演)

㉒ Yukiko T. Matsunaga, "Bottom-up tissue engineering using microfluidics", ACS Poly/PMSE Division Student Chapter, Macromolecular Sci. & Eng. Center, University of Michigan, USA, 2013.04.15 (招待講演)

㉓ Yuta Takahashi, Norihiko Kato, Yukiko T. Matsunaga, "Formation of Bundle-like Structured Gels Using the Co-flow Microfluidic

Device", Society for Biomaterials Annual Meeting, 2013, Boston, U.S.A. 2013.4.10 (口頭)

〔図書〕 (計 1 件)

松永行子, "バイオマテリアルマイクロビーズによる三次元階層組織の高速形成", ゲルテクノロジーハンドブック, 監修中野義夫, pp.104-109, NTS Inc., 2014 年 10 月発刊 (分担執筆)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学生産技術研究所松永研究室 HP

<http://www.matlab.iis.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永行子 (津田行子) (MATSUNAGA YUKIKO) 東京大学・生産技術研究所・講師
研究者番号: 00533663

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし