

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820383

研究課題名(和文)再生医療用重厚臓器の創製に不可欠な生体と類似の毛細血管網構築手法の開発

研究課題名(英文)Development of vascular-like network for creating three-dimensional tissues

研究代表者

武井 孝行 (Takei, Takayuki)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90468059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲル部分の厚みが約50 μm の中空ゲルファイバーを積層することで、1本1本の血管が約100 μm の間隔で配置された生体血管網を模倣した流路ネットワークを構築した。その積層物中の個々のファイバーの中空部分に培地を流通させながら培養を行うことで、ファイバーのゲル部分に固定化したヒト肝癌由来細胞株の増殖を促すことができた。また、その細胞の機能は、培養により細胞数が増加する前後で変化がなかったことから、本法は個々の細胞に十分な酸素と栄養素を供給でき、生体血管網模倣技術として有用である。

研究成果の概要(英文)：We fabricated an engineered vascular-like network comprised assembled hollow alginate hydrogel microfibers. The distance between each flow microchannel (hollow core portions of the microfibers) were set to approximately 100 μm by using microfibers with a gel thickness of approximately 50 μm . Human hepatoblastoma cell line proliferated in the gel portions of the microfibers and maintained their specific function during perfusion culture for 7 days. These results showed that the novel vascular-like networks fabricated here have the potential to allow the creation of volumetric tissues in vitro.

研究分野：医用工学

キーワード：血管 再生医療 三次元組織

1. 研究開始当初の背景

「再生医療」の具現化を目指し、iPS 細胞などの各種幹細胞を利用して重厚な生体組織を人工的に創製する試みがなされている。重厚な組織を作るためには、その内部の細胞にまで十分な酸素・栄養を供給するために、1本1本の血管が約 100 μm の間隔で配置された生体血管網を模倣した流路ネットワークを構築できる技術の確立が必要である。

2. 研究の目的

本研究では微細な中空ゲルファイバーを利用することで、1本1本の流路が約 100 μm の間隔で配置された流路ネットワークならびにそれを利用した生体組織構築法の開発を目的とした(図 1)。

3. 研究の方法

(1) 中空ゲルファイバーの作製

ファイバーの作製には、2重円筒管を用いた(図 2)。具体的には、10%(w/v)ポリビニルアルコール(PVA)水溶液および 1%(w/v)アルギン酸ナトリウム(Na-Alg)水溶液をそれぞれ 2重円筒管の内筒および外筒に流し、100 mM 塩化カルシウム水溶液中に押し出した。ゲル化したファイバーをローラーで連続的に巻き取った。中空ゲルファイバーのゲル部分にヒト肝癌由来細胞株(HepG2)を包括する場合には、PVA と Na-Alg を Krebs-Ringer HEPES(KRH)緩衝液に溶解し、その Na-Alg 水溶液に HepG2 細胞を懸濁した。続いて、それらの溶液を用いて上記と同様の手順により中空ゲルファイバーを作製した。

(2) 培地流通培養

ローラーに巻き取った 200 本のファイバーの束(長さ: 3.5 cm、 3.8×10^5 cells/束)をプラスチック容器内に配置し(図 3(a))、アガロースを溶解した KRH 緩衝液(2%(w/v)、30 ℃)をその容器内に注ぎ、4 ℃ に冷やすことで溶液をゲル化させた(図 3(b))。続いて、容器の底板を取り外し、それをもう一つのプラスチック容器の上部に設置した後(図 3(c))、両容器内に培地を注ぎ、容器を密閉した。ポンプを用いて、下部容器内の培地を上部容器内に送液することで、上部容器内の圧力を上げ、中空ファイバーの束の中に培地を流通させた(図 3(d))。培養 1 および 7 日目の培地中に含まれるヒトアルブミンの濃度を ELISA 法により定量した。

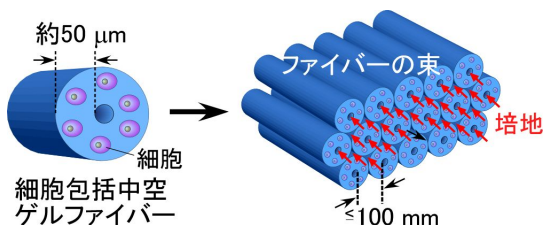


図 1. 中空ゲルファイバーを利用した本研究の流路ネットワーク作製法および生体組織構築法の概念図。

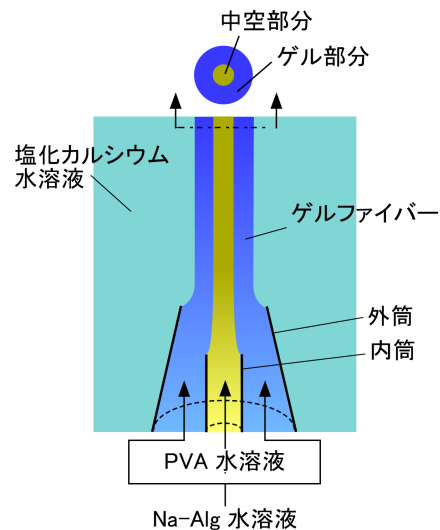


図 2. 中空ゲルファイバー作製法の概念図。

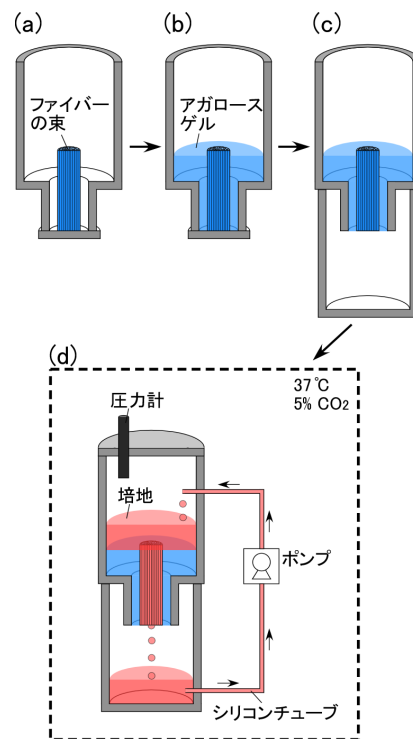


図 3. 培地流通培養手順。

4. 研究成果

(1) 中空ゲルファイバーの作製

本研究の手法により、1本1本の流路が約 100 μm の間隔で配置された流路ネットワークを作製するためには、ゲル部分の厚みが約 50 μm の中空ゲルファイバーが必要である(図 1)。そこで、ファイバーの外径ならびに中空径の制御を行った。2重円筒管の内径、外径、2重円筒管先端での PVA および Na-Alg 水溶液の流速、およびローラーの巻き取り速度をそれぞれ、410 μm、610 μm、2.0 mL/min、および 28.8 cm/s に固定し、PVA 流量比(=PVA 水溶液流量/PVA および Na-Alg 水溶液の合計流量)を 0.5 から 2.0 まで変化させ、得られたファイバーの外径および中空径を測定した。

PVA 流量比を変化させてもファイバーの外径はほとんど変化しなかった(図 4)。これは、PVA および Na-Alg 水溶液の合計流量を一定にしているためである。一方、ファイバーの中口径は PVA 流量比により大きく変化した。本法では、2 重円筒管より押し出す 2 水溶液のうち、Na-Alg 水溶液のみが塩化カルシウム水溶液中のカルシウムイオンによりゲル化することで、中空ゲルファイバーを作製できている。PVA 流量比の増加に伴って中口径も増加した理由は、カルシウムイオンによりゲル化しない PVA 溶液の流量が Na-Alg 水溶液の流量よりも相対的に増加したためである。また、PVA 流量比が 0.10 の時、目的としたゲル部分の厚みが約 50 μm のファイバーを作製で

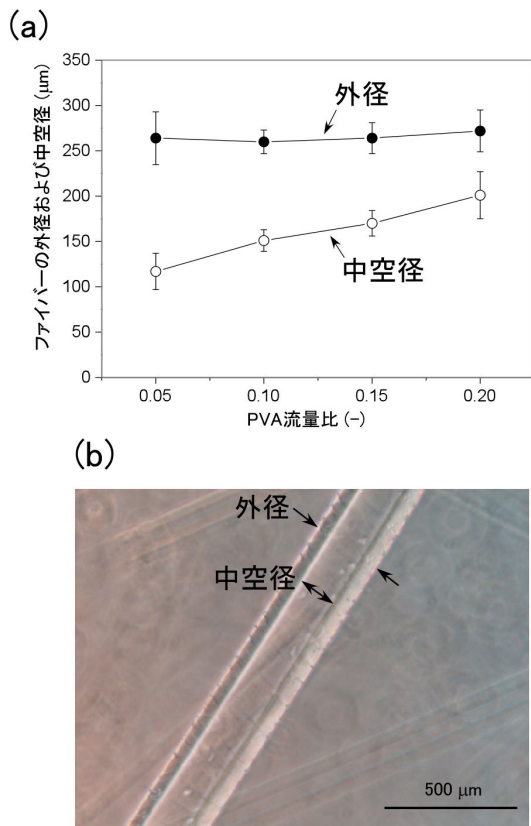


図 4. ファイバーの外径および中口径.

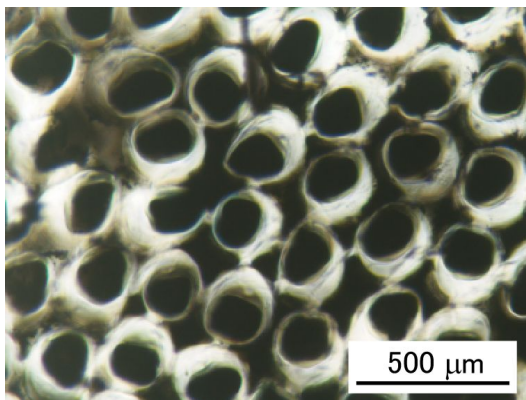


図 5. 墨汁を流通させたファイバーの束の断面.

きた。

(2) 培地流通培養

まずはじめに、図 3(d)の装置内に配置したファイバーの束内に墨汁を送液した(図 5)。ファイバーの束の断面を観察すると、ほとんどのファイバー(98 \pm 2%)の中空部分に墨汁が流れており、ファイバー中空部分への培地の送液が可能であることが示された。また、このファイバーの束の断面写真より、ファイバーの中空部分の間隔は約 100 μm であり、目的とした“1 本 1 本の流路が約 100 μm の間隔で配置された流路ネットワーク”を作製できた。

ファイバーの束への培地の流通後、1 およ

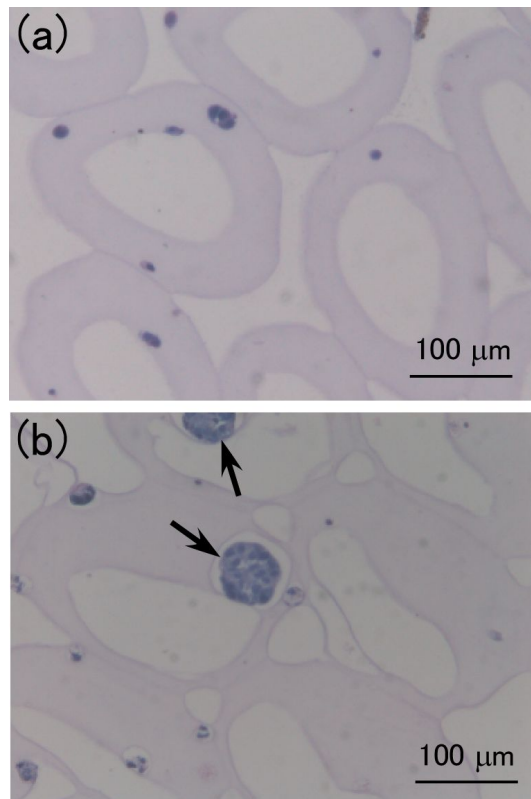


図 6. 1 日目(a)および 7 日目(b)のファイバーの束の断面のヘマトキシリン & エオシン染色写真. 矢印は細胞凝集体を示す.

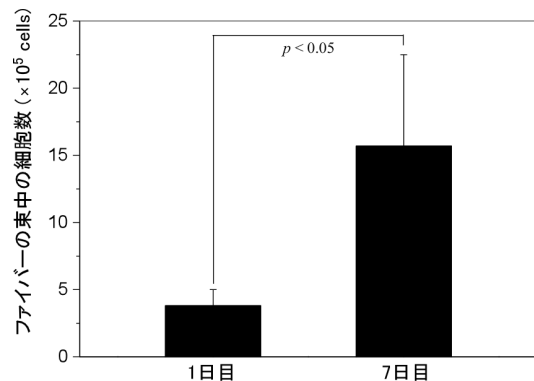


図 7. ファイバーの束内の細胞数.

表 1. ファイバーの束内の 1 細胞あたりのアルブミン分泌速度.

培養日数	アルブミン分泌速度 (ng/day/cell)
1 日目	68 ± 33
7 日目	67 ± 28*

* $p = 0.94$ vs 1 日目

び 7 日目のファイバー断面のヘマトキシリン & エオシン染色写真を図 6 に示す。細胞数は培養 1 日目から 7 日目にかけて、約 4 倍に増加した(図 7)。一方、1 細胞あたりのヒトアルブミンの分泌速度は、培養 1 および 7 日目において統計的に優位な差はなかった(表 1)。これは、細胞が増殖した 7 日目においてもファイバー内の細胞は十分な酸素と栄養素の供給を受けていることを示しており、本研究の生体血管網模倣技術の有用性を示している。

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)

Takayuki Takei, Jyunpei Kitazono, Sadao Tanaka, Hiroto Nishimata, Masahiro Yoshida, Necrotic regions are absent in fiber-shaped cell aggregates, approximately 100 μm in diameter, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 査読有, in press
DOI: 10.3109/21691401.2014.909824

Takayuki Takei, Ryuta Aokawa, Takamasa Shigemitsu, Koei Kawakami, Masahiro Yoshida, Fabrication of uniformly cell-laden porous scaffolds using a gas-in-liquid templating technique, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, in press
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.017

Takayuki Takei, Hiroki Yoshitomi, Masahiro Yoshida, Alkali-treated collagen hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor for enhanced angiogenesis, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 査読有, Vol. 47, 2014, pp. 424-428
DOI: 10.1252/jcej.13we366

武井 孝行, 岸原 尚也, 吉田 昌弘, 動物細胞包括中空ヒドロゲルファイバーを用いた小口径血管様構造体の作製, *科学・技術研究*, 査読有, Vol. 3, 2014, pp. 133-136
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ssl/3/2/3_133/_pdf

[学会発表](計 12 件)

武井 孝行, バイオマテリアルとしての工学的応用展開を目指した新規機能性ヒドロゲルの創製, 化学工学会第 80 年会, 2015 年 3 月 19 日-21 日, 芝浦工業大学(東京都・江東区)

武井 孝行, 重光 孝政, 吉田 昌弘, 発泡法を応用した多孔質スキャホールドへの細胞の均一固定化法, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日-18 日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

寺園 圭太, 武井 孝行, 大角 義浩, 吉田 昌弘, 管状生体組織構築用の細胞接着性を有する中空ゲルファイバーの開発, 化学工学会第 46 秋季大会, 2014 年 9 月 17 日-19 日, 九州大学(福岡県・福岡市)

北園 純平, 武井 孝行, 大角 義浩, 吉田 昌弘, 細胞包括中空ゲルファイバーを使用した新規生体組織作製方法の開発, 化学工学会第 46 秋季大会, 2014 年 9 月 17 日-19 日, 九州大学(福岡県・福岡市)

武井 孝行, 青川 竜大, 重光 孝政, 吉田 昌弘, 発泡法を利用した動物細胞均一固定化多孔質スキャホールドの作製, 化学工学会第 46 秋季大会, 2014 年 9 月 17 日-19 日, 九州大学(福岡県・福岡市)

寺園 圭太, 武井 孝行, 大角 義浩, 吉田 昌弘, 血管構築用の細胞接着性を有する中空ゲルファイバーの作製, 第 25 回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会, 2014 年 7 月 26 日, ANA ホリデイ・インリゾート宮崎(宮崎県・宮崎市)

寺園 圭太, 武井 孝行, 大角 義浩, 吉田 昌弘, 管状生体組織構築用の中空ゲルファイバーの開発, 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 2014 年 6 月 28 日, AIM ビル(福岡県・北九州市)

Junpei Kitazono, Takayuki Takei, Yoshihiro Ozuno, Masahiro Yoshida, Fabrication of linear tissue-like construct using hollow gel fibers, The 26th International Symposium on Chemical Engineering, 2013 年 12 月 6 日-8 日, Busan (Korea)

北園 純平, 武井 孝行, 大角 義浩, 吉田 昌弘, 中空ゲルファイバーを利用した細胞凝集塊の作製, 化学工学会第 45 回秋季大会, 2013 年 9 月 16 日-18 日, 岡山大学(岡山県・岡山市)

Takayuki Takei, Zyunpei Kitazono, Masahiro Yoshida, Calcium-alginate

hydrogel hollow microfibers for production of filament-like tissues, 19th International Symposium on Microencapsulation, 2013年9月9日-11日, Pamplona (Spain)

吉富 滉生, 武井 孝行, 吉田 昌弘, アルカリ処理コーゲンゲルの作製および血管新生療法への応用, 第 50 回化学関連支部合同九州大会, 2013年7月6日, AIMビル(福岡県・北九州市)

北園 純平, 武井 孝行, 吉田 昌弘, 中空ゲルファイバーを利用した細胞凝集塊サイズの制御方法の開発, 第 50 回化学関連支部合同九州大会, 2013年7月6日, AIMビル(福岡県・北九州市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ecp.cen.kagoshima-u.ac.jp/~koubutsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 孝行 (TAKEI TAKAYUKI)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90468059