

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05697

研究課題名(和文) 組織再生のための細胞封入ファイバースキャホールドの創製技術の開発

研究課題名(英文) Development of cell-enclosing fiber scaffold for tissue regeneration

研究代表者

森田 有亮 (MORITA, YUSUKE)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：80368141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：塩化カルシウム溶液内に押出した軟骨細胞混合アルギン酸ナトリウム(SA)をドラムで巻取ることによってシート状のファイバースキャホールドを作製する紡糸技術を開発した。軟骨細胞がファイバー内で一様に分布し、巻取り速度とトラバース速度を変えることでファイバーピッチと細胞ピッチが制御できることを確認した。スキャホールド内において、低細胞密度ではコラーゲンは局在したが、高細胞密度では一部のコラーゲンがファイバー状に分布する様子が確認された。EDTA処理によりスキャホールドからSAを除去した場合、細胞ピッチ $33.7 \pm 15.1 \mu\text{m}$ のスキャホールドにおいて産生された細胞外基質によりファイバー構造が維持された。

研究成果の概要(英文)：The spinning device was developed to fabricate chondrocytes-enclosing fiber scaffolds. The fiber scaffolds were fabricated by collecting chondrocytes-enclosing sodium alginate fiber in the CaCl_2 solution using the winding drum. Chondrocytes were distributed uniformly in the fiber, and the fiber pitch and cell pitch were controlled by changing the winding speed and traverse speed. Collagen was locally existed around cells in the fiber scaffold for low cell density, whereas collagen was existed along the fiber in the fiber scaffold for high cell density. When sodium alginate was removed from the fiber scaffold by EDTA treatment, the fiber structure was maintained by synthesized extracellular matrix in the case of $33.7 \pm 15.1 \mu\text{m}$ of cell pitch.

研究分野：機械材料・材料力学

キーワード：細胞封入ファイバー スキャホールド アルギン酸ナトリウム 組織再生 湿式紡糸 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

組織再生に関して臨床的な試みがさまざまな部位の損傷に対して活発に行われているが、患者の早期社会復帰を考えると生体内外での再生をさらに促進させるといった現実的な要求がある。患者の早期治癒のため移植された再生組織が生体内において機能するには、周辺組織との力学的挙動の一致といった十分な力学的特性の獲得が不可欠である。生体外で培養された再生組織の力学機能の向上には、組織内に細胞が一様に分布し、生体組織に類似した均質な組織構造の形成が不可欠となる。一方で、培養組織は単一の組織で形成されるため血管などの循環器官をもたず、組織成熟に伴う栄養供給の制限により長期培養は細胞活性の低下ひいては細胞死を引き起こす。そのため、*in vitro* で再生された組織の力学特性は生体組織に遠く及ばないのが現状である。より効率的に3次元構造の再生組織を作製するために、一様な細胞分布と栄養供給の維持を可能とする細胞-スキャホールド複合体の作製技術に対する開発要求は非常に高い。

組織再生用スキャホールドの開発における主要課題のひとつは、生体特有の力学機能を発現させるための細胞-スキャホールド複合体内部での細胞分布を制御する技術である。生体組織は3次元構造を維持するためにさまざまな細胞外基質からなる立体構造を有しており、細胞はその3次元構造内に一様に分布している。例えば軟骨組織ではコラーゲン線維が階層構造を形成し、表層では水平方向、中層にかけてはランダム配向、深層では垂直方向とコラーゲン配向が変化することで、荷重支持性と衝撃吸収性に富んだ軟骨特有の力学挙動を実現している。組織工学では、このネットワーク構造を模擬するように繊維状やスポンジ状のスキャホールドが開発されているが、これらのスキャホールドに播種された細胞の多くは表層部や底部に留まり、全層に対して一様に分布させることが困難である。この細胞の不均一な分布は局所的な細胞外基質の構築を生じさせ、力学的機能の獲得を阻害することになる。

組織再生用スキャホールドの開発における主要課題のもうひとつは、栄養供給路の確保による細胞活性維持である。生体外でスキャホールドに播種して培養される細胞周辺には血管は存在せず培養組織の成熟に伴い培養液(栄養)の供給が阻害されてゆく。生体内において血管を有しない軟骨組織であっても、生体外培養においては組織の厚さが500 μm を超えると培養日数に伴い細胞死が引き起こされる。このように生体外で十分なサイズの組織を構築するには、組織が成熟・形成される十分な培養期間の確保と、その間の細胞活性の維持が不可欠である。しかしながら、3次元構造を形成させるスキャホールドそのものに栄養供給路を確保することで細胞活性の長期維持を確保するものは無い。

2. 研究の目的

本研究では、細胞を封入したファイバーを集積することで細胞の一様な分布を実現しつつ、生体組織の3次元ネットワーク構造を模擬するファイバースキャホールドの創製技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞封入アルギン酸ナトリウム(SA)ファイバーの作製

軟骨細胞封入ファイバーの作製は、アルギン酸ナトリウム(Sodium Alginate: SA)溶液と塩化カルシウム溶液が接触するとSAが固化する性質を利用した。

ブタ軟骨細胞を混合したSA溶液を塩化カルシウム溶液中に押し出し、ファイバー化した細胞混合SA溶液を塩化カルシウム溶液内で巻取ることが可能なSAファイバー紡糸装置を作製した。

(2) 軟骨細胞封入SAファイバーの3次元構造化技術の開発

ブタ軟骨細胞とSAをDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に混合することで細胞混合SA溶液を作製した。細胞密度は 1.5×10^6 、 1.75×10^6 および 2.0×10^6 cells/mlとした。

開発したSAファイバー紡糸装置を用いてドラムの巻取り速度およびトラバース速度を変化させることでファイバー径およびファイバーピッチの制御を試みた。巻取り速度は60, 80, 100 および 120 mm/s とし、トラバース速度は20, 40, 60 および 80 mm/s とした。位相差顕微鏡を用いて作製されたファイバーシートの形態観察を行い、画像解析によりファイバー径およびファイバーピッチを測定した。また、巻取り速度60, 80, 100 および 120 mm/s、トラバース速度100 mm/s の条件下で、細胞密度 1.5×10^6 、 1.75×10^6 および 2.0×10^6 cells/ml としたファイバー内の細胞ピッチの変化を測定した。位相差顕微鏡を用いて、作製した各ファイバーの形態観察を行うとともに、画像解析により細胞ピッチを測定した。

(3) 軟骨細胞封入SAファイバースキャホールドの培養および細胞活性評価

細胞密度を 1.0×10^6 、 2.0×10^6 、 3.0×10^6 および 4.0×10^6 cells/ml としたブタ軟骨細胞混合SA溶液を準備した。開発したSAファイバー紡糸装置で巻取ったファイバーを展開することで、シート状の細胞封入SAファイバースキャホールドを作製した。スキャホールドを位相差顕微鏡で観察し、画像解析ソフトによりファイバー内の細胞ピッチを測定した。また、紡糸が細胞に与えるダメージを評価するため、ファイバー内の生細胞をCalcein AM、死細胞をEthidium homodimerで染色し蛍光観察により細胞の生存率を算出した。培養14日後に、多光子励起顕微鏡(MPM)を用いた

第二高調波発生 (SHG) 光の検出によるコラーゲンの3次元観察およびサフラニンO染色によるプロテオグリカンの産生評価を行った。

形成された軟骨組織の構造化を評価するため、培養14日後にキレート剤であるEDTAを添加することでSAを除去した。産生された軟骨組織のみとしたスキャホールドをサフラニンO染色により観察した。

4. 研究成果

(1) 軟骨細胞封入アルギン酸ナトリウム (SA) ファイバーの作製

図1に開発したSAファイバー紡糸装置を示す。紡糸装置は、SA溶液を押し出すノズルとシリンジポンプ、SA溶液を固化させるための塩化カルシウム溶液槽、巻取りドラムで構成されている。ノズルとして用いた細胞混合SA溶液を押し出す注射針の先端には、ガラス管を引き延ばして加工したマイクロピペットを取り付けた。巻取りドラムは、スピードコントロールモーターユニットにより回転速度の調整が可能である。また、ファイバーをシート状とするため、ファイバーを水平移動させるトラバース機構を設けた。トラバース機構のファイバー誘導端子が巻取りドラムと平行に移動することにより、ファイバーがドラムにシート状に巻き取られる。ドラム回転速度とトラバース速度を変化させることで、ファイバーの密度を変化させることが可能な機構とした。

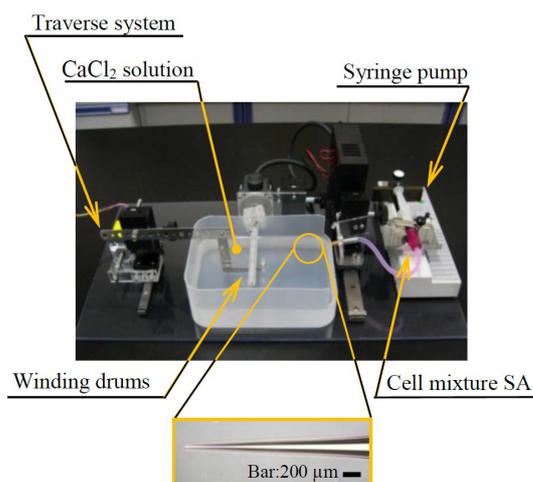


図1 SAファイバー紡糸装置

SA溶液濃度が0.5から1.0 w/v%、塩化カルシウム溶液濃度が1.2 w/v%、巻取り速度が60から100 mm/sの条件において軟骨細胞封入SAファイバーの作製が可能であった。図2に開発したSAファイバー紡糸装置により作製した軟骨細胞封入SAファイバーの位相差顕微鏡写真を示す。SAファイバー内に軟骨細胞が分布している様子が確認された。

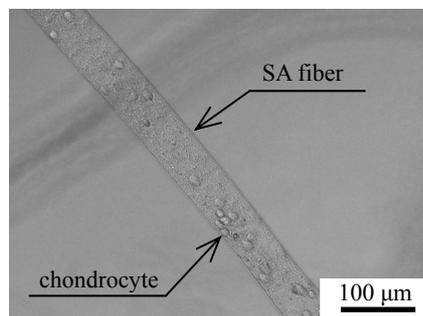


図2 軟骨細胞封入SAファイバー

(2) 軟骨細胞封入SAファイバーの3次元構造化技術の開発

作製した軟骨細胞封入SAファイバー・スキャホールドの観察画像を図3に示す。ファイバーが交差しながら集積することで、3次元構造を形成する様子が観察された。また、ファイバー内部に軟骨細胞が配置されている様子も観察され、紡糸と細胞播種が同時に可能であることが示された。

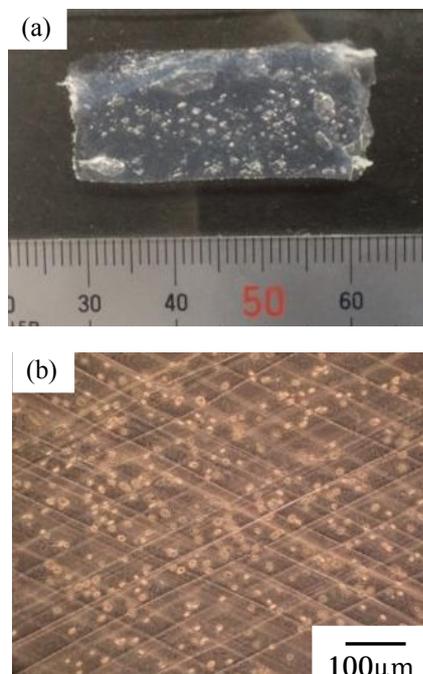


図3 作製した軟骨細胞封入SAファイバー・スキャホールド; (a)スキャホールド全体像、(b)スキャホールド表面のファイバー形態。

巻取り速度100 mm/sまでは安定してファイバーが巻取り可能であったが、巻取り速度100 mm/s以上ではファイバーの破断により継続した巻取りが困難であった。また、トラバース速度60 mm/s以上でも、ファイバーの破断により継続した紡糸が困難であった。ファイバー径はトラバース速度には依存せず、巻取り速度によって変化する傾向が見られた。巻取り速度を上昇させることで、ファイバーが引き伸ばされ、ファイバー径が減少したと考えられる。ファイバー径は、78.2 μm

から 103.8 μm の範囲で調節可能であった。

ファイバーピッチは、巻取り速度およびトラバース速度に大きく依存することが確認された。トラバース速度の低下および巻取り速度の上昇に伴い、ファイバーピッチは減少した。ファイバーピッチは、5.1 mm から 21.4mm の範囲で調節可能であった。

細胞ピッチは、細胞密度および巻取り速度に大きく依存する傾向が確認された。細胞密度の減少および巻取り速度の上昇により、細胞ピッチは増加する傾向が見られた。巻取り速度に細胞ピッチが依存した原因として、巻取り速度の上昇によりファイバーがより引き伸ばされることで内部の細胞間の距離が広がったと考えられる。細胞ピッチは 28.8 μm から 66.3 μm の範囲で調節可能であった。

(3) 軟骨細胞封入 SA ファイバースキャホールドの培養および細胞活性評価

作製したスキャホールドのファイバー径は約 70 μm であった。細胞密度 1.0×10^6 、 2.0×10^6 、 3.0×10^6 および 4.0×10^6 cells/ml における細胞ピッチは、それぞれ 79.6 ± 44.1 、 65.4 ± 32.7 、 45.3 ± 20.7 および 33.7 ± 15.1 μm となり、細胞密度の増加に伴い細胞ピッチが短くなった。また、いずれの細胞密度においても細胞生存率は 83%以上を示した。

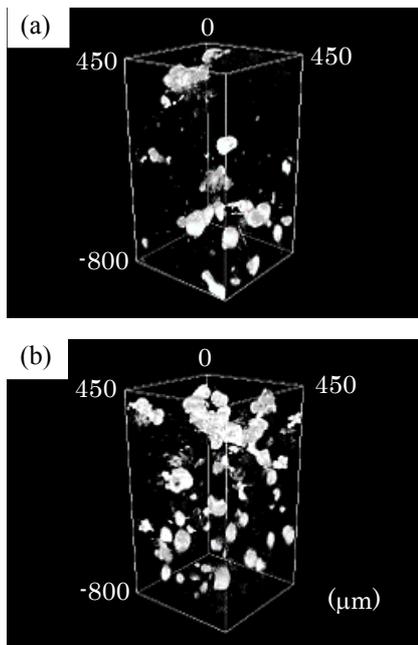


図4 培養14日後のスキャホールド内におけるコラーゲンのSHG像；(a) 1.0×10^6 cells/ml, (b) 4.0×10^6 cells/ml .

SHG 光の検出により得られたスキャホールド内のコラーゲン分布を図4に示す。細胞密度 1.0×10^6 cells/ml においてコラーゲンは局在したが、細胞密度 4.0×10^6 cells/ml において一部のコラーゲンがファイバー状に分布する様子が確認された。サフラニンOで染色したスキャホールドの観察画像を図5に示す。

細胞周囲にプロテオグリカンの産生が確認された。また、プロテオグリカンがファイバーに沿って産生されており、ファイバー状の組織の形成が確認された。

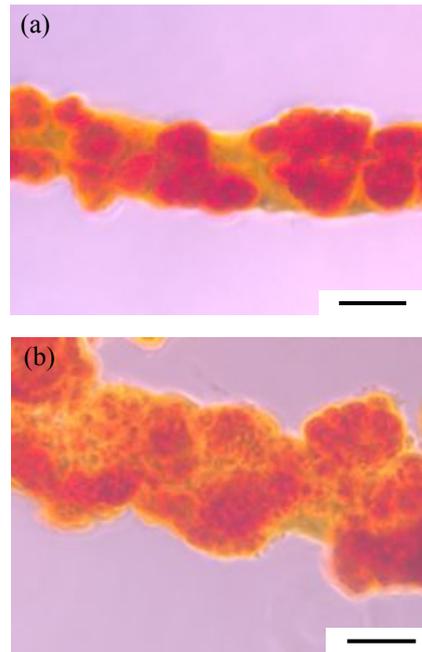


図5 培養14日後のスキャホールド内における細胞外基質のサフラニンO染色画像($\times 200$, Bar: 100 μm) ; (a) 1.0×10^6 cells/ml, (b) 4.0×10^6 cells/ml .

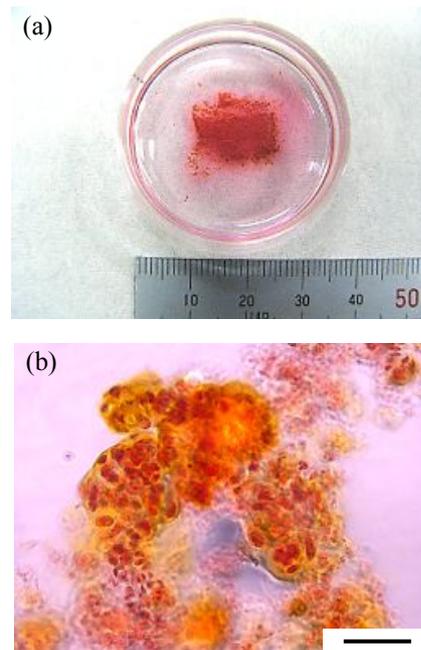


図6 培養14日後にEDTA処理を施したスキャホールドのサフラニンO染色画像；(a) 全体像, (b) ファイバー部($\times 200$, Bar: 100 μm) .

SA を除去したスキャホールドの観察画像を図6に示す。細胞密度の増加に伴い、細胞外基質および軟骨細胞のみで構築された組

織は大きくなった。また，細胞密度 4.0×10^6 cells/ml のスキャホールドでは，隣り合う細胞間がプロテオグリカンで満たされており，SA 除去後も形態が維持されていた。細胞密度 3.0×10^6 cells/ml 以下では細胞ピッチが長いいため，産生されたプロテオグリカンにより細胞間が満たされず（図 5(a)），SA の除去とともに軟骨組織が崩れたと考えられる。SA の EDTA 処理後は細胞ピッチ $33.7 \pm 15.1 \mu\text{m}$ のスキャホールドのみ形態が維持された。これらより，培養した軟骨細胞封入 SA ファイバースキャホールドより SA を除去することで，産生された細胞外基質のみで 3 次元構造の軟骨組織の作製が可能であることが示唆された。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

Yuki Niida, Yuske Morita, Eiji Nakamachi, Fabrication of Fiber Scaffold with Chondrocyte-Enclosing alginate Fliber for Cartilage Regeneration, 6th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, 2015/12/6-10, Waikoloa, Hawaii

吉富健太, 山本浩司, 仲町英治, 石津智寛, 森田有亮, 軟骨細胞封入アルギン酸ファイバースキャホールドの作製技術の開発, 日本機械学会関西学生会 2017 年度学生員卒業研究発表講演会, 2018 年 3 月 10 日, 摂南大学（大阪府寝屋川市）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 有亮 (MORITA YUSUKE)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：80368141

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()