

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06547

研究課題名(和文) 次世代型再生医療の具現化に必要な生体血管網模倣技術および重厚臓器創製技術の開発

研究課題名(英文) In vitro fabrication of vascular capillary network for organ creation

研究代表者

武井 孝行 (TAKEI, Takayuki)

鹿児島大学・理工学域工学系・准教授

研究者番号：90468059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、移植医療に適用できる臓器を人工的に創製するために不可欠な毛細血管網の再現技術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。毛細血管網の鋳型としてゼラチンのマイクロファイバーを利用することで、コラーゲンゲル中に毛細血管網様流路ネットワークを作製できた。その流路内に培地を流通させることで、あらかじめゲル内に封入した臓器細胞を増殖させることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to fabricate vascular capillary network in vitro for organ creation. We fabricated capillary network in collagen gel using gelatin microfibers as a template of the capillary network. Perfusion of culture medium into the capillary network enhanced proliferation of organ cells in collagen gel.

研究分野：医用化学工学

キーワード：血管網

1. 研究開始当初の背景

「再生医療」の具現化の目指し、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必要な生体と類似の毛細血管網を構築できる技術の確立が必要である。

2. 研究の目的

本研究では微細なファイバーを用いた生体と類似の毛細血管網構築法ならびにそれを利用した生体組織の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 毛細血管網の作製およびそれを利用した細胞培養

ゼラチンファイバーの作製

1% (w/v) アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) 水溶液 (80) が入ったシリンジを二重円筒管の外筒に、10% (w/v) ゼラチン水溶液 (80) が入ったシリンジを二重円筒管の内筒につないだ。シリンジポンプを用いて円筒管から Na-Alg 水溶液とゼラチン水溶液を 100 mM 塩化カルシウム (CaCl₂) 水溶液 (4) 中に押し出すことで、内部に微細なゼラチンゲルファイバーを含む Ca-Alg ゲルファイバーを作製した (図 1)。なお、Na-Alg 水溶液は Ca²⁺ を取り込むことでゲル化し、ゼラチン水溶液は冷却によりゲル化する。そのファイバーをローラーにより連続的に巻き取った。Na-Alg 水溶液とゼラチン水溶液の総流量を 3 ml/分に固定し、その総流量に対するゼラチン水溶液の流量比を変化させることでゼラチンファイバーの直径を制御した。ローラーから回収した Ca-Alg/ゼラチンゲルファイバーを蒸留水 (4) でよく洗浄し、100 mM クエン酸三ナトリウム水溶液に 48 時間浸すことで Ca-Alg ゲルを除去した。続いて、ゼラチンゲルファイバーを乾燥させることで綿飴状の固形ファイバーを得た。

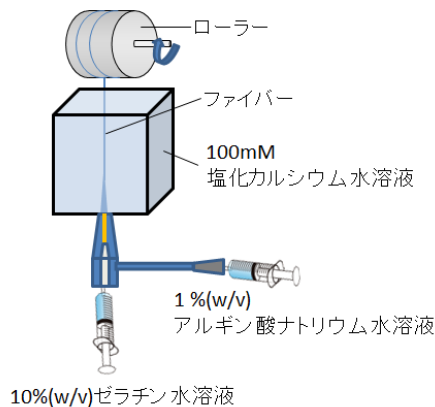


図 1. ファイバー作製法.

毛細血管網様流路ネットワークの作製

透明プラスチック容器内に注射針 2 本を平行に配置し、その 2 本の針と接するように針間に綿飴状ゼラチンファイバーを配置した。その容器を 0.3% Type I コラーゲン水溶液 (pH7.4、4) で満たし、脱気処理により、ファイバー間にコラーゲン水溶液を浸潤させた。続いて、37 に昇温することでコラーゲン水溶液のゲル化ならびにゼラチンファイバーの溶解を同時に行った。2 本の針をコラーゲンゲルから引き抜くことで直線状の流路を作製し、その流路内にヘパリン処理したラットの血液を流した。

毛細血管網様流路ネットワークを利用した細胞培養

上記のコラーゲン水溶液に肝癌細胞 (Hep G2) を加え、以降、と同様の手順により Hep G2 を含むコラーゲンゲル中に毛細血管網様流路を作製した後に、その内部に培地を流しながら培養した。

(2) 骨再生用スポンジゲルの調製

0.1 M 2-メルホリノエタンスルホン酸緩衝液 (pH4) にキトサンを濃度が 1% (w/v) となるように加えて 2 時間攪拌した。キトサン溶液にグルコン酸ナトリウム、水溶性カルボジイミドおよび N-ヒドロキシコハク酸イミドをそれぞれ加えて、24 時間攪拌した。pH を 7.0 に調整し、透析後、凍結乾燥した。以上の操作により、キトサンのグルコサミン単位 100 個当たりグルコン酸を 11 個導入したキトサン誘導体 (GC) を作製した。続いて、精製水に 2% (w/v) となるように GC を加え、HCl 溶液を用いて溶液 pH を 4.0 に調整した後、一晚攪拌し、GC を溶解させた。GC 溶液に NaOH 溶液を加え、pH を 7.0 とした後、-20 で 6 時間凍結し、室温で 2 時間かけて融解することで GC スポンジゲルを調製した。作製したスポンジゲルを 200 mM CaCl₂/Tris-HCl 水溶液および 120 mM Na₂HPO₄ 水溶液に交互に 2 時間毎浸漬した。この工程を 1 サイクルとして 0-10 サイクル行った。

4. 研究成果

(1) 毛細血管網の作製およびそれを利用した細胞培養

ゼラチンファイバーの作製

ゼラチン水溶液の各流量比において作製したゼラチンゲルファイバーの写真とその直径を図 2 に示す。流量比を変化させることでファイバー径の制御は可能であった。また、流量比が 0.000833 の条件で作製したファイバーの直径は、11±2 μm であり、目標とした直径約 10 μm 程度のゼラチンファイバーを作製できた。

真空乾燥後のゼラチンファイバーの束の外観およびその拡大像を図 3 に示す。図 3(a) より、ゼラチンファイバーは綿飴状になって

いることを確認した。また、図 3(b)より、各ファイバーの間隔は $100\ \mu\text{m}$ 以下であり、目指した毛細血管網様流路ネットワークの鋳型を作製できた。

毛細血管網様流路ネットワークの作製

ゼラチンファイバーを用いてコラーゲンゲル中に毛細血管とほぼ同じ径の流路を作製できるかを、まず、ゼラチンファイバー1本を用いて調査した。なお、流路形成の確認のために蛍光色素標識ポリスチレンビーズ（直径 $1\ \mu\text{m}$ ）を包括したゼラチンファイバーを用いた。ファイバー1本を投入したコラー

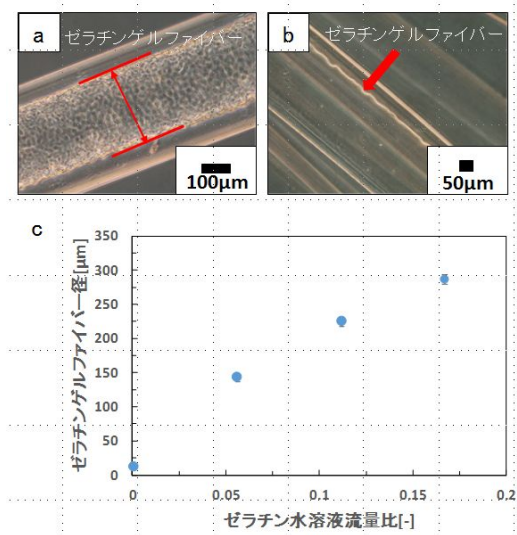


図 2. ゼラチン水溶液流量比(a)0.167 および(b)0.000833 により作製したファイバーの写真および(c)ゼラチン水溶液流量比とゼラチンファイバー径との関係。

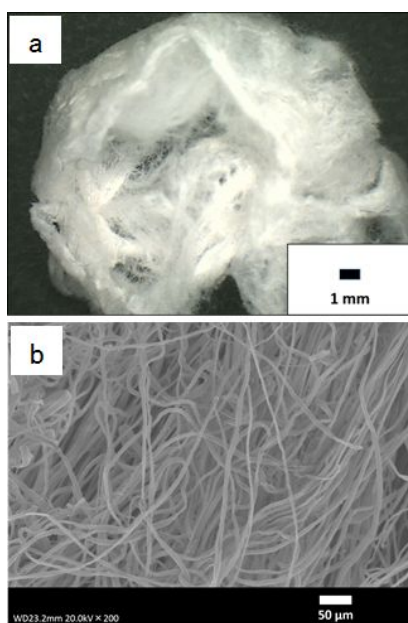


図 3. 真空乾燥後のゼラチンファイバーの束の(a)外観および(b)その拡大像。

ゲン水溶液を 37°C に昇温し、30 分後に蛍光顕微鏡により観察したところ、ファイバーを配置した部分において、蛍光粒子が流動している様子を確認できた。この結果は、コラーゲンゲル内でゼラチンファイバーに由来する流路が作製できたことを示している。そこで次に、実験方法に記載の手順で綿飴状のファイバーをコラーゲンゲル内で溶解し、針に由来する流路を介してその内部にラットの血液を流通させることを試みた。その結果、ファイバーを配置していた部位に血液が流通する様子を確認できた(図 4)。また、そのコラーゲン薄切片の SEM 観察写真を図 5 に示す。図 5 より、コラーゲン中でゼラチンファイバーが溶解したことで形成された流路断面を観察できた。

毛細血管網様流路ネットワークを利用した細胞培養

コラーゲンゲル中の毛細血管網様流路ネットワークの部位において、目視での判定であるが HepG2 細胞の増殖が確認された。

(2) 骨再生用スポンジゲルの調製

上記の毛細血管網様流路ネットワークを利用して骨組織を構築する場合に適したゲル材料の開発に取り組んだ。具体的に、われわれはこれまでに、キトサンにグルコン酸を修飾したキトサン誘導体を水に溶かし、それを凍結後、融解するだけでゲルを調製できることを示している。本検討では、そのゲルを骨再生に使用できるように骨の成分である

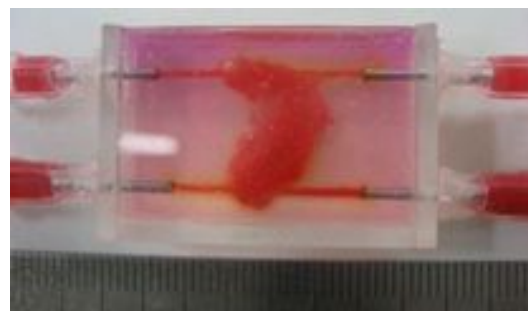


図 4. 血液を流通させた毛細血管網様流路ネットワーク。

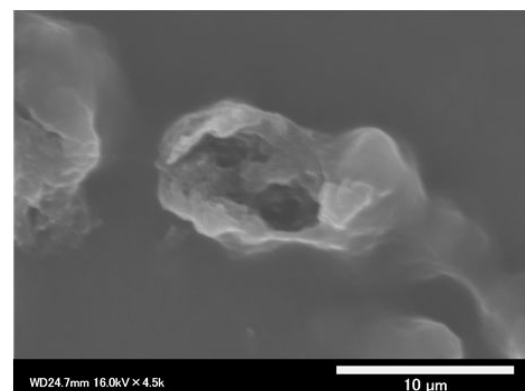


図 5. コラーゲンゲル薄切片中の流路断面。

ヒドロキシアパタイトでコートすることを試みた。表面形状観察写真を図6に示す。交互浸漬サイクルを増加させることで、ゲル骨格上でのアパタイトと考えられる粒子の積層量は増加した。交互浸漬法では GC スポンジ上で Ca イオンと P イオンのイオン交換が行われてアパタイトが形成する。交互浸漬サイクル数を増加させることで、このイオン交

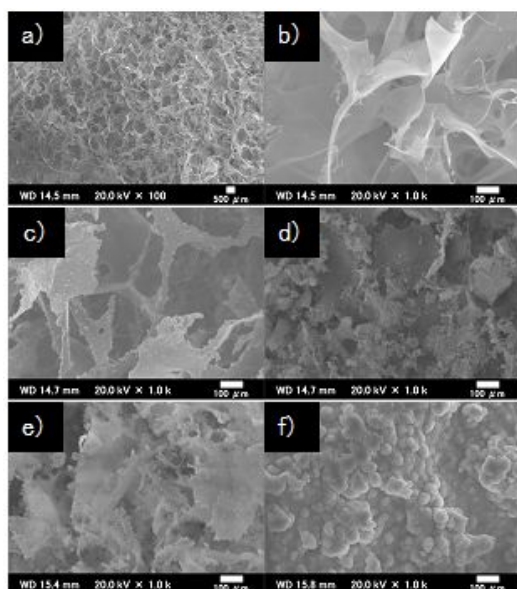


図6. (a, b)0 サイクル、(c)1 サイクル、(d)3 サイクル、(e)5 サイクル、(f)10 サイクル処理を行った GC スポンジゲルの表面。

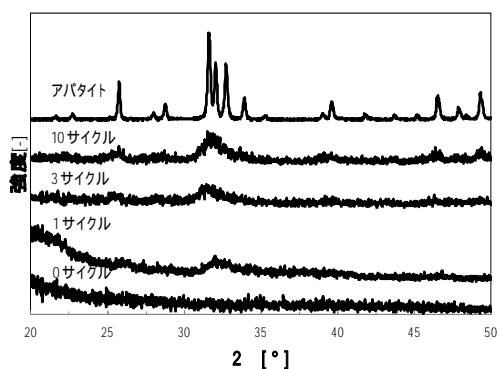


図7. GC スポンジゲルのX線回折。

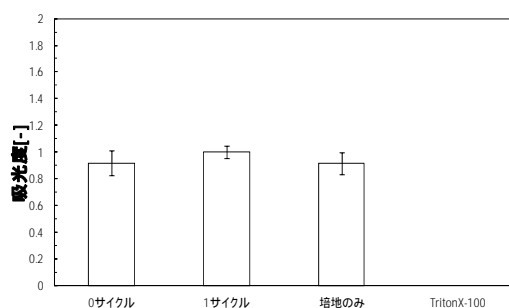


図8. GC スポンジゲルの細胞毒性。

換が進み、より多くのアパタイトが形成されたと考えられる。

結晶構造解析結果を図7に示す。交互浸漬処理を施したスポンジにおいて、アパタイト固有のピーク($2\theta = 26, 32^\circ$)がみられた。交互浸漬サイクル数が増加するに従ってアパタイトのピークがより顕著に表れた。

細胞毒性評価結果を図8に示す。アパタイトを被覆したスポンジにおいて、アパタイトを被覆していないスポンジおよび、培地のみで細胞を処理したものとほぼ同等の細胞活性をえられた。これは細胞が問題なく生存できることを表しており、本アパタイト被覆 GC ゲルは細胞毒性が低く、骨再生医療に応用可能であるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Takayuki Takei, So Danjo, Shogo Sakoguchi, Sadao Tanaka, Takuma Yoshinaga, Hiroto Nishimata, Masahiro Yoshida, Autoclavable physically-crosslinked chitosan cryogel as a wound dressing, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol.125, 2018, pp.490-495
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.10.015

Takayuki Takei, Kohei Fukumoto, So Danjo, Takuma Yoshinaga, Hiroto Nishimata, Masahiro Yoshida, In vitro and in vivo characterization of hydroxyapatite/chitosan-gluconic acid conjugate scaffolds, Journal of Chemical Engineering of Japan, 査読有, Vol.50, 2017, pp.577-582
DOI: 10.1252/jcej.16we202

Takayuki Takei, Hiroki Yoshitomi, Kohei Fukumoto, So Danjo, Takuma Yoshinaga, Hiroto Nishimata, Masahiro Yoshida, Toxic chemical cross-linker-free cryosponges made from chitosan-gluconic acid conjugate for chondrocyte culture, Journal of Chemical Engineering of Japan, 査読有, Vol.50, 2017, pp.142-148
DOI: 10.1252/jcej.16we145

Takayuki Takei, Shinji Sakai, Masahiro Yoshida, In vitro formation of vascular-like networks using hydrogels, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol.122, 2016, pp.519-527
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.023

Takayuki Takei, Zyunpei Kitazono, Yoshihiro Ozuno, Takuma Yoshinaga, Hiroto Nishimata, Masahiro Yoshida, Vascular-like network prepared using hollow hydrogel microfibers, Journal of

Bioscience and Bioengineering, 査読有,
Vol.121, 2016, pp.336-340
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.06.018

〔学会発表〕(計8件)

Yusuke Yanagi, Takayuki Takei,
Yoshihiro Ozuno, Masahiro Yoshida,
Development of blood capillary-like
channel networks fabricated using cotton
candy-like gelatin fibers as template of
channels, The 29th International
Symposium on Chemical Engineering, PA-01,
2016

柳雄介, 武井孝行, 大角義浩, 吉田昌弘,
綿飴状ゼラチンファイバーを用いた毛細血
管網再現法の開発, 日本バイオマテリアル
学会シンポジウム 2016, 1P-091, 2016

Yusuke Yanagi, Takayuki Takei,
Yoshihiro Ozuno, Masahiro Yoshida,
Capillary-like network fabricated using
“cotton candy”-like gelatin microfibers,
22nd Symposium of Young Asian Biochemical
Engineers' Community, PA-40, 2016

柳雄介, 武井孝行, 大角義浩, 吉田昌弘,
マイクロゼラチンファイバーを用いた毛細
血管網再現法の開発, 第27回九州地区若手
ケミカルエンジニア討論会, 48, 2016

柳雄介, 武井孝行, 大角義浩, 吉田昌弘,
綿飴状ゼラチンファイバーを血管の鑄型と
する毛細血管網模倣技術の開発, 第53回化
学関連支部合同九州大会, CE-1-022, 2016

武井孝行, 北園純平, 大角義浩, 吉永拓
真, 西俣寛人, 吉田昌弘, 中空ゲルファイ
バーを利用した生体毛細血管網の工学的模
倣技術, 第67回日本生物工学会大会,
3P-254, 2015

Takayuki Takei, Junpei Kitazono,
Yoshihiro Ozuno, Takuma Yoshinaga, Hiroto
Nishimata, Masahiro Yoshida,
Vascular-like microchannel network
prepared using hollow hydrogel
microfibers, 21st Symposium of Young Asian
Biochemical Engineers' Community, P31,
2015

Takayuki Takei, Hiroki Yoshitomi, Kohei
Fukumoto, Yoshihiro Ozuno, Masahiro
Yoshida, Toxic chemical crosslinker-free
chitosan cryosponge for cartilage tissue
engineering, 27th European Conference on
Biomaterials, 546, 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://ecp.cen.kagoshima-u.ac.jp/group/koubutsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 孝行 (TAKEI Takayuki)
鹿児島大学・理工学域工学系・准教授
研究者番号: 90468059

(2) 研究分担者

吉田 昌弘 (YOSHIDA Masahiro)
鹿児島大学・理工学域工学系・教授
研究者番号: 50315397