

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14240

研究課題名(和文) ダイナミック三次元培養環境制御によるiPS細胞由来のパターン化血管組織の構築

研究課題名(英文) Construction of patterned vascular tissue derived from iPS cells by dynamic three dimensional culture environment control

研究代表者

杉浦 慎治 (Sugiura, Shinji)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：10399496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クリック架橋型光開裂性架橋剤を合成し、光分解性ゲルを調製した。様々な基材と架橋剤の濃度における光分解性ゲルの調製条件について検討し、ゲルの形成特性、ゲルの分解特性、細胞接着性といった観点から評価した。血管内皮細胞が良好な接着性を有し、良好なパターン分解が可能な条件を見出した。また、光分解性ゲルをマイクロ流路内に導入し、フェムト秒レーザーを走査することで、光分解性解ハイドロゲルに対して多光子励起加工を行った。二光子励起加工形成した管腔構造に血管内皮細胞を導入することで血管様組織に構築が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We synthesized a click-crosslinkable and photocleavable crosslinker to prepare a photodegradable hydrogel. The preparation conditions of the photodegradable hydrogel with various basepolymers and the concentration of the crosslinker were investigated and evaluated from the viewpoints of hydrogel forming properties, hydrogel decomposition characteristics, and cell adhesiveness. We found conditions that vascular endothelial cells have good adhesiveness and good patterned degradation. In addition, we performed multiphoton fabrication in the photodegradable hydrogel by introducing photodegradable hydrogel into the microchannel and scanning the femtosecond laser onto the hydrogel. We considered that introduction of vascular endothelial cells into the formed luminal structure makes it possible to construct a blood vessel like tissue.

研究分野：生物化学工学

キーワード：細胞 ゲル 血管 微細構造 光分解性ゲル 光造型 多光子励起

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内の発生現象は時間的に変化する細胞周囲の三次元環境によって制御されているが、この三次元的かつ時間的に変化する環境を生体外で再構成することは難しく、生体外で幹細胞から三次元組織を誘導することが困難なことの原因の一つとなっていると考えられる。近年、生体外で三次元組織を構築する手法として光硬化性・光分解性のハイドロゲルを用いた手法が着目されている[1]。

(2) 申請者は数年前に、可逆的に分解可能なアルギン酸カルシウムゲルを用いて、三次元培養環境を時空間的に制御する「三次元ダイナミックマイクロパターン共培養法」を提案し、この手法がマウス胚性幹 (ES) 細胞の心筋細胞への効率的分化誘導に有用なことを示してきた (図1) [2]。三次元培養環境を時間的に制御する方法は、世界的にも数例しか報告例が無く[3]、ES 細胞の分化誘導への応用例は申請者らの報告が世界で初めてのものである。

(3) 上記の研究では細胞に対して不活性なアルギン酸カルシウムゲルを用いていたが、さらに近年、申請者らは、アミノ基を有する様々な高分子と反応して光分解性ゲルを形成する光開裂型架橋剤を開発し [4]、これまでに、バイオマテリアルを基材とした光分解性ゲルを用いて細胞を二次元・三次元的に操作する技術の開発を進めてきた[5]。

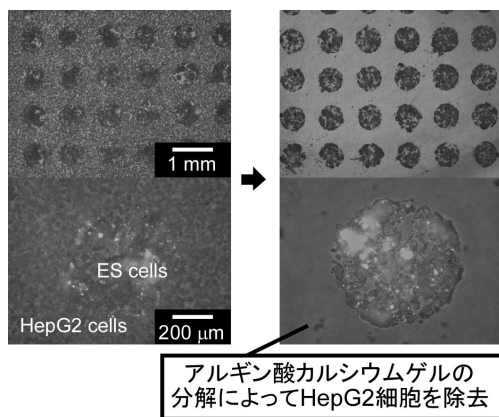


図1. 三次元ダイナミックマイクロパターン共培養法[2].

## 2. 研究の目的

(1) 本研究提案では、申請者らの開発した「バイオマテリアルを基材とした光分解性ゲル」を用いることで、三次元培養環境を精密に時空間的に制御する「ダイナミック三次元培養環境制御法」を確立することを目的として研究を進めた。具体的には、光分解性ゲルに所定のパターン光を照射したり、レーザー光を走査することで、光分解性ゲル中にパターン状のマイクロウェルや中空状の構造

の形成を試みた。

(2) 形成されたマイクロウェルや中空構造に血管内皮細胞を導入することで形成されたパターン構造を反映した血管組織を形成することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 光開裂型架橋剤の合成

活性エステル型光開裂型架橋剤 (図2) は近年我々の研究グループで独自に開発した化合物であり、アミノ基を有する種々の高分子と反応して光分解性ゲルを形成し、光照射に反応して分解する[4]。有機合成を専門とする分担研究者の高木が合成した。

一方、活性エステル型の光開裂型架橋剤を使用して細胞を光分解性ゲルに内包する際に、光開裂型架橋剤の濃度の高い条件では細胞が死滅する可能性があることが確認されている。つまり、架橋密度の高い、固くて構造的に安定な光分解性ゲルの中に細胞を包埋することが困難であることが見いだされている。そこで、クリック反応によって架橋する光開裂型架橋剤を新たに合成した。

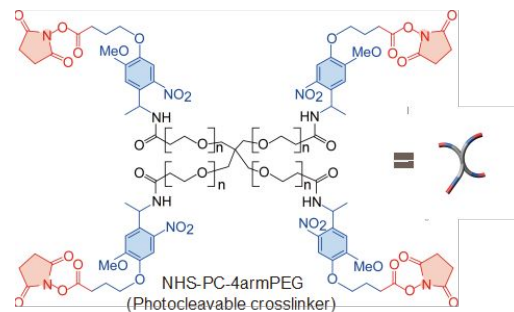


図2. 活性エステル型光開裂型架橋剤の分子構造

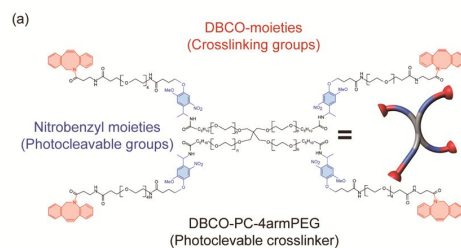


図3. クリック架橋型光開裂型架橋剤の分子構造

### (2) 細胞マイクロパターンニング

光分解性ゲルを用いて三次元培養環境をマイクロスケールで所定のタイムポイントで変化させる「ダイナミック三次元培養環境制御法」を確立を目指し、光分解性ゲルの調製条件、分解条件、細胞接着条件について検討した。

当初の計画では iPS 細胞からの血管組織を分化誘導する予定であったが、iPS 細胞由来

の血管内皮細胞が市販されるなど、研究における分化誘導自体の意義は薄まってきていた。このような状況変化を鑑み、分化誘導済みの iPS 細胞由来の血管内皮細胞や初代血管内皮細胞を用いてパターン化血管組織の構築を試みた。

### (3) 光分解性ゲルの多光子励起加工

チタンサファイアレーザー (Tsunami, SpectraPhysics 社) を顕微鏡 (IX51, オリンパス社) に導入し、制御プログラム (LabVIEW, National Instruments 社) で顕微鏡ステージを走査することで、光分解性解ハイドロゲルに対して多光子励起加工を行った。まず、X 方向の走査スピード ( $V_X$ , 1,500-12,000  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) および Y 方向の走査間隔 ( $Y$ , 1-8  $\mu\text{m}$ ) 変化させ、X-Y 平面上の  $300 \times 200 \mu\text{m}$  の領域を走査した。次に、 $V_X$  (3,000-12,000  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) および深さ方向の間隔 ( $Z$ , 12-100  $\mu\text{m}$ ) を変化させ、X-Y-Z 空間上の  $300 \times 200 \times 300 \mu\text{m}$  の領域を走査した。その後、微粒子を滴下して連続的な空間の加工の成否を確認した。

### (4) マイクロ流体デバイス内での光分解性ハイドロゲルの加工

マイクロ流体デバイスのチャンバーに光分解性ハイドロゲルを導入し、 $V_X$  を 3000  $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、 $Y$  を 3  $\mu\text{m}$ 、 $Z$  を 12  $\mu\text{m}$  に設定し、X-Y-Z 座標上の  $3000 \times 99 \times 96 \mu\text{m}$  の領域に加工を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 光開裂性架橋剤の合成と細胞マイクロパターンニング

H27 年度は当該研究に使用する活性エステル型光開裂性架橋剤を合成し、ゼラチンやポリエチレングリコールといった様々なバイオ材料を基材として光分解性ゲルを調製した。この際に、様々な基材と架橋剤の濃度における光分解性ゲルの調製条件について検討し、ゲルの形成特性、ゲルの分解特性、細胞接着性といった観点から評価した。

H28 年度はクリック架橋型光開裂性架橋剤

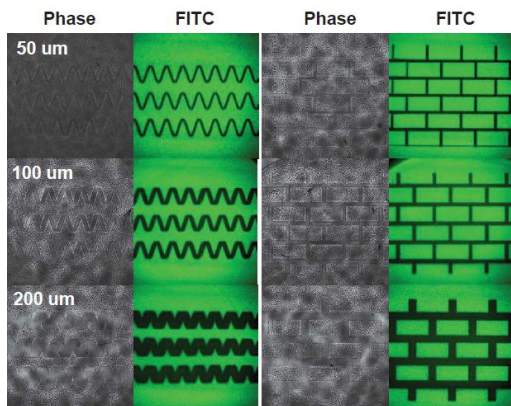


図 4. クリック架橋型光分解性ゲル上での血管内皮細胞のマイクロパターンニング

を合成し、本架橋剤を用いて光分解性ゲルを調製した。活性エステル型光開裂性架橋剤の場合と同様に、様々な基材と架橋剤の濃度における光分解性ゲルの調製条件について検討し、ゲルの形成特性、ゲルの分解特性、細胞接着性といった観点から評価した。血管内皮細胞が良好な接着性を有し、良好なパターン分解が可能な条件を見出した (図 4)。

### (2) 光分解性ゲルの多光子励起加工

X-Y 平面走査では、幅間隔  $Y$  の値が 3  $\mu\text{m}$  以下の場合に走査領域全面に加工痕跡が観察されたことから、連続的な平面が光分解性ハイドロゲル内に加工されたと考えられる (図 5 a)。X-Y-Z 空間操作では、深さ間隔  $Z$  の値が 25  $\mu\text{m}$  以下の場合に照射領域と非照射領域の微粒子の焦点位置が異なることから、連続的な空間が加工されたと考えられる (図 5 b)。

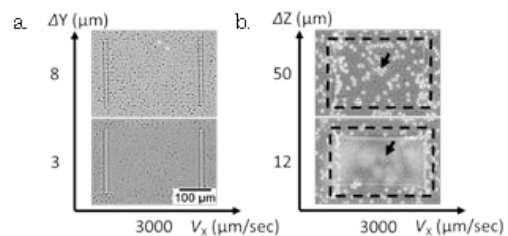


図 5. 光分解性ゲルの多光子励起加工

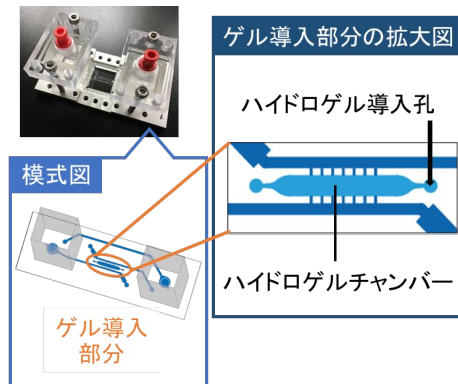


図 6. マイクロ流体デバイス内に導入した光分解性ゲルの多光子励起加工

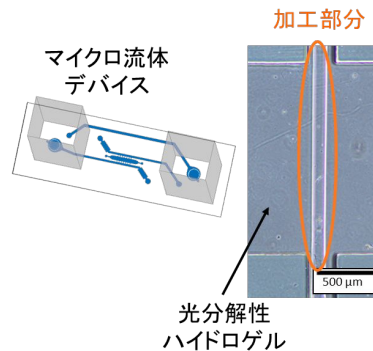


図 7. 光分解性ゲル内に形成されたマイクロ流路様構造

### (3) マイクロ流体デバイス内での光分解性 ハイドロゲルの加工

クリック架橋型光分解性ゲルを用いて作製した光分解性ゲルをマイクロ流路内に導入し、フェムト秒レーザーを走査することで、光分解性解ハイドロゲルに対して多光子励起加工を行った(図6)。また、マイクロ流体デバイスに導入した光分解性ハイドロゲルに二光子レーザー加工した際に、マイクロ流路様の構造がハイドロゲル内に加工できることが確認された(図7)。

今後、二光子励起加工形成した管腔構造に血管内皮細胞を導入することで血管様組織に構築が可能となると考えられる。

#### <引用文献>

- [1] Annabi, N. et al., *Adv. Mater.*, 26, 85 (2014).
- [2] Sugiura, S. et al., *J. Tissue Eng. Reg. Med.* 10, 690 (2016).
- [3] Kloxin, A.M. et al., *Science* 324, 59 (2009).
- [4] Yanagawa, F. et al., *Adv. Healthc. Mat.*, 4, 246 (2010).
- [5] Tamura, M. et al., *Sci. Rep.*, 4, 4793 (2014).

### 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)

Satoh T, Narazaki G, Sugita R, Kobayashi H, Sugiura S, Kanamori T, Pneumatic pressure-driven microfluidic culture system for investigation of effects of fluid shear stress on endothelial cells, MMB2016, Seoul, Korea, April 2016.

渡邊美蘭、柳川史樹、欠端雅之、佐藤琢、田村磨聖、高木俊之、細川陽一郎、鳥塚健二、杉浦慎治、金森敏幸、インビトロ血管モデル作製に向けた光分解性ハイドロゲルの多光子励起加工法の開発、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会, 東京都, 2017 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

URL:<https://staff.aist.go.jp/shinji.sugiura/index.htm>

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

杉浦 慎治 (SUGIURA, Shinji)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員  
研究者番号: 10399496

#### (2)研究分担者

高木 俊之 (TAKAGI, Toshiyuki)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員  
研究者番号: 10248065

#### (3)連携研究者

柳川 史樹 (YANAGAWA, Fumiki)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・研究員  
研究者番号: 50645877

#### (4)研究協力者

該当なし