

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700398

研究課題名(和文) 細胞シート工学による組織構築を支援するためのマイクロ流体

研究課題名(英文) Application of microfluidics for cell sheet-based tissue engineering

研究代表者

小林 純 (KOBAYASHI JUN)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20385404

研究成果の概要(和文):

マスクレス露光装置による可視光露光を利用して、毛細血管網様のハイドロゲル製マイクロ流路を作製する手法の開発を行った。カンファーキノ誘導体を用いた可視光重合により、ハイドロゲルのマイクロ構造体を作製できることが明らかとなった。本研究で開発したハイドロゲル材料およびそのハイドロゲル製マイクロ構造体を用いることにより、管腔構造を有する3次元組織を構築するためのマイクロ流路を作製する可能性が示された。

研究成果の概要(英文):

Microfluidic hydrogel channels were fabricated by visible-light induced reaction using maskless photolithography device. With maskless photolithography device, micropatterned hydrogel layers were successfully prepared. This technology is useful for generating capillary-like microfluidic channels with engineered tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

近年、フォトリソグラフィーをはじめとする微細加工技術を利用し、マイクロスケールで精密に配列された細胞からなる組織・器官の再構築が検討されている。例えば、異種細胞同士がパターン状にマイクロスケールで

近接・共培養することで、異種細胞間に働く液性因子などの影響により細胞機能が向上する(Bhatia *et al.*, *FASEB J.*, 1999)。また、10 μmの線状マイクロパターンの上で血管内皮細胞を培養すると、毛細血管様の中空構造体が出来上がる(Dike *et al.*, *In Vitro*

Cell. Dev. Biol., 1999)。培養系で再構築した組織が移植後生体内でその機能を十分に発揮するには、生体内でホストの血管系に接続されていることが必要であるので、心筋や腎臓、肝臓等の非常に多くの血流を要求する組織を再構築する際に、毛細血管網を再現するのはきわめて重要である。しかし、これらはいずれも2次元平面上にパターン配列を *in vitro* で作製する試みであり、移植に供する組織を作製するまでには至っていない。さらに、毛細血管網を模倣した生分解性材料から成るマイクロ流路を作製し、血管内皮細胞を培養する試みがなされている (Borenstein *et al.*, *Biomed. Microdev.*, 2002)。しかし、臨床応用に有効な組織・臓器再構成の実現には至っていない。

研究代表者が所属する東京女子医科大学先端生命医学研究所では、温度応答性高分子のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を表面に固定化した温度応答性培養皿を利用して、シート状の細胞を単層のまま、あるいは重層化させたりして3次元組織を構築する細胞シート工学 (cell sheet engineering) を創出し、再生治療を次々に可能にしてきた。最近では、微細加工技術を利用した新規組織再構成技術の開発にも取り組んでいる。具体的には、毛細血管網をとまなう3次元組織構築法の確立を目的とし、微細加工技術を利用したマイクロパターン化表面の調製およびマイクロパターン化細胞シートの作製に着手した。親水性高分子のポリアクリルアミド (PAAm) と温度応答性高分子の PIPAAm がストライプ状に配列した温度応答性表面を利用して、温度を 20 °C に低下するのみで細胞 - 細胞間の接着を維持したままマイクロパターン化血管内皮細胞を脱着、回収することに成功した。さらに、パターン化細胞と細胞シートを重層化し、新しい3次元組織化手法に取り組んだ。マニピュレーターを利用して、線維芽細胞シートの間血管内皮細胞のストライプ状マイクロパターンを積層化し、内皮細胞が毛細血管様にパターン化された細胞シートの作製を成功させた (図1, Tsuda *et al.*, *Biomaterials*, 2007)。今後、大きく厚い組織構築を実現する新手法としてその発展が期待できるが、どのように毛細血管網のようなマイクロスケールの管

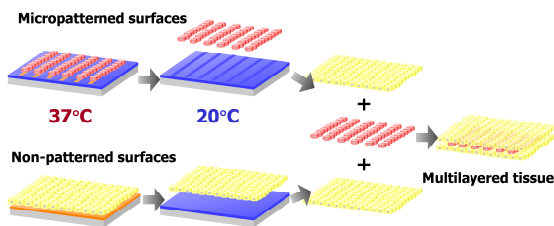


図1 マイクロパターン化血管内皮細胞を用いた細胞シート工学による3次元組織の構築 (Tsuda *et al.*, 2007)

腔状構造を *in vitro* で構築するか、どのように毛細血管網とホスト血管系を接続するかなど、依然としていくつか課題が残されている。

そこで本研究では、光造形法を利用して毛細血管網様のマイクロ流路を作製し、管腔構造を有する3次元組織を構築する手法の開発を目指した。最終的には、細胞シート積層化手法と併用することのできる、より臨床応用を可能とするためのマイクロ流体テクノロジーによる支援技術の開発を目指した。

2. 研究の目的

これまでに、細胞シートを利用したマイクロパターン化血管内皮細胞の積層化は既の実現したものの、どのように管腔状構造を構築するか、どのように毛細血管網とホスト血管系を接続するかなど、いくつかの課題が残されている。本研究では、角膜、軟骨、膀胱、食道、気管など、再生治療を次々に可能にしてきた細胞シート工学の特徴を活かしつつ、より臨床応用を可能とするための支援技術の開発を目指した。すなわち、ホスト血管系と接続できるような血管入口と出口をもつ細胞組織片を *in vitro* で構築するための研究である。また、様々な細胞シートとマイクロ流路を積層化し、構築した3次元組織を *in vitro* で容易に解析することができ、3次元組織片のモデリングに有効であると考えた。具体的には、細胞 - マイクロ流体間の栄養 / 代謝物、サイトカイン等の物質移動の解析およびその最適化が可能となると考えた。

研究代表者は、パターン状のデザインをパーソナルコンピュータ(PC)上で自在に描き、高価なフォトマスクを必要とせず光重合でデザインどおりの微細加工を作製できる、マスクレス露光装置を独自に開発した。本研究では、以下のような手法でハイドロゲル製マイクロ流路を作製するための材料設計および開発を目的とした (図2)。

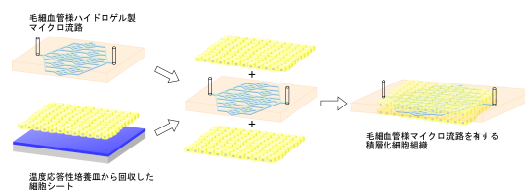


図2 細胞シート積層化技術と併用するための毛細血管様ハイドロゲル製マイクロ流路の概念図

本研究で利用するマスクレス露光装置は、一台の装置の中に光源、仮想フォトマスクとしての液晶パネル、縮小投影レンズをすべて備えており、きわめてシンプルな改造で開発された独創的な一体型微細加工装置である。毛細血管網を作製する際、マイクロ流路の長さ・幅、分岐デザインなどを試行錯誤する必要があるので、フォトマスクを利用せずに PC

画面上のデザインを直接微細加工できる本研究手法はきわめて有効である

以上、工学と医学、生物学との融合した集学的知見を元に、本研究課題を推進した。

3. 研究の方法

(1)マイクロ流路を形成するハイドロゲルの調製：マイクロ流路を形成するのに最適なハイドロゲル材料を選定した。具体的には、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミドゲルなどの親水性高分子に可視光反応性化合物を結合したもの、あるいはコラーゲン、ゼラチン、フィブリンなど、熱変化や添加物によりゲル化する天然高分子を用いた。

(2)マスクレス露光装置を利用した光造形法によるマイクロ構造体の作製：研究代表者は既にマスクレス露光装置を利用した可視光によるラジカル重合で、二次元マイクロパターン表面を作製する方法を確立している。(1)で検討したハイドロゲル材料を利用して、マスクレス露光装置を用いた可視光反応により、マイクロ構造体を作製した。

(3)マスクレス露光装置を利用した光造形法によるマイクロ流路の作製：(2)のハイドロゲル製マイクロ構造体作製方法を利用して、流路入口および出口を有したハイドロゲル製マイクロ流路を作製した。

4. 研究成果

(1)マイクロ流路を形成するハイドロゲルの調製：マイクロ流路を形成するハイドロゲル材料として、可視光反応性親水性高分子のポリジメチルアクリルアミドを合成した。具体的には、可視光励起により水素原子を引き抜き、ラジカルを発生させるカンファーキノン誘導体を利用した。まず側鎖にアミノ基を有するポリジメチルアクリルアミド共重合体を合成し、カルボキシル基を有するカンファーキノンカップリングすることにより、カンファーキノンが結合した可視光反応性親水性高分子を得た。この高分子をポリスチレン製組織培養皿表面にコーティングし、青色発光ダイオードにより培養皿全面を可視光照射したところ、親水性薄膜ハイドロゲルが形成し、表面に固定化されることを確認した。可視光照射による励起により、高分子側鎖に導入されたカンファーキノンが近傍の共重合体ないし培養皿表面から水素原子を引き抜き、発生したラジカル同士がカップリングすることにより、共重合体の架橋および培養皿表面への固定化が起こったためと考えられる。以上のことから、カンファーキノンを親水性高分子に結合することで、可視光により架橋、表面固定化できることが明らかとなった。

(2)マスクレス露光装置を利用した光造形

法によるマイクロ構造体の作製：可視光反応性を有するカンファーキノン誘導体を利用して、種々ハイドロゲルのマイクロパターンニングを行った。特に、4分岐ポリエチレングリコールの末端にカンファーキノン誘導体を共有結合的に導入した材料を中心に検討した。この溶液を基材表面にスピコートにより塗布し、さらに回転数、溶液の濃度を調節することによりゲルの厚さを制御することができた。既存のマスクレス露光装置を利用したフォトリソグラフィーにより、所望のデザイン通りのハイドロゲルマイクロパターンを作製した。X線光電子分光法(XPS)による表面マッピングにより、マイクロパターンが作製できることを確認した(図3)。

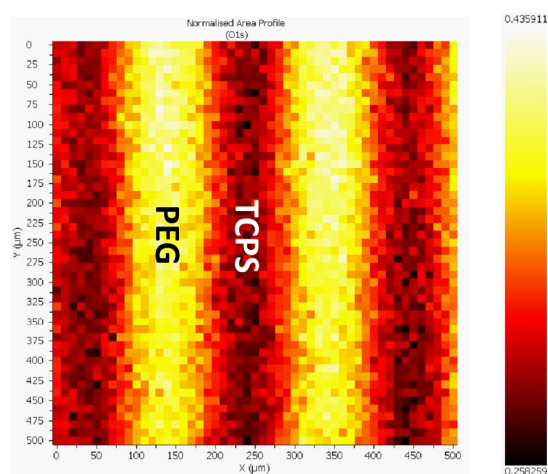


図3 XPSによるO_{1s}の表面マッピング
PEG：ポリエチレングリコール、TCPS：ポリスチレン製組織培養皿

ポリエチレングリコールから成るハイドロゲルは、タンパク質の吸着を抑制する効果があるため、基材表面上でのタンパク質および細胞マイクロパターンニングが可能であることが分かった(図4, 5)。本研究で開発したハイドロゲル材料およびそのハイドロゲル製マイクロ構造体を用いることにより、マイクロ流路を作製する可能性が示された。

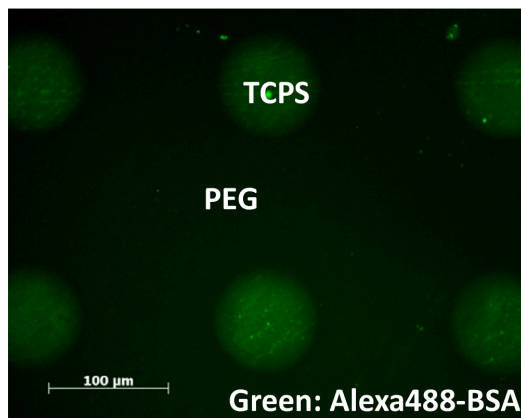


図4 マイクロパターン化ポリエチレングリコールハイドロゲル上でのアルブミン吸着

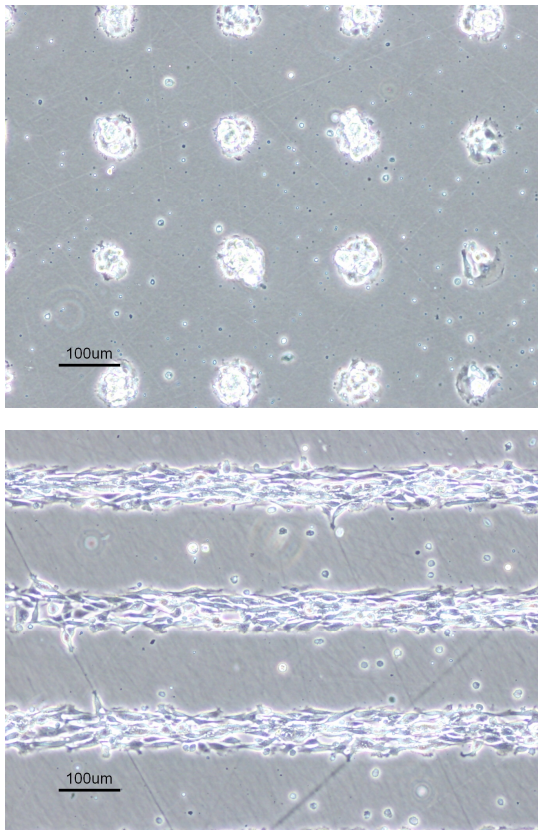


図5 マイクロパターン化ポリエチレングリコール
 ハイドロゲル上での選択的細胞接着

(3) マスクレス露光装置を利用した光造形法によるマイクロ流路の作製：生体由来材料であるフィブリンを用いたハイドロゲル製マイクロ流路を検討した。既存のマスクレス露光装置を利用したフォトリソグラフィ的手法により、ポリジメチルシロキサン製マイクロ流路の鋳型を作製し、その鋳型の中でフィブリノーゲンおよびトロンピン溶液を混合し、フィブリン製ハイドロゲルマイクロ流路を調製した。ポリジメチルアクリルアミド、ポリエチレングリコールからなるハイドロゲル材料と比較すると、フィブリン製ハイドロゲルマイクロ流路が白濁しているため、顕微鏡による流路内部の観察が困難であった。しかし、フィブリンは細胞シートとよく接着することが分かっているため、当初の目的である細胞シートを積層させる基材として有効と考えられる。

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2件)

Jun Kobayashi, Teruo Okano,
 Fabrication of a thermoresponsive cell
 culture dish: a key technology for cell

sheet tissue engineering, *Science and Technology of Advanced Materials* (in press), 査読有

Kenichi Nagase, Jun Kobayashi, Teruo Okano,
 Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering, *Journal of the Royal Society Interface*, 6, S293-S309, 2009, 査読有

〔学会発表〕(計3件)

小林 純, 糸賀和義, 大和雅之, 岡野光夫,
 改造液晶プロジェクタによる可視光投影を利用したハイドロゲル薄膜のマイクロパターンニング, 第58回高分子討論会, 2009.09.16-18, 熊本

Jun Kobayashi, Kazuyoshi Itoga, Masayuki Yamato, Teruo Okano,
 Surface micropatterning by visible light irradiation with the modified liquid crystal display projector, 第58回高分子学会年次大会, 2009.05.27-29, 神戸

Jun Kobayashi, Kazuyoshi Itoga, Masayuki Yamato, Teruo Okano,
 Surface micropatterning of hydrophilic polymers by visible light irradiation, 8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 2009.05.20-23, 三島

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 純 (KOBAYASHI JUN)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20385404