

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380097

研究課題名（和文）セルロース配向テンプレート上での三次元バイオミミックファブリケーション

研究課題名（英文）Nematic ordered cellulose templates mediating 3 dimensional order-patterned deposition accompanied with synthesis of calcium phosphates

研究代表者

近藤 哲男 (KONDO TETSUO)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30202071

研究成果の概要（和文）：

本課題では、植物細胞壁の構成成分であるセルロースを足場として用いて、その上に生物システムを模倣した「三次元のバイオミミックファブリケーション」を行おうとするものである。そのため、水に膨潤したセルロースゲルを一軸方向に延伸して得られる NOC 基板由来のアニオン性表面をもつ足場に、強制的にリン酸アニオンをホスト・イオンとして包接・固定化させ、これを足場として、骨の主成分であるリン酸カルシウムのバイオミネラル化を促すという新たなプロセスのデザインに成功した。

さらに、NOC を用いた液体培地が下から供給される表皮細胞の 3 次元培養用の基板システムがデザインされた。すなわち、NOC 培養基板を半透膜として利用した表皮細胞の三次元培養システムの提案に至った。

研究成果の概要（英文）：

This study attempts to propose a sort of biomimic mineralization using the template. It combines morphologically controlling process with synthesis of the calcium phosphate as a major component of bones. This process was successfully mediated by the modified NOC template having a pair of roles of the ion supply sources and scaffolds for 3D-ordering architecture of the calcium phosphate as a biomineral in the key functions for biomineralization.

Secondly, the ordered cellulose film scaffold, NOC, also induced establishment of a three-dimensional, hierarchical structure of epidermal cells by cell attachment and subsequent culture. Furthermore, the NOC film, as a semipermeable template, was also employed to allow three-dimensional proliferation of epidermal cell layers in the perpendicular direction. The template proved to be a suitable as a three-dimensional cell culture device, resulting in the proposal that the construction processes of these three-dimensional cell layers followed the basic concept of skin formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：セルロース、テンプレート、バイオファブリケーション、ホスト-ゲスト バイオミネラリゼーション

## 1. 研究開始当初の背景

酢酸菌は、糖を炭素源にして菌体外にセルロースナノファイバーを生産する。これは、マイクロバialセルロース (=バクテリアセルロース) と呼ばれ、平均で幅約 50nm、厚み約 10nm の高結晶性のリボン状ナノファイバーである。分泌後すぐに、ナノサイズでランダムネットワークを形成して、ペリクルと呼ばれるゲル状膜を形成する。これがナタデココとして食用されている。

酢酸菌の特徴の一つは、セルロース繊維を菌体外に分泌する際に、その噴出エネルギーを駆動力として菌体自体が噴出方向とは反対方向に走行することである。代表者らは、この点に着目し、この走行をセルロースからなるルールで特定の方向への運動に制御しようと試みた。まず、高分子ルールとして、水膨潤セルロースゲルから開発した、分子鎖がほぼ等間隔 (0.66nm) で一方向に配列したネマチックオーダーセルロース (NOC) テンプレートをを用いた。その表面で菌を培養することにより菌体の走行とナノ繊維の分泌方向制御が可能 (配向誘発) になることを見出した。同時に堆積した分泌セルロース繊維による三次元集合構造もルールに沿って制御されていた。即ち、培養の足場となる適切な構造を与えれば、酢酸菌はそれに沿って走行し、自動的に一方向への繊維の配向堆積による縞状三次元構造構築が可能となる。これは、NOC テンプレートが配向した両親媒性表面であり、繊維との界面で強い相互作用を形成するためであることも明らかにした。

そこで本研究は、上記の NOC テンプレート上での配向自己組織化原理をさらに発展させ、ナノ/マイクロスケールで三次元構造制御した広範囲な新規機能材料創製への展開を提案するものである。本申請において、独自のセルロース由来のテンプレートを用いて、セルロース/ヒドロキシアパタイト(HAp)の有機/無機サンドイッチ型ハイブリッド構造を有する複合材料ならびに三次元培養による人工皮膚類似膜の創製をめざす。すなわち、上記の分子ルールの原理や調製手法を応用し、新規テンプレートを創製して、その上で i) HAp の結晶化、さらにその上への酢酸菌の培養の繰り返し、および ii) 表皮角化細胞の生体内に近い状態での三次元培養を行う。このことが可能となると、テンプレートの表面パターンに沿って、結晶成長や細胞分

泌の方向が制御されるため、自動的に新規自己集合構造体が構築されることになる。これが、「三次元バイオミミックファブリケーション」への展開となる。

## 2. 研究の目的

自然界では、形、色彩、動きなどのパターンと、機能とが密接に関連している。その典型的な例である細胞壁形成プロセスを模範として、研究代表者は、セルロース三次元構造体のボトムアップ型構造構築法を提案してきた。その手法では、セルロース由来の種々のパターンを有するテンプレート上で、セルロースナノファイバーを生産する酢酸菌の分泌方向が制御されるとともに、堆積パターンも制御される。

そこで本研究では、このテンプレート上での構造形成をさらに発展させて、パターンを有する三次元無機/有機複合体 (ヒドロキシアパタイト/ナノセルロース) の創製および表皮角化細胞の三次元培養によるバイオミミック人工皮膚再生を行い、ナノ/マイクロの両方のサイズで同時制御可能な天然機能材料創製の構築プロセスを提案する。

## 3. 研究の方法

三次元バイオミミックファブリケーションのための種々のパターンを有する新たなセルロースのテンプレートを創製する。その上で、HAp の結晶化と表皮角化細胞の二次元、三次元培養挙動をモニターした。

1) リン酸イオン含有 NOC テンプレート上でのバイオミネラリゼーション (雑誌発表論文 1)

HAp の結晶化は、 $\text{HPO}_4^{2-}$  と  $\text{Ca}^{2+}$  が反応して形成される。通常は  $\text{HPO}_4^{2-}$  をゼラチンゲル内に固定して、 $\text{Ca}^{2+}$  含有水溶液と接触させ、自発的結晶化を生じさせる。本研究においては、HAp の結晶化における成長方向を制御することが主眼である。そのために、NOC テンプレートの表面がカチオン性であると考えられることから、HAp の前駆体として  $\text{HPO}_4^{2-}$  を NOC の配向方向に沿って配列させたテンプレートを作製した。次に、そこを核にして結晶化を誘発させることにより、結晶成長方向が制御され、縞状に結晶を堆積させることが可能と考えられる。

2) NOC テンプレートを基板とした表皮角化細胞用三次元培養 (雑誌発表論文4)  
-システムの構築と培養条件の検討から二次元、三次元ファブリケーション-

我々の皮膚は、細胞が階層状に積み上げられた三次元構造体であり、皮膚層下部から新しい細胞が分裂することによって古い細胞が上へと移動することで形成される。そこでまず、NOC テンプレートを用いたヒト表皮角化細胞の三次元培養器を考案した。NOC 上に筒を置き、それを液体培地中につるすことで、毛細管現象を利用して細胞に与える培地供給方向を制御する。底部の NOC 基板側のみから培地が供給されるようにすることで、播種した細胞が下から上に向かって分裂、増殖するようになることを考え、細胞の高さ方向への増殖を本培養器で誘導する。

#### 4. 研究成果

自然界において生物は、有機物から成る「足場」上に有機物や無機物を堆積させることにより、有機/有機や有機/無機複合体を低エネルギー消費で構築する。とくに有機/無機の機構はバイオミネラリゼーションと呼ばれ、貝殻や骨の形成が典型的な例であるが、いずれも低エネルギー型の方法形成プロセスである。このプロセスでは、パターンを有する足場やイオン供給源として働く有機物の機能により、堆積する物質の形態が制御される。

本課題では、植物細胞壁の構成成分で、OH 基由来の親水部と CH 基由来の疎水部とを有する両親媒性の天然高分子であるセルロースを用いて足場テンプレートとして用いて、その上に上記の生物システムを模倣した「三次元のバイオミミックファブリケーション」を行おうとするものである。

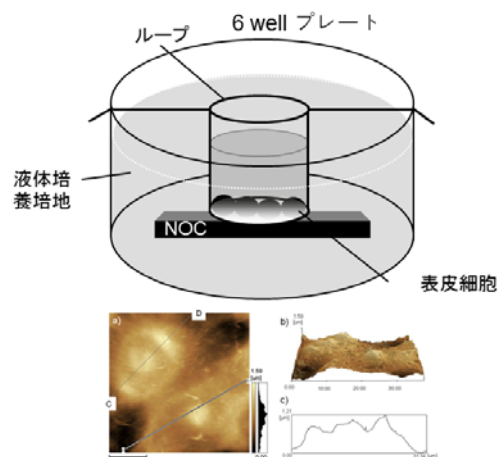
1) リン酸イオン含有 NOC テンプレート上でのバイオミネラリゼーション(雑誌発表論文1)

これまでに開発した、水に膨潤したセルロースゲルを一軸方向に延伸して得られるネマチックオーダーセルロース (NOC, nematic ordered cellulose) 基板由来のアニオン性表面をもつ足場に、強制的にリン酸アニオンをホスト-イオンとして包接・固定させた。次にこれを足場として、カルシウムイオンとのホスト-ゲスト反応により、骨の主成分であるリン酸カルシウムのバイオミネラリゼーションを促すという新たなプロセスのデザインに成功した。同時に、そのアニオン性極表面に正のカルシウムカチオンを固定させ、ゲスト-リン酸アニオンと反応させるといった対照的なプロセスを検討し、その比較から本ユニークなバイオミネラリゼーション機構 (ホスト-ゲスト バイオミネラリゼー

ションと名付けた) に提案に至った。

2) NOC テンプレートを基板とした表皮角化細胞用三次元培養 (雑誌発表論文4)

NOC の特殊な両親媒性レーン構造は、表面の接触角の測定において、通常親水性の再生セルロース膜に比べ疎水性を示した。水滴に対する接触角は、 $70^\circ$  程度で、ちょうど細胞の接着に対して最適な角度 ( $60-80^\circ$ ) であり、まず、表皮細胞の培養基板に適することが示された。しかも NOC が分子配向するが非結晶性であることから、半透膜性を示した。この特性より、下図に示すような液体培地が下から供給される表皮細胞の三次元培養用の基板システムがデザインされ、実際にその上で分裂した新しい細胞が一番下の基板上に生じるといった現象が見出された。すなわち、NOC 培養基板を半透膜としても利用した三次元培養システムが構築された。



3次元培養用 NOC 基板システム (上図) で培養された表皮細胞 (2層) の AFM 像 (下図)

我々の皮膚は、細胞が階層状に積み上げられた三次元構造体であり、皮膚層下部から新しい細胞が分裂することによって古い細胞が上へと移動することで形成される。実際の皮膚に類似した構造を作り上げるためには、細胞の三次元培養が必要であり、in vitro で三次元構築された組織は医療品や医療材料、化粧品など、最終的に人体に用いられる物質の安全性・有効性のために幅広く使用される可能性がある。また、Quality of Life (QOL) の向上を目指した再生医療においても、損傷組織の細胞を再生させるための細胞シートとしての利用も期待される。

#### 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4件)

1. Seyama, T., Eun Young Suh and Kondo, T., Three-dimensional culture of epidermal cells on ordered cellulose scaffolds, *Biofabrication* **5** (2013). DOI:10.1088/1758-5082/5/2/025010
2. Higashi, K. and Kondo, T., Nematic ordered cellulose templates mediating order-patterned deposition accompanied with synthesis of calcium phosphates, *Cellulose*, **19**, 81–90(2012). DOI 10.1007/s10570-011-9627-7
3. Roubroeks, J. P. and Kondo, T., Nano- and microstructures in stretched and non-stretched blend gels of cellulose and hemicelluloses, *Holzforshung*, 66,993-1000(2012).DOI:10.1515/hf-2011-0136
4. Kondo, T., Kasai, W., Nojiri, M., Hishikawa, Y., Togawa, E., Romanovicz, D. and R. Malcolm Brown, Jr., Regulated patterns of bacterial movements based on their secreted cellulose nanofibers interacting interfacially with ordered chitin templates, *J. Biosci. Bioeng.* 114(1),113-120(2012).DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.02.0202

[学会発表] (計 18 件)

1. Yokota, S., Sakoda, S., and Kondo, T., Cellulose-based nanomaterials functionalized by surface chemical modification, 4th International Conference on Pulping, Papermaking and Biotechnology (ICPPB 2012), November 9th, 2012.
2. Kondo, T., Nagashima, A., Tsuji, T., and Yokota, S. Fabrication of oriented nano-fibrous films from a novel type of microbial cellulose pellicle secreted by *Gluconacetobacter xylinus* under an oxygen-lacking environment, 4th International Conference on Pulping, Papermaking and Biotechnology (ICPPB 2012), November 8th, 2012.
3. Kondo, T. and Higashi, K., Ordered biomineralization mediated by host-guest reactions depending on differently immobilized host ions on nematic ordered cellulose templates, 3rd International Cellulose Conference, October 11th, 2012.
4. Sakoda, S., Yokota, S. and Kondo, T., Preparation of a novel scaffold from the nematic ordered cellulose surface by living radical polymerization, 3rd International Cellulose Conference, October 11th, 2012.
5. 宇都宮ひかり、佐小田史朗、横田慎吾、近藤哲男、配向性セルロース基板の表面化学改質、第19回日本木材学会九州支部大会、2012年8月。
6. 横田慎吾、佐小田史朗、近藤哲男、化学修飾によるセルロースナノ材料の界面設計、セルロース学会第19回年次大会 2012年7月。
7. 小島貴弘、東宏樹、横田慎吾、近藤哲男、ホスト-ゲスト型バイオミネラリゼーションを誘発する新規セルロース配向基板、セルロース学会第19回年次大会 2012年7月。
8. 佐小田史朗、横田慎吾、近藤哲男、ネマチックオーダーセルロース基板より開始されるリビングラジカル重合による三次元構造体の創製、セルロース学会第19回年次大会 2012年7月。
9. 小島貴弘、東宏樹、横田慎吾、近藤哲男、イオンを包摂したキチン配向基板の調製、第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月。
10. 東宏樹、近藤哲男、二重機能性セルロー

ス基板を用いたリン酸カルシウムのバイオミミックミネラル化、第48回化学関連支部合同九州会大会、2011年7月。

11. 近藤哲男、機能化ネマティックオーダーセルロースを足場とするバイオミミックファブリケーション、セルロース学会第18回年次大会、2011年7月。
12. 東宏樹、横田慎吾、近藤哲男、様々なセルロース系配向基板により誘発されるバイオミミックミネラル化、セルロース学会第18回年次大会、2011年7月。
13. 近藤哲男、セルロース分子配向レール上に誘発されるバイオミミックファブリケーション、平成23年度繊維学会年次大会、2011年6月、招待講演。
14. 近藤哲男、両親媒性セルロース分子レールを用いるボトムアップ型バイオミミックファブリケーション、接着界面科学研究会、2011年3月、招待講演。
15. 東宏樹、近藤哲男、新規セルローステンプレートを用いた有機無機複合材料のバイオミミック形成プロセス、第47回化学関連支部合同九州大会、2010年7月。
16. 宮本昂一郎、近藤哲男、配向性セルローステンプレートを用いた酸化チタンのナノパターンニング、第47回化学関連支部合同九州大会、2010年7月。
17. 宮本昂一郎、近藤哲男、ネマティックオーダーセルロースをテンプレートとした酸化チタンのナノパターンニング、セルロース学会第17回年次大会 2010年7月。
18. 東宏樹、近藤哲男、新規セルローステンプレートにより誘発されるバイオミミックミネラル化、セルロース学会第17回年次大会 2010年7月。

〔図書〕(計 1 件)

1. Kondo, T., Bacterial NanoCellulose: A

Sophisticated Multifunctional Material, CRC Press, chapter6, pp113-142, 272 ページ (2012).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 哲男 (KONDO TETSUO )  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：30202071

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

巽 大輔 (TATSUMI DAISUKE )  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：60293908