

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650285

研究課題名(和文)高機能性スーパーファイン紙のようなバイオペーパー用ゲルの開発と再生医療への応用

研究課題名(英文)Development of high functional hydrogel as biopaper for 3D bioprinter and application for tissue engineering

研究代表者

岩永 進太郎 (Iwanaga, Shintaroh)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：70587972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では3Dバイオペリンターに適したバイオインク及びバイオペーパー用ゲルの開発を行った。3Dバイオペリンターは細胞を含むゲル溶液を吐出し、細胞の配置と共に立体組織の形成を行うことが可能である。これまでに造形能に優れたアルギン酸を用いていたが、細胞増殖には適していないことが知られている。そこで、アルギン酸をコレステロールで疎水化し、ゼラチンや増殖因子であるFGF、VEGFにシクロデキストリンを修飾することで、アルギン酸ゲルに物理的に強固に吸着させることに成功した。また、ゼラチンをスポット状に吸着させたゲル上で細胞を培養したところ、スポット状に接着していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed high functional hydrogel materials as bioink and biopaper for 3D bioprinter. It is possible to fabricate 3D tissue-like structures by ejecting pre-gel solution with cells. We used alginate solution as gelling materials, however it is well-known that alginate is not suitable for using as a cell-adhesive scaffold. Therefore, we modified alginate with cholesterol for adding hydrophobicity, and gelatin or other growth factors with cyclodextrin which can subsume cholesterol, respectively. And thus, we succeeded to fabricate alginate gel where cyclodextrin-modified materials can adsorb onto the surface. Moreover, it was observed that cell-patterning surface could be prepared onto the alginate gel with gelatin spotted areas.

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：組織工学 バイオマテリアル インクジェットプリンタ バイオインク バイオペーパー

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では3Dプリンターを利用したバイオプリンティング技術の開発に世界的に先駆けて成功した。ゲル造形能に優れたアルギン酸を用いることで、細胞を封入したゲルビーズやゲルファイバー、ゲルシート、ゲルチューブといった様々な組織様構造の作製を容易に行うことが可能であった。しかしながら、アルギン酸内に包埋した細胞はそのままでは接着・増殖ができずいずれ死滅してしまうことが問題として挙げられていた。そんな中、フィブリノーゼンを用いて同様にゲル構造物を作製したところ、ゲルファイバー、ゲルシートの作製が可能であり、細胞もゲル内で接着・増殖することが確認された。しかしながら、チューブのような3次元構造が作製できず、また、粘着性が非常に高いため、ファイバーやシートが作製した後、培養容器にくっついてしまいうまく培養できないなどの問題点があった。そこで、ゲル造形能に優れ、細胞接着性を有する材料の開発が急務であると感じ、3Dバイオプリンターに適した「バイオインク」の開発と共に、立体構築に必要な「バイオペーパー」の開発に着手した。このようなバイオインク・バイオペーパーの実用化は、組織工学の更なる発展に大きく寄与することが期待できる。

2. 研究の目的

iPS細胞の発見により、再生医療・組織工学における臓器や組織作製のための細胞ソースの問題に大きな光明を得た。しかしながら、依然としてセンチメートルはおろか、ミリメートルサイズの組織でさえも細胞から再構築することが困難である。そこで、本研究では、3Dデータをもとに様々な任意形状を立体的に「印刷」可能な3Dバイオプリンターを用いて、組織や臓器の作製を目標に研究に取り組んだ。3Dプリンターでは細胞を同時に用いるため、立体構造を作製する材料として生体親和性の高い材料が必要になる。また、細胞の乾燥を防ぐために水中での立体組織作製が必要になってくる。そこで、カルシウム存在下で瞬時にハイドロゲルを形成可能なアルギン酸ゲルを用いた3次元組織構築に着目した。アルギン酸は、細胞親和性が高いため、有用なバイオインクとなりうる。さらに、瞬時にゲル造形を行うことが可能であることから、バイオインクであると同時に、優秀なバイオペーパーでもある。しかしながら、これまでの研究成果から、アルギン酸は細胞接着性に乏しいことが判明している。そこで、本研究では、インクジェット印刷で高精細印刷に用いられるスーパーファイン紙と同じような、バイオインクを高精細に吸着できるバイオペーパーの開発を行うことで、細胞接着性の問題をクリアし、3Dプリンターをより組織工学に応用しやすいものするために、バイオインク・バイオペーパー用材料(スーパーファインゲル)の開発を試みた。

3. 研究の方法

これまで当研究室で用いられてきたアルギン酸をベースに、シクロデキストリンと疎水性物質の物理的包摂現象を利用し、スーパーファインゲルの開発を行った。

(1) 疎水化アルギン酸の開発

コレステロールをDMSOに溶解し、カルボニルジイミダゾールを加え、コレステロールの尿酸基を活性化した後、エチレンジアミン(EDA)をコレステロールに対し10~20モル倍量添加した。室温で4時間反応させたのち、大容量の熱メタノール/水混合溶媒中に反応溶液を滴下し、反応物を沈殿させ、回収した(Ch-NH₂)。

次いで、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)バッファーをpH6.8に調整し、アルギン酸ナトリウムを1%になるように溶解させた。そこに、水可溶化カルボジイミド(WSC)およびN-ヒドロキシコハク酸(NHS)を加え、アルギン酸のカルボキシル基を活性化した。活性化アルギン酸溶液にそれぞれ、アダマンタンアミン塩酸塩(Ad-NH₂)、t-ブチルアミン(tBu-NH₂)、n-ブチルアミン(nBu-NH₂)、およびCh-NH₂を加え、室温で12時間反応させた。反応後、それぞれの溶液を透析膜(MWCO:12000-14000)に入れ、純水に対して8時間ごとに水替えをし、3日間透析を行った。透析終了後、それぞれを凍結乾燥し、各種疎水化アルギン酸(XX-Alg, XX: Ad, n-Bu, t-Bu, Ch)を得た。

(2) シクロデキストリン修飾ゼラチン・増殖因子の作製

適量のα-シクロデキストリンを40%水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、モノクロロ酢酸をシクロデキストリンの2モル倍量加え、室温で3時間反応させた。反応終了後、大容量の冷メタノールに反応溶液を投下し、反応物を沈殿、回収した(カルボキシメチルCD)。

作製したカルボキシメチルCDをMESバッファー(pH6.8)に溶解し、WSCおよびNHSにてカルボキシル基を活性化させた。そこにあらかじめ40の純水中に溶解させておいたゼラチン溶液を投入し、40で12時間反応させた。反応終了後、透析膜(MWCO:12000-14000)に入れて、40の純水に対して8時間ごとに水替えをし、3日間透析を行った。透析終了後、凍結乾燥をしてシクロデキストリン修飾ゼラチン(CD-Gel)を得た。また、線維芽細胞増殖因子(FGF)および血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は生理食塩水に溶解させ、活性化したカルボキシメチルCD溶液中にそれぞれ投入し、室温で12時間反応させた。その後、それぞれの溶液をスピナラムに入れ、遠心機で延伸することにより、脱塩・タンパクの回収を行った(CD-FGF, CD-VEGF)。

(3) 疎水性包摂現象を利用した物理ゲルの作製

生理食塩水に各疎水化アルギン酸を溶解させ、2%溶液を作製した。それとは別に40

の生理食塩水に CD-ゼラチンを溶解させ、10% 溶液を調整した。これらの溶液を等容量混合させることで、ゲルの調整を行った。

(4) 疎水性アルギン酸の細胞親和性の観察

生理食塩水を用いて 1% 疎水化アルギン酸溶液を作製した。調整した溶液を 0.22 μ m のシリンジフィルターに通すことで、滅菌を行った。マウス線維芽細胞(NIH3T3)細胞を 1×10^6 cells/mL になるように、各疎水化アルギン酸溶液にて分散させ、100mM の CaCl₂ 溶液中に滴下し、細胞内包ゲルを形成した。得られたゲルを培養液中で培養し、培養 0、12、24、48 時間後に Live/Dead 染色を行って、細胞の生死判定を行った。

(5) 疎水アルギン酸ゲルシート状への CD-Gel のパターン化、およびゲル上での細胞のパターン化培養

1% の Ch-Alg(生理食塩水)を調整し、カスタムメイド 3D バイオプリンターを用いてゲルシートの作製を行った。作製したゲルシートに 3D プリンターで CD-Gel を印刷した。CD-Gel を印刷した後、培養液でゲルを洗浄し、NIH3T3 を播種して培養を行った。

4. 研究成果

(1) 疎水化アルギン酸および CD 修飾素材はそれぞれ FT-IR、LC-MASS および動的散乱による分子量測定によって検討した。FT-IR の結果より、疎水化アルギン酸はいずれも 1600-1650cm⁻¹ にアミンに由来すると思われるピークの出現が認められた。また、LC-MASS および分子量測定の結果からも、未修飾アルギン酸と比較して分子量の増大を認めたことから、目的の疎水性物質の修飾が行えたことと判断した。また、CD 修飾ゼラチンに関しても、分子量の増大を確認した。

(2) 作製した疎水化アルギン酸と CD-Gel を用いて CD の疎水性物質包摂能を利用した物理ゲルの作製を検討した。その結果、Ad-Alg および Ch-Alg は非常に緩いゲルではあったが、CD-Gel 溶液と混合してしばらくのちにゲルの形成を確認できた。一方、nBu-Alg および tBu-Alg は溶液の濃度を振ってもゲルの形成には至らなかった。これは α -CD のサイズに対して nBu および tBu いずれも十分な大きさではなかったためにしっかりと包摂されていなかったのが原因であると考えられる。コレステロールおよびアダマンタンアミンは α -CD にて包摂されることが既往の研究ですでに分かっており、これらを修飾したアルギン酸ではしっかりと CD による包摂が起こり、そこを物理架橋点としたゲルの形成が可能であったと考えられる。

(3) 各疎水性アルギン酸ゲル内に NIH3T3 を包摂したゲルを作製したところ、いずれの疎水化アルギン酸においても、瞬時に細胞内包アルギン酸ゲルを作製することが可能であった。ゲル作製後すぐの Live/Dead 染色においては、いずれもほとんどの細胞が生存していることが示された。その後、経時的に生死判

定を行ったところ、Ch-Alg に内包した細胞は 48 時間後も 90% 以上が生存している状態であったのに対し、nBu-Alg および tBu-Alg では 24 時間後に 30% 程度の細胞死が確認され、48 時間後には 50% 以上が死滅していることがあきらかになった。さらに、Ad-Alg では 12 時間後にすでに 30% 程度の細胞が死滅しており、24 時間で 70% 以上の細胞が死滅している状態であった。詳しいメカニズムは明らかにしてはいないが、疎水物質による細胞膜への影響の大きさが、これらの細胞の生存に寄与しているのではないかと考えられる。(4) これまでの結果より、作製した疎水化アルギン酸のうち、細胞親和性及び CD との包摂能を利用できるものは Ch-Alg であると判明した。そこで、Ch-Alg ゲルシートを用いて CD-Gel、CD-FGF および CD-VEGF のパターン化を行った。Ch-Alg は未修飾のアルギン酸と比較して同濃度で粘度が低下したため、3D プリンターでの吐出が比較的容易であった。また、未修飾のアルギン酸と同様、ゲルシートの作製も問題なく可能であった。さらに、FITC でラベル化した CD-Gel、CD-FGF、CD-VEGF を吐出してパターン化印刷したところ、Ch-Alg ゲルシート上にしっかりとパターン化されていることが分かった。さらに、培養液で洗浄後もパターンが維持されていることから、Ch と CD の物理包摂によって、ゲル上にこれらの物質が強固に吸着していることが示された。そこで、NIH3T3 を CD-Gel をパターン化したゲルシートと共に培養したところ、パターン状に細胞が接着・伸展していることが観察された。これにより、作製した Ch-Alg と CD 修飾材料は、3D バイオプリンターに適したバイオインク・バイオペーパーであると考えられる。これらの材料を用いることで、3次元組織の作製をより発展させることが期待できると考える。

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 1 件)

- (1) Shintaroh Iwanaga*, Noriaki Saito, Hidetoshi Sanae and Makoto Nakamura*, “Facile fabrication of uniform size-controlled microparticles and potentiality for tandem drug delivery system of micro/nanoparticles”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 301-306 (2013) (*: Corresponding author) (査読有り)

[学会発表](計 1 件)

- (1) 岩永進太郎、齋藤典彰、早苗秀敏、中村真人：インクジェットプリンターを用いた均一径微粒子の作製と二重 DDS への応用に向けた基礎検討，化学工学会 第 78 年会，2013.3.17-19，大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩永 進太郎 (SHINTAROH IWANAGA)
東京大学生産技術研究所・特任研究員
研究者番号：70587972