

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760752

研究課題名（和文） 生体と類似の毛細血管網および再生医療用重厚三次元臓器創製技術の開発

研究課題名（英文） Development of capillary-like network for creating three-dimensional tissues

研究代表者

武井 孝行 (TAKEI TAKAYUKI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：90468059

研究成果の概要（和文）：ポリメタクリル酸メチル（PMMA）からなる直径10 μ m程度のファイバーを調製した。そのファイバーの束をアガロースゲル内に包埋し、ファイバーのみを特異的に溶解することで、ゲル内に毛細血管網様流路ネットワークを作製した。続いて、多孔質化したそのゲルに肝癌細胞を播種後、その多孔質体をアガロースゲルで密閉した。多孔質体の流路内部に培地を流通させながら培養することで、培地を流通させなかった条件よりも、より多くの生細胞を多孔質体内部に保持できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Poly(methyl methacrylate) (PMMA) microfibers of approximately 10 μ m in diameter were prepared using wet spinning technique. The microfibers were embedded in agarose gel and dissolved specifically, resulting in formation of capillary-like network in the gel. The gel was freeze-dried and hepatoblastoma was seeded into the sponge-like gel. Then, the sponge was coated with agarose gel. Culture medium was perfused into the capillary-like network in the sponge. Albumin productivity of the sponge with perfusion of medium was higher than that without medium perfusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科/細目：プロセス工学/生物機能・バイオプロセス

キーワード：毛細血管、生体組織工学、ヒドロゲル、ファイバー

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

①微細ファイバーの作製

ジクロロメタンに濃度が45%(w/v)となるようにPMMAを溶解した。続いて、注射針(内径：270 μ m)をとおして、その溶液をエタノール中に押し出した(0.13 μ L/s、図1(a))。溶媒置換により析出したPMMAのファイバーをローラーで連続的に巻き取った。

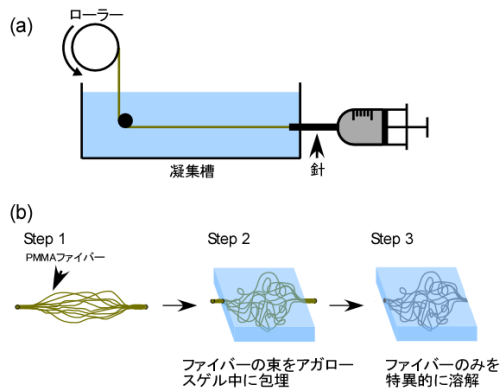


図 1. (a)ファイバー作製法および(b)アガロースゲル内での流路の作製手順.

②毛細血管網様流路ネットワークの作製

ローラーに巻き取った PMMA ファイバーを 15cm の長さ に切った。そのファイバーの束を 2%(w/v) アガロース水溶液に浸した後、その水溶液をゲル化させた。続いて、アガロースゲル中の水をエタノールに置換した後、PMMA ファイバーを除去するために、そのゲルをジクロロメタンに 72 時間浸した (図 1(b))。その後、ゲル中のジクロロメタンをエタノール、水に順次置換した。

③毛細血管網様流路ネットワークを利用した細胞培養

内部に毛細血管網様流路ネットワークを有するアガロースゲルを -80°C で 24 時間凍結後、真空下で乾燥することでゲルをスポンジ状にした。続いて、そのスポンジに肝癌細胞 (Hep G2) を播種した後、そのスポンジ全体 (流路の入口と出口以外) をアガロースゲルで密封した。続いて、流路内部に培養培地を流通させ、培養 4 日後に培地中に含まれるヒトアルブミンの濃度を ELISA 法により定量した。

(2) 細胞接着タンパク質を含有するゲルの調製

①ゲル化時間の制御

シュガービートペクチン (SBP) とゼラチンをカルシウムおよびマグネシウム不含リン酸緩衝生理食塩水 (CMF-PBS) に溶解した。続いてその溶液と西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) 水溶液および過酸化水素水を体積比 8:1:1 で混合し、ゲル化するまでに必要な時間を試験管倒立法により評価した。なお、HRP と過酸化水素の最終濃度は 1 unit/ml および 1 mM に固定した。

②力学的強度

上記と同様の手順で直径 1.2 cm の円筒容

器内で SBP/ゼラチンゲルを調製した。そのゲルの強度を卓上強度試験機にて測定した。

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

①微細ファイバーの作製

ファイバーの巻き取り速度を 2.3 cm/s から 31.0 cm/s まで変化させた時のファイバー直径を調査した (図 2)。巻き取り速度が 2.3 cm/s の時、ファイバーの直径は $56 \pm 2 \mu\text{m}$ であったが、巻き取り速度が大きくなるにつれてファイバーの直径は小さくなり、31.0 cm/s の時、ファイバー径は毛細血管とほぼ等しい $14 \pm 4 \mu\text{m}$ であった (図 3)。

②毛細血管網様流路ネットワークの作製

作製したファイバーの束をアガロースゲル内に封入し、ファイバーのみを特異的に溶解した。シリンジポンプを用いて墨汁をゲル内流路に流し込んだ。墨汁が流路内部を流れていく様子を撮影した写真を図 4 に示す。このようにファイバーが存在していた部位が流路となり、そこに墨汁が流れていることを確認できた。また、その流路の直径を測定したところ、ファイバーの径とほぼ等しく $15 \pm 5 \mu\text{m}$ であり、毛細血管と同等のサイズの流路を作製できた。

③毛細血管網様流路ネットワークを利用し

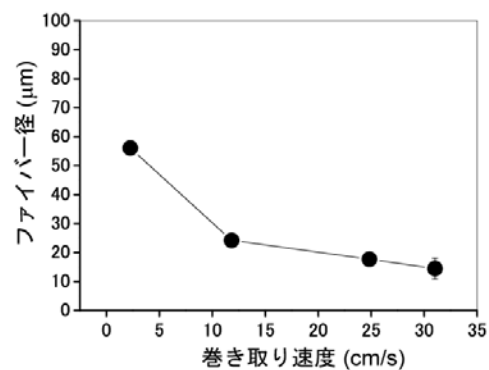


図 2. ファイバーの巻き取り速度とファイバー径との関係.

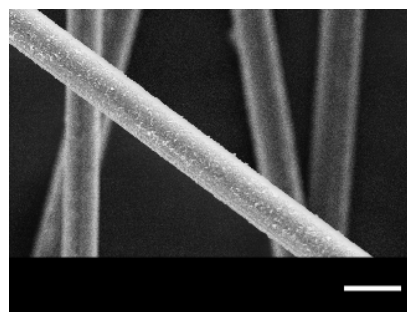


図 3. 作製したファイバー.

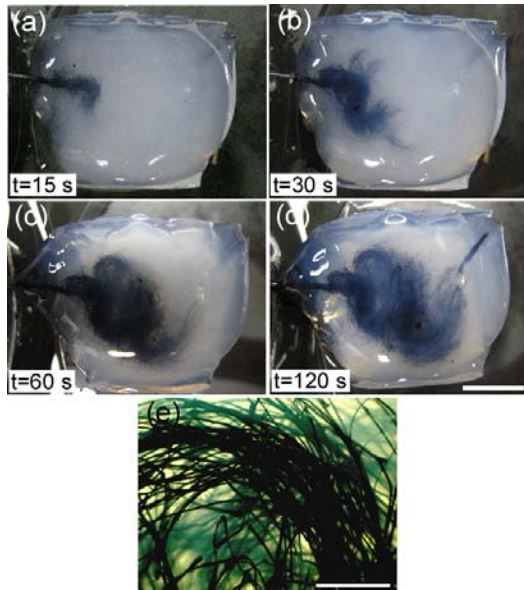


図 4. (a)-(d) 墨汁がアガロースゲル内の流路を流れていく様子、(e) 流路の拡大図。(a)-(d) のスケールバーは 1 cm、(e) のスケールバーは 500 μm を示す。

た細胞培養

上記のようにして作製した流路の近傍に臓器細胞を配置できるように、ゲルを凍結・乾燥することにより多孔質化した。続いて、そのスポンジに Hep G2 細胞を播種した後、そのスポンジ全体（流路の入口と出口以外）をアガロースゲルで密封した。続いて、流路内部に培養培地を流通させながら 4 日間培養した。コントロールとして培地を流通させずに静置培養したものを用いた。その結果、培地を流通させた条件は、静置培養に比べて培地中のアルブミン濃度が約 4 倍高かった（図 5）。これは、培地を流通させた条件の方が、スポンジ内部の細胞に十分な酸素と栄養素を供給でき、これにより細胞の増殖が促進されたためであると考えられる。

(2) 細胞接着タンパク質を含有するゲルの調製

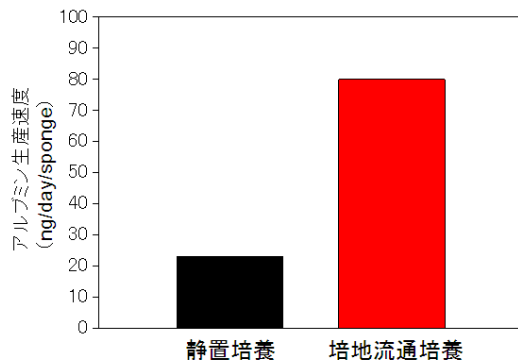


図 5. 静置培養と培地流通培養でのアルブミン生産速度の比較。

毛細血管網様流路ネットワークの支持体として使用してきたアガロースゲルは細胞接着性に乏しい。一般に臓器細胞は壁付着性細胞であるため、支持体としては細胞接着性を有する材料が好ましい。その候補としてゼラチンが挙げられる。このゼラチンからゲルを調製するためには、従来、グルタルアルデヒドなどの細胞毒性の高い架橋剤が使用されてきた。本課題では、そのような架橋剤を使用することなくゼラチンをゲル化させる方法の開発を試みた。具体的には酵素触媒重合反応により SBP とゼラチンを架橋することを試みた。具体的な架橋機構を図 6 に示す。

基礎的情報の取得のため、HRP による酵素触媒重合反応により SBP とゼラチンの混合水溶液がゲルするのに必要な時間を測定した（図 7）。高分子濃度が高くなるにつれてゲル化時間は短くなった。また、いずれの条件でも 1 分以内に迅速にゲル化することが示された。

続いて、調製したゲルの 37 $^{\circ}\text{C}$ での安定性を評価した。本研究が採用した架橋反応によりゼラチンのみからでもゲルを調製することは可能である。しかし、そのゲルは 37 $^{\circ}\text{C}$

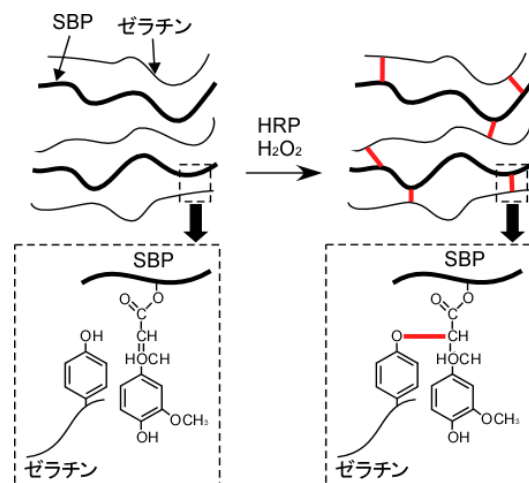


図 6. SBP とゼラチンの架橋機構。

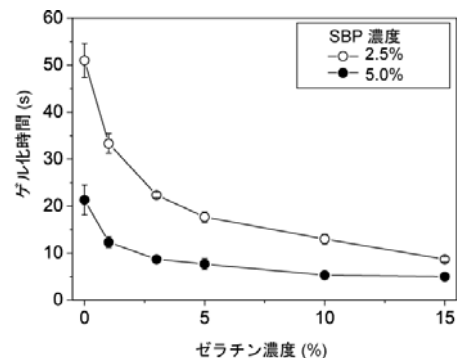


図 7. ゼラチン濃度、SBP 濃度とゲル化時間との関係。

表 1. 37 °C におけるゲルの安定性.

SBP 濃度 (%)	ゼラチン濃度 (%)	24 時間後のゲルの状態
0	5	-
0	10	-
0	15	-
2.5	5	±
2.5	10	±
2.5	15	±
5.0	5	+
5.0	10	+
5.0	15	+

-, 完全に溶解; ±, 一部溶解; +, 溶解せず

での静置 24 時間後に溶解してしまい、毛細血管網様流路ネットワークの支持体としては不適であった。一方、SBP 濃度が上昇するに伴って、ゲルの溶解が抑制され、SBP 濃度が 5.0%(w/v)の時ゲルは溶解しなかった (表 1)。また、ゼラチン濃度が上がるにつれてゲルの強度は上昇した。以上より、毛細血管網様流路ネットワークの支持体としては 5%SBP-15%ゼラチンゲルが適していると考えられる。

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)

1. Takayuki Takei, Naoya Kishihara, Hiroyuki Ijima and Koei Kawakami, Fabrication of capillary-like network in a matrix of water-soluble polymer using poly(methyl methacrylate) microfibers, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40:66-69, 2012 (DOI: 10.3109/10731199.2011.592492)

2. Takayuki Takei, Kotaro Sugihara, Masahiro Yoshida and Koei Kawakami, Injectable and biodegradable sugar beet pectin/gelatin hydrogels for biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, in press (DOI: 10.1080/09205063.2012.757727)

[学会発表] (計 1 件)

1. Takayuki Takei, Kotaro Sugihara, Hiroyuki Ijima and Koei Kawakami, Injectable and biodegradable sugar beet

pectin-based hydrogels for biomedical applications, The 10th Japan-Korea Symposium on Materials & Interface - International Symposium on Frontiers in Chemical Engineering -, November 8, 2012, Kyoto

[その他]

ホームページ等

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/714489.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 孝行 (TAKEI TAKAYUKI)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号: 90468059