

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560221

研究課題名(和文) ナノテクノロジーと細胞動員技術とを組み合わせた生体内微細加工技術の挑戦的研究

研究課題名(英文) Challenging exploratory researches on in vivo microfabrication techniques by combining nanotechnologies and cell recruiting techniques

研究代表者

山本 雅哉 (Yamamoto, Masaya)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：10332735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究項目 生体内で位置を決めて血管新生を誘導する技術、および研究項目 新生血管へ向けて、細胞構築物から血管をつくる細胞を動員する技術の開発を行った。研究項目 1では、マイクロ粒子やナノ粒子から血管新生因子を徐放化する技術を開発し、動物実験により血管新生を確認した。研究項目 2では、細胞構築物内部に毛細血管を構成する血管内皮細胞を効率よく、かつ位置を決めて配置するために必要な刺激応答性材料を作製した。任意に成型可能な刺激応答性材料にあらかじめ血管内皮細胞を接着させておき、細胞構築物内に配置することにより、毛細血管様構造をもつ細胞構築物を作製できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed two technologies, including in vivo angiogenesis induced in a spatially controlled manner (subject 1) and recruitment of angiogenic cells from cell tissue-like constructs (subject 2). In the subject 1, we demonstrated that the controlled release of angiogenic growth factors from biodegradable micro and/or nano particles could induce the in vivo angiogenesis. On the contrary, in the subject 2, we developed a stimuli-responsive material that allows vascular endothelial cells to be positioned into cell tissue-like constructs in an efficient and spatially controlled manner. The material can be fabricated in the desired shape, and vascular endothelial cells can attach on the surface of the material. Upon using the material with vascular endothelial cells, we fabricated cell tissue-like constructs with vascular-like structures.

研究分野：生体材料学、再生医療、幹細胞工学

キーワード：ナノテクノロジー 微細加工 血管新生 細胞動員 血管吻合

### 1. 研究開始当初の背景

血液が届かなければ生体組織は生存できない。同様に、細胞シートなど、再生医療に用いる細胞構築物にも血液が必要不可欠である。このため、毛細血管を組み込んだ細胞構築物 (Okano ら *Microvasc Res* 2010 など) が研究されていた。血液を届けるためには、この生体外で構築した毛細血管と生体内の毛細血管とをつなぐ必要がある。しかし、直径数 mm の血管をつなぐ外科手術 (血管吻合) を、直径 5~130 $\mu$ m の毛細血管に対して行うことはできない。今後の新しい再生医療の実現には、毛細血管に対する革新的な血管吻合技術が必要不可欠であるが、そのような技術は国内外を通じて皆無であった。

一方、既存の毛細血管のマイクロパターンニング技術 (例えば、Zheng ら *PNAS* 2012) は、生体外が対象であった。さらに、生体内へのナノテクノロジーの応用は、血管内に投与するナノ粒子などに限定されていた。本研究では、細胞動員に基づいて毛細血管につながる生体内のメカニズムに着目し、より微小な領域で細胞動員因子を作用させることにより、人為的に毛細血管の結合を促すことに挑戦した。これが、研究開始当初に国内外を通じて試みられたことがない、本研究のチャレンジ性であると認識していた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、毛細血管に対する革新的な血管吻合技術の開発である。具体的には、ナノテクノロジー、医工学、血管生物学を融合した、狙った位置に必要な生物現象を誘導する生体内微細加工 (ナノ血管吻合) にチャレンジする。このために、本研究では、以下の二つの技術の可能性を明らかにすることを目的とした。

#### 研究項目①: 生体内で位置を決めて血管新生を誘導する技術 (生体内微細加工技術)

生体内の毛細血管の位置を判別する方法として、従来の血管可視化ではなく、狙った位置に新しく血管を形成させることにより、位置を特定する技術を研究した。すなわち、ナノサイズのピラーをもつナノパターン化基盤と組み合わせることができる血管新生因子の徐放化ナノ粒子を研究開発した。

#### 研究項目②: 新生血管へ向けて、細胞構築物から血管をつくる細胞を動員する技術

毛細血管の結合を促す方法として、物理的に縫合する従来法ではなく、細胞動員を利用して生物的に結合させる方法を研究開発した。さらに、細胞構築物内に毛細血管構造を構築するための刺激応答性材料についても研究した。

### 3. 研究の方法

#### 研究項目①: 生体内で位置を決めて血管新生を誘導する技術 (生体内微細加工技術)

生体吸収性高分子であるゼラチンを用い

て、コアセルベーション法により生体吸収性ナノ粒子を作製した。ゼラチンの架橋条件を変化させることにより、異なる生体吸収性をもつナノ粒子を作製した。次に、得られた粒子に血管内皮増殖因子 (VEGF) などの血管新生因子やストローマ細胞由来因子 (SDF)-1 などの細胞動員因子を含浸させた。ナノ粒子からのこれらの因子の徐放性を放射性同位元素で標識した因子を用いて評価した。

#### 研究項目②: 新生血管へ向けて、細胞構築物から血管をつくる細胞を動員する技術

上述した細胞動員因子を含浸させたナノ粒子を用いて体内での細胞動員について検討した。一方、細胞構築物の毛細血管の構造をより決めた位置に配置する方法として、刺激応答性材料に血管内皮細胞を接着させ、細胞構築物内に毛細血管構造を構築する方法を開発した。拍動流を用いた循環培養法により、血管内皮細胞の増殖の改善を試みた。

### 4. 研究成果

#### 研究項目①: 生体内で位置を決めて血管新生を誘導する技術 (生体内微細加工技術)

ゼラチンを化学架橋することにより、異なる生体吸収性をもつナノ粒子を作製することができた。次に、ゼラチンかなる粒子を用いて、*in vivo* における SDF-1 の徐放性について検討した。その結果、約 1 ヶ月間、*in vivo* で SDF-1 を徐放化することができた (図 1)。

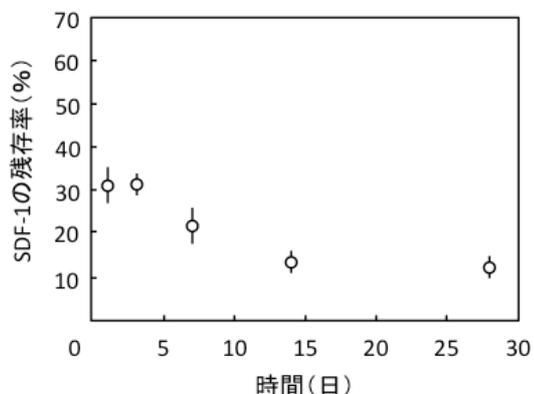


図 1 *in vivo* におけるゼラチン粒子からの SDF-1 の徐放化

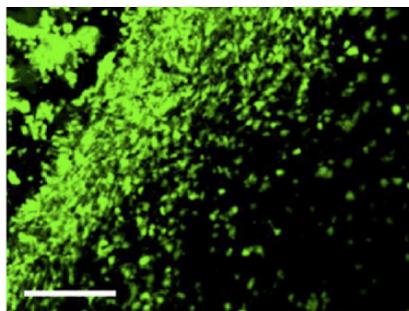
#### 研究項目②: 新生血管へ向けて、細胞構築物から血管をつくる細胞を動員する技術

##### (1) SDF-1 の徐放化による細胞動員

ゼラチン粒子からの徐放化された SDF-1 による細胞動員について、GFP 陽性骨髄細胞を移植したマウスを用いて検討した。その結果、SDF-1 を徐放化することにより、その周囲に GFP 陽性細胞 (緑色) が集積していることがわかった (図 2)。このことは、局所で SDF-1 を徐放化することにより、血液中を循環している骨髄細胞を動員できることを示している。ここで、骨髄細胞中には、血管内皮細胞

へ分化する血管内皮前駆細胞が含まれていることが知られている。以上の結果は、SDF-1を徐放化することによって、血管内皮前駆細胞を動員し、毛細血管構造を構築することができることを示唆している

埋入 2 週後



埋入 4 週後

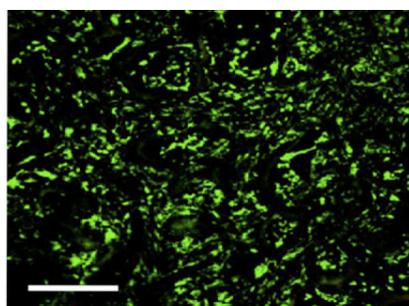


図 2 マウス背部皮下における SDF-1 の徐放化による GFP 陽性骨髄細胞の動員  
緑色：GFP 陽性細胞

### (2) 毛細血管構造を構築するための刺激応答性材料

体外で毛細血管構造を構築するためには、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を配置するための足場材料、ならびに細胞積層化やマイクロパターンニングなどの細胞の配置を操作する技術などが必要不可欠である。研究代表者らは、細胞傷害性のない糖添加により除去可能な毛細血管構造のテンプレートとなる糖応答分解性ハイドロゲルを開発した。そのハイドロゲルを利用して直径約 300  $\mu\text{m}$  のロッド状の足場材料を作製した。このロッドをコラーゲンゲル内に包埋し、糖応答性に分解除去することにより、コラーゲンゲル内に管腔構造を構築することができた。すなわち、糖応答分解性ハイドロゲル足場材料を含むコラーゲンゲルを、糖としてソルビトールを添加した培養液に浸漬することにより、ロッドを溶解消失させた。得られたロッド状孔の中を培養液でフラッシュすることにより、管腔構造をもつコラーゲンゲルを作製した (図 3)。

毛細血管構造のテンプレートとなる糖応答分解性ハイドロゲルへ蛍光標識した血管内皮細胞を接着させた後、コラーゲンゲル内に封入した。ソルビトールを添加することに

よりテンプレートを除去、マイクロポンプを用いて培養液を循環させることにより拍動流下で血管内皮細胞を培養した。その結果、コラーゲンゲル内に作製した毛細血管構造内部に血管内皮細胞が管状に接着している様子が確認できた (図 4)。

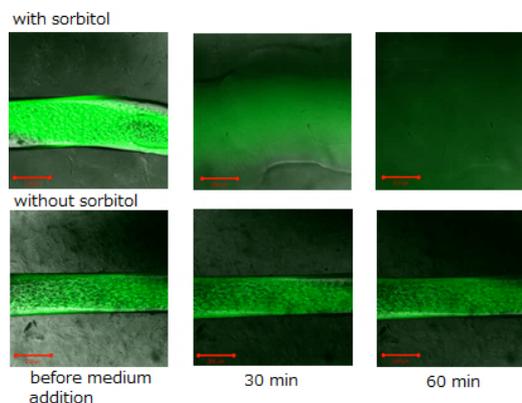
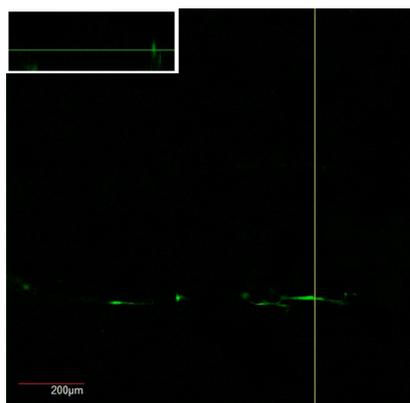


図 3 コラーゲンゲル内における糖応答性ハイドロゲルロッドの溶解

拍動流なし



拍動流あり

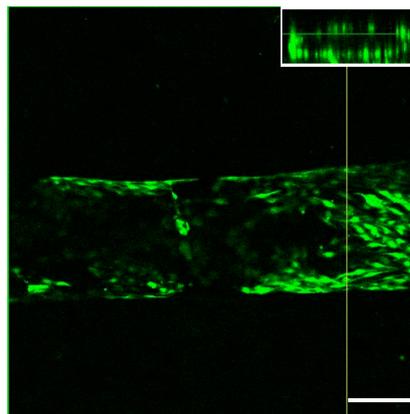


図 4 コラーゲンゲル内の血管内皮細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像

さらに、拍動流の有無により細胞の状態が異なることがわかったため、細胞数を定量したところ、拍動流下で培養することによって、

血管内皮細胞が有意に増殖することがわかった(図5)。これらの結果は、この糖応答分解性ハイドロゲル足場材料と三次元造形技術とを組み合わせることによって、毛細血管構造をもつ細胞構築物を体外で構築することが可能であることを示唆している。

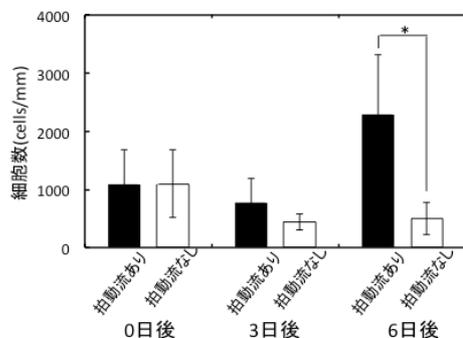


図5 コラーゲンゲル内での血管内皮細胞の増殖

\* $p < 0.05$  有意差あり

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

1. M. Yamamoto, S. Y. Rabbany, S. Rafii, Scaffold biomaterials for nano-pathophysiology. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 74, 104-114 (2014). 査読有り, Doi: 10.1016/j.addr.2013.09.009
2. T. Saito, Y. Tabata, Hypoxia-induced angiogenesis is increased by the controlled release of deferoxamine from gelatin hydrogels. *Acta Biomater.*, 10, 3641-3649 (2014). 査読有り, Doi: 10.1016/j.actbio.2014.04.021

[学会発表] (計 10件)

1. 有本 晃佑、山本 雅哉、田畑 泰彦、糖応答分解性ハイドロゲルを用いた血管様構造の作製、第59回高分子研究発表会、2013年7月21日、兵庫県民会館(兵庫県・神戸市)
2. 有本 晃佑、山本 雅哉、田畑 泰彦、管腔構造をもつコラーゲンゲル内での血管内皮細胞の培養、第8回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会、2013年8月31日、大阪大学銀杏会館(大阪府・吹田市)
3. M. Yamamoto, K. Arimoto, Y. Tabata, Development of sugar-responsive hydrogel rods as a sacrificial template to create vessel-like structures in collagen gels. *BMES 2013 Annual Meeting*, 2013年9月25日~28日、シアトル(アメリカ)
4. M. Yamamoto, K. Arimoto, Y. Tabata, Fabrication of sugar-responsive

hydrogels as a sacrificial template to create vessel-like structures in collagen gels. *TERMIS-AP*, 2013年10月23日~26日、烏鎮(中国)

5. 有本 晃佑、山本 雅哉、田畑 泰彦、管腔構造をもつコラーゲンゲル内での血管内皮細胞の動態、第35回日本バイオマテリアル学会大会、2013年11月26日~27日、タワーホール船堀(東京都)
6. 有本 晃佑、山本 雅哉、田畑 泰彦、刺激応答性材料により作製した管腔構造内での血管内皮細胞の培養、第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4日~6日、国立京都国際会館(京都府・京都市)
7. 有本 晃佑、佐藤 香枝、山本 雅哉、田畑 泰彦、刺激応答性材料により作製した管腔構造内での血管内皮細胞の培養、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月1日~4日、万国津梁館(沖縄県・名護市)
8. 有本 晃佑、佐藤 香枝、山本 雅哉、田畑 泰彦、コラーゲンゲル中に作製した管腔構造内における血管内皮細胞の動態、第9回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会、2014年8月5日、京都大学船井哲良記念講堂(京都府・京都市)
9. M. Yamamoto, Vascular tissue engineering based on biomaterials, 2014 CTCC Biomaterials Seminar Workshop(招待講演)、2014年8月27日、台北(台湾)
10. 有本 晃佑、佐藤 香枝、山本 雅哉、田畑 泰彦、刺激応答性材料を用いた血管様構造の作製と血管内皮細胞の動態、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014年11月17日~18日、タワーホール船堀(東京都)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0件)

○ 取得状況 (計 0件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅哉 (Yamamoto Masaya) ・ 京都大学 ・ 再生医科学研究所 ・ 准教授

研究者番号 : 10332735

(2) 研究分担者

田畑 泰彦 (Tabata Yasuhiko) ・ 京都大学 ・ 再生医科学研究所 ・ 教授

研究者番号 : 50211371