

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560229

研究課題名(和文) 生理活性分子をパターンニングした多孔質足場材料の創出

研究課題名(英文) Development of porous scaffolds with micropatterned bioactive molecules

研究代表者

川添 直輝 (Kawazoe, Naoki)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA研究者

研究者番号：90314848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロパターン構造を有する多孔質足場材料は、生体内の細胞微小環境を模倣していることから、機能性組織の再生においてきわめて有望と考えられている。そこで本研究では、生理活性分子を三次元的にパターン化した多孔質足場材料の創出を目的とした。生理活性分子溶液の描画法と凍結乾燥法を組み合わせ手法を確立し、パターン化多孔質足場材料を開発した。生理活性分子とコラーゲンからなる混合溶液の凍結物はマイクロパターンを形成するための鋳型として用いた。このことによって生理活性分子の分布を空間的に制御することに成功した。マイクロパターン構造を有する多孔質足場材料は組織再生を空間的に制御するのに有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Porous scaffolds with micropatterned structures are a promising tool for the regeneration of functional tissues, because they can mimic the biological and physiochemical factors in the in vivo cell microenvironments. Here we developed a method to micropattern bioactive molecules in porous collagen scaffolds by the combination of dispensing technique and freeze drying. Frozen micropatterns of the mixture of collagen and bioactive molecules solutions were used as templates to introduce bioactive molecules into the porous scaffolds. The distribution of bioactive molecules was spatially controlled by the micropatterns tethered by designing a computer program. The micropatterned porous scaffolds will be useful for spatially guided tissue regeneration.

研究分野：高分子生体材料学

キーワード：再生医工学材料

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内では、多種類の細胞が一定の空間的なパターンに従って集積し、組織や臓器を成り立たせている。細胞はそれぞれ適切な場所、適切なタイミングで分化の方向が決定されていく。この過程において、パターン形成を制御する空間的シグナルが細胞に位置情報を与え、細胞がこの情報を記憶したとき、複雑かつ精緻な構造体を形成する。例えば、体内の血管や神経網はこのパターン情報に制御され、より精緻なパターンが形成される。よって、この空間パターン情報を多孔質材料に印加し、細胞の分布を空間的に制御することは機能性の生体組織や臓器を再生するために非常に重要である。

(2) 組織再生の足場材料として生体吸収性をもつ多孔質材料がよく用いられる。多孔質材料作製方法として、従来、ポロージェンリーチング法や相分離法、凍結乾燥法、エマルジョン凍結乾燥法、ファイバー融着法、ニードルパンチング法、エレクトロスピンニング法などが用いられている(引用文献)。しかし、これらの従来技術では、パターン構造を有する多孔質材料の作製は困難であった。たとえば、凍結乾燥法では、原料を冷却するときに温度にかたよりが生じるため、最大の孔径と最小の孔径では、数倍のばらつきが生じることがあった。また、冷却方向を制御することにより空孔の配向を制御しようとする試みもあるが、不定形多孔質材料に対してはきわめて制御が難しい。そこで氷を鋳型に用いて、マイクロパターン状の表面空孔をもつコラーゲン足場材料を作製した。

2. 研究の目的

本研究では、生理活性分子を三次元的にパターン化した多孔質足場材料の開発を目的としている。すなわち、細胞成長因子などの生理活性分子を三次元的にパターン化した多孔質足場材料の作製条件を定め、細胞成長因子パターンのライン幅、間隔などの異なる多孔質足場材料を作製する。さらに、各種評価を行うことにより、本パターン化多孔質足場材料の有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 多孔質足場材料への生理活性分子導入法と評価法の検討

本研究では多孔質足場材料の素材として、細胞接着性にすぐれ、生体吸収性を有するコラーゲンを選んだ。まずは、コラーゲンスポンジへの生理活性分子の導入法について検討するため、比較的安価に入手できるインスリンを用いた。インスリンを徐放させるため、ダブルエマルジョン溶媒蒸発法を用い、ポリ乳酸-グリコール酸 (PLGA) のマイクロビーズに内包した。次に、このインスリン内包ビーズ、一定のサイズに制御した氷の鋳型、およびアテロコラーゲン水溶液を混合し、凍結した後、凍結乾燥を行った。得られたコラー

ゲンスポンジは、架橋反応を行った後、純水で洗浄した。インスリンを導入したコラーゲンスポンジを評価するために、次の実験を行った。コラーゲンスポンジの空孔構造は走査電子顕微鏡により観察した。インスリン放出実験は、PBS (pH 7.4) 中、37 で行った。また、繊維芽細胞をインスリン導入コラーゲンスポンジに播種し、2 週間培養を行った。細胞活性は、細胞生死判定試薬で染色を行うことによって評価した。細胞増殖は、細胞の全 DNA を定量することにより評価した。

(2) 細胞成長因子/コラーゲンマイクロパターンの作製

細胞成長因子とアテロコラーゲンの水溶液と混合した。次に、この混合液をあらかじめ冷却したコラーゲン溶液の凍結物表面に滴下し、ライン状のパターンを描画した。描画には、吐出ノズルの移動方向を制御した微量液体吐出装置を用いた。テフロン基板にパターンを描画する実験を行い、パターンが安定に形成される液体の吐出条件(圧力、ノズル径等)を検討した。

(3) 細胞成長因子が三次元パターンに固定化された多孔質足場材料の作製(下図)

コラーゲン水溶液を型枠に注入し、凍結させた。前項の検討にもとづき、コラーゲン凍結物の表面に細胞成長因子/アテロコラーゲンのパターンを描画した。描画した細胞成長因子/アテロコラーゲン溶液パターンを凍結した。ここに、あらかじめ冷却したコラーゲン水溶液を流し込んだ。このとき温度制御が重要で、コラーゲン溶液が凍結せず、かつ細胞成長因子/アテロコラーゲン凍結物のパターンが融解しない温度を保った。さらに冷却し、コラーゲン水溶液を凍結させた。凍結乾燥装置を用いて氷を除去し、空孔を形成させた。乾燥後、グルタルアルデヒドを用いて架橋反応を行った。コラーゲン分子が架橋され、細胞成長因子もコラーゲン分子に固定化された。架橋剤の未反応活性基をグリシンでブロック反応を行った。

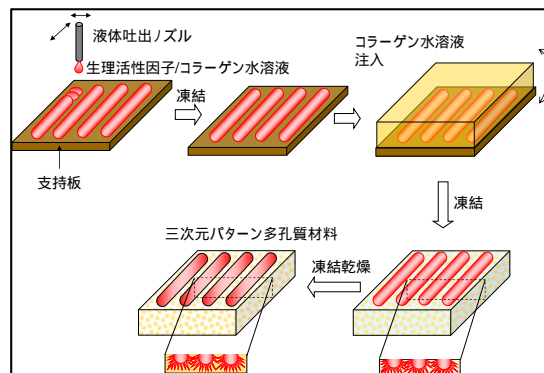


図 生理活性分子をパターン化したコラーゲン多孔質足場材料の作製スキーム。ノズルの位置やノズル径を変えることにより、ラインパターンの幅や間隔を制御できる。

(4) パターン状多孔質足場材料の多孔質構造観察と細胞成長因子導入

上記のパターン状多孔質足場材料を走査型電子顕微鏡で観察し、空孔サイズ・形状、孔連通性などを調べた。また、蛍光標識や酵素で標識された抗体を用いて多孔質足場材料中の細胞成長因子の分布を可視化し、細胞成長因子の三次元パターン形成を確認した。なお、走査型電子顕微鏡や光学顕微鏡などの装置は現有のものを使用した。

(5) 種々のパターンをもつ多孔質足場材料の作製

空溝のパターンは、組織再生に影響を与える可能性が考えられる。本方法では、コンピュータプログラムにより液体吐出位置の水平制御、およびノズル径の変更により吐出量の制御が可能である。そこで、種々の空溝パターンを有するコラーゲンスポンジをそれぞれ作製した。そこで(3)の方法を用いてスポンジを作製し、(4)の方法で多孔質構造を観察した。

(6) 細胞成長因子が三次元パターンに固定化された多孔質足場材料の評価

次に、パターン化材料を用いて細胞を培養した。空孔構造などパターン化多孔質足場材料のパラメータを種々の値に変えたものを作製した。作製したパターン化多孔質材料に細胞を播種し、細胞の接着、分布、増殖、および細胞生存性などを調べパターン構造の影響について明らかにした。

4. 研究成果

(1) 多孔質足場材料への生理活性分子導入法と評価法の検討

細胞成長因子の代わりに、安価に入手できる生理活性分子インスリンを用いて導入方法を検討した。インスリン内包マイクロビーズを導入したコラーゲンスポンジの走査電子顕微鏡像より、マイクロビーズがコラーゲンスポンジに導入されていることがわかった。また、氷の鑄型を反映した空孔構造と、原料溶液の凍結によって生じた連通孔も観察された。インスリン放出実験の結果、インスリンは4週間にわたって徐放されることが明らかとなった。繊維芽細胞をインスリン導入コラーゲンスポンジで2週間培養し、細胞生死判定試薬で染色したところ、大部分が生細胞であり、死細胞はほとんど観察されなかった。細胞増殖を評価したところ、インスリン内包マイクロビーズを導入したコラーゲンスポンジでは、未導入のコラーゲンスポンジ(培地にインスリンを添加)に比べ、有意に細胞増殖効果を有することが示された。本項目(1)で得られる検討結果を踏まえて、(2)以下の実験を行った。

(2) 細胞成長因子/コラーゲンマイクロパターンの作製

細胞成長因子を添加したアテロコラーゲン水溶液を、あらかじめ冷却したテフロン基板に一方方向に滴下した。その結果、基板表面にライン状のパターンが形成されることを確認した。さらに、液体を滴下させる際のノズル吐出圧、およびノズル径を最適化することにより、ライン状パターンを安定に作製することが可能となった。

(3) 細胞成長因子が導入されたパターン状多孔質足場材料の作製

(2)で得られた細胞成長因子/コラーゲン凍結物のパターンの上からコラーゲン水溶液を流し込み、凍結乾燥、つづいて架橋反応を行った結果、ライン状のパターンを有するコラーゲンスポンジが得られた。スポンジに導入された細胞成長因子は、免疫染色により可視化された。よって、細胞成長因子はパターン状コラーゲンスポンジに導入することに成功した。

(4) パターン状多孔質足場材料の多孔質構造観察

本方法より作製したコラーゲンスポンジの走査電子顕微鏡像より、コラーゲンスポンジの表面には氷ラインパターンの形状を反映した空溝パターンが確認された。また、コラーゲン水溶液の水が凍結することによって形成された小さな空孔が存在することも分かった。さらにライン状の空溝パターンの下部に小さな空孔があることが確認できた。スポンジの断面像から、スポンジ外表面のライン状空溝は内部の空孔と連通していることを明らかにした。このような連通孔は細胞が足場材料全体に分布するのに適しているといえる。

(5) 種々のパターンをもつ多孔質足場材料の作製

液体吐出の位置、およびノズル径を変更することにより、ライン状の空溝幅をかえたコラーゲンスポンジを作製することに成功した。さらに、円環状、格子状のパターンを得ることができた。

(6) 生理活性分子を導入した多孔質材料を用いた細胞培養

次に、パターン化材料を用いて細胞を培養した。空孔構造などパターン化多孔質足場材料のパラメータを種々の値に変えたものを作製した。作製したパターン化多孔質材料に細胞を播種し、細胞の接着、分布、増殖、および細胞生存性などを調べパターン構造の影響について明らかにした。

本研究の足場材料はコラーゲンのように生体親和性の高い原料をベースにしており、しかも大部分が空隙で原料の占める割合がわずかである。そのため、将来的に再生医療の多孔質足場材料として用いる場合、埋植を受

けた患者への負担がより軽減されると考えられる。

多孔質材料の原料と細胞成長因子の混合溶液からなる凍結物パターンを融解を防ぎつつ多孔質原料水溶液に導入し、凍結乾燥によって多孔質体を形成させるのは高度な材料手法が求められる。そこで、このような高いハードルを越えるため、申請者がこれまでに蓄積した多孔質材料の作製手法や分子のパターニング手法を活用したいと考えている。細胞成長因子をパターン化したコラーゲン多孔質足場材は生体情報ネットワークの再生に有用なツールとなると期待される。

<引用文献>

Guoping Chen, Takashi Ushida¹ and Tetsuya Tateishi, Scaffold Design for Tissue Engineering, Macromolecular Bioscience, 2, 67-77 (2002)

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)

Himansu Sekhar Nanda, Naoki Kawazoe, Qin Zhang, Shangwu Chen, Guoping Chen, Preparation of collagen porous scaffolds with controlled and sustained release of bioactive insulin, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 29, 95-109 (2014) (査読有) doi:10.1177/0883911514522724

〔学会発表〕(計4件)

川添 直輝、Nanda Himansu Sekhar、陳 国平、インスリンを徐放する PLGA/コラーゲン複合多孔質足場材料の作製、第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 05 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市白石区東札幌 6 条 1 丁目)

Naoki Kawazoe, Wei Song, Xinlong Wang and Guoping Chen, Manipulation of Stem Cell Functions on Micropatterned Surfaces at Single Cell Level, 2014 ISOMRM (招待講演), 2014 年 08 月 27 日, Chang Gung University (CGU), Tao-Yuan, Taiwan

Naoki Kawazoe, Wei Song, Hongx Lu, and Guoping Chen, Micropatterned Surfaces for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, ISBPPB Annual Conference (招待講演), 2014 年 07 月 12 日, Crowne Plaza Dulles Airport Hotel (Washington D.C., USA)

川添 直輝、Oh Hwan Hee、Ko Young-Gwang、陳 国平、氷を鋳型としたマイクロパターン状表面空孔をもつコラーゲン足場材料の開発、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 05

月 30 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市熱田区熱田西町)

〔図書〕(計2件)

川添 直輝、陳 国平、シーエムシー出版、2014、高機能性繊維の最前線～医療、介護、ヘルスケアへの応用～、241 (122-128)

川添 直輝、陳 国平、シーエムシー出版、2014、進化する医療用バイオベースマテリアル、272 (193-202)

6. 研究組織

(1)研究代表者

川添 直輝 (KAWAZOE, Naoki)
物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA 研究者
研究者番号：9 0 3 1 4 8 4 8

(2)連携研究者

陳 国平 (CHEN, Guoping)
物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・ユニット長
研究者番号：5 0 3 5 7 5 0 5

以上