

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 24 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870272

研究課題名(和文) 分子配向を利用したバイオミメティック・ファイバーの創成と組織構築への応用

研究課題名(英文) Development of biomimetic fiber with molecular alignment and its application to tissue engineering

研究代表者

藤田 聡 (Fujita, Satoshi)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60504652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：3次元的な組織構築を可能としたナノファイバーをベースとした基材の基盤技術開発をめざし、ナノファイバー中のペプチドの分子配向と自己組織化の実証と、ナノファイバー技術の幹細胞培養への応用をおこなった。芯鞘ナノファイバーの利用により、水に不溶のゲル状のコラーゲンファイバーを得た。またナノファイバーを一定方向に配向させたシート状の構造体を作製し、これを積層することで、造血幹細胞の培養に適した「バイオミメティックファイバー」の創製をおこなうことができた。

研究成果の概要(英文)：To apply nanofibers to three-dimensional tissue constructs, we have tried to develop nanofiber-based scaffolds, including the self-organization and alignment of peptide molecules in nanofibers and the stem cell culture by using nanofiber scaffolds. We have successfully fabricated collagen gel-like fibers by exploiting core-shell nanofibers. We also developed culture sheets construct by layering aligned fiber sheets and applied them to hemetopoitic stem cell culture, which is called as 'biomimetic fibers'.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノファイバー 間葉系幹細胞 コラーゲン エレクトロスピンング 造血幹細胞 高密度培養 幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

iPS/ES 細胞をはじめとする幹細胞研究の急速な発展により、再生医療の実用化が期待されている。こうした中、細胞から組織・臓器を立体的に構築するために、細胞の微小環境を適切に制御できる医用材料が強く望まれている。一般に、生体組織中で細胞は、細胞外マトリクス(ECM)と呼ばれる繊維状の糖・タンパク質等から成る構造体の中に存在しており、これらは局所的に特定の方向に配向するなどの異方性の高い微細構造を有している。細胞の形態や配列は、こうした異方性により、緻密に制御されている。したがって再生医療で使用される材料にも ECM で見られるような異方性が求められる。しかしながらこれまで、骨や上皮等の再生を目的とした組織工学分野で、細胞の接着の場を提供する材料として長らく使用されてきたハイドロゲルや合成高分子は、等方的かつ均質な物性を有する。そのため、より複雑な組織・臓器の構築には限界があり、生体のもつ微細構造を再現できる材料が望まれている。

生体の組織に見られる異方性のある構造を模倣して、一方向に配向させたナノファイバーから成る配向性の高い足場材料をエレクトロスピンニング法により作成した。この上で間葉系幹細胞を培養したところ、配向性の足場上では骨芽細胞、脂肪細胞両方へ誘導されたものの、無配向の足場上では脂肪細胞への分化が抑制され骨芽細胞への分化が選択的に生じるという興味深い知見を得た。この結果は、基材の形状や幾何構造を変えることで細胞の機能を自由に制御できることを示している。

2. 研究の目的

そこで本申請課題では、3次元的な組織構築を可能としたナノファイバーをベースとした基材の基盤技術開発をめざし、下記の研究項目を推進することにした。

(1) ナノファイバー中のペプチドの分子配向と自己組織化の実証

細胞外マトリクスタンパク質のコラーゲンを用いて、ナノファイバーを作成する。これまでの多くの研究では、高い水素結合能を有するヘキサフルオロイソプロパノール(HFP)等の高極性溶媒にコラーゲンを溶解させ、これをエレクトロスピンニング法により紡糸することでコラーゲンナノファイバーを作製している。しかし、化学的架橋処理なしには、ファイバーの高強度化・不溶化は実現できていなかった。そこで、分子配向にもとづいてファイバーの高強度化と不溶化をはかる。

(2) バイオミメティック・ファイバーの創成と機能評価

架橋剤を使用せずにコラーゲンナノファイバーを作成できれば、再生医療用途におけ

る安全な材料としての使用が期待される。配向ナノファイバーを用いて生体組織を模倣した異方性の高い構造を模倣した新規配向性ファイバー(バイオミメティック・ファイバー)の創成を行う。これの再生医療用の理込材料としての有用性評価をおこなう。

3. 研究の方法

(1) ナノファイバー中のペプチドの分子配向と自己組織化の実証

同軸ノズルを用いて、芯鞘型のナノファイバーをエレクトロスピンニング法により作成した。内層には酢酸緩衝液(pH 3.6)に溶解させたI型コラーゲンを、外層には水溶性高分子であるポリビニルピロリドン(PVP)を用いた。これを回転式ドラム型コレクタ上で紡糸し、ナノファイバーシートを回収した。回収したファイバーをエタノール水溶液および水で洗浄することで、PVPを除去し、ファイバー状のコラーゲンを得た。これによりコラーゲンは芯鞘ファイバー内で分子配向を形成し、自己組織化的に高次構造が形成されるものと考えられた。これを酢酸緩衝液に再溶解させ、SDS-PAGEによる分子量評価、円二色性(CD)スペクトル測定による二次構造評価を行った。

(2) 「バイオミメティック・ファイバー」の創成と機能評価

生体組織を模倣した異方性の高い構造を模倣した新規な3次元ファイバー足場材料の創成を目指し、ナノファイバーシートを多層に重ねるための層状の基材を、アクリル加工機を用いて作製した。この層状の基材に間葉系幹細胞を播種したのち、各層間で造血幹細胞を培養することで人工造血幹細胞ニッチと呼ぶべき培養環境を構築した。培養した造血幹細胞の性質はフローサイトメトリーおよびコロニーアッセイ法により評価した。

4. 研究成果

(1) ナノファイバー中のペプチドの分子配向と自己組織化の実証

コラーゲンを芯、PVPを鞘としたナノファイバーの形成は、芯・鞘それぞれの紡糸溶液に赤・緑の蛍光色素を添加しておき、これを蛍光顕微鏡で観察することで確認できた。作成したファイバーをゲル化・洗浄することでゲル状のファイバーを得ることができ、これをSEMで観察した。得られたファイバーは水には溶解せず、ゲル化しているものと考えられた。そこでこれを酸性緩衝液で再溶解させたのち、SDS-PAGEをおこなったところ、洗浄操作後のコラーゲン溶液は、高分子バンドが明瞭に観察でき(Fig. 1)、三重らせん構造が維持されていることがわかった。一方で、有機溶媒を用いて紡糸したコラーゲンファイバーを再溶解したものの電気泳動では、スメアなバンドが観察され、タンパク質の変性と切断が生じていることがわかった(Fig. 1)。

得られたゲルファイバーの CD スペクトルを測定したところ、トリプルヘリックスに由来するコットン効果がもとのコラーゲンに対し 70%程度維持されていることがわかった。以上より、コラーゲン特有の高次構造を保持したままファイバー化することに成功したと言える。

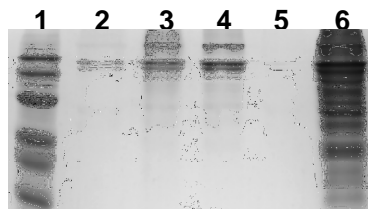


Fig. 1 SDS-PAGE. Lane 1: marker, 2: co-axial fiber as spun, 3: washed co-axial fiber, 4: original collagen, 5: PVP, 6: electrospun fiber by using HFP

(2) 「バイオミメティック・ファイバー」の創成と機能評価

ナノファイバーを一定方向に配向させたシート状の構造体を作製し、この上で骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を培養した。通常の培養皿上での培養では、MSC を骨芽細胞や脂肪細胞等へ分化誘導させるためには、それぞれの分化に適した誘導因子のカクテルを培地に添加する必要がある。これらの因子をすべて混和した培地を用いて培養すると、骨芽細胞も脂肪細胞もいずれも出現する。しかしながら、一定方向に配向させた異方性のあるナノファイバー上で培養したところ、脂肪細胞への分化が抑制され、骨芽細胞方向への選択的な分化が起こるといった興味深い結果が事前に見出されていた。これは、細胞が足場の異方性から力学的な刺激を細胞骨格を介して受けたためと考えられる。そこで、一方向に配向させたナノファイバーシート上で MSC を培養してこれを積層し、各シート間で造血幹細胞 (HSC) を培養できるように、ナノファイバーシートを蜂の巣箱状に積層するためのアクリル板を加工した培養治具を設計・作成した (Fig. 2)。これは、HSC は生体中では骨芽細胞様ストロマ細胞に取り囲まれた造血ニッチと呼ばれる微小環境中で増殖するという知見をもとに、造血ニッチを模した培養系を人工的に作製する目的でおこなったものである。

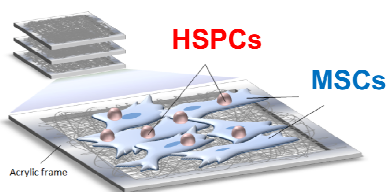


Fig. 2 Biomimetic nanofiber scaffold

先の結果では、異方性ファイバー上では骨芽細胞への選択的な分化が見られたため、ここで MSC と HSC を共培養することで、HSC の効

率的増幅が可能になると考えた。期待通り、異方性シートを用いた場合、未分化な造血幹細胞が効率的に増殖するという大変興味深い知見が得られた (Fig. 3)。この結果はファイバーシートの幾何構造が MSC の細胞機能に影響し、さらにそれが HSC の増殖に影響を与えたものと考えられ、基材側からの工学的アプローチによる細胞機能制御につながる成果として期待できる。

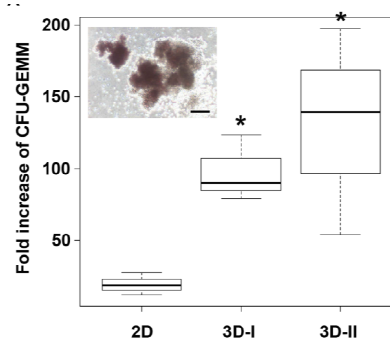


Fig. 3 Expansion of HSPC

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 5 件)

1. T. Uchimura, G. Tokumoto, O. Batnyam, C. W. Chou, S. Fujita, Multiphoton Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Bioactive Lignan, *Anal. Sci.*, 査読有, **32**, 2016, pp. 255-257
DOI:10.2116/analsci.32.255
2. T. Kawasaki, T. Nakaji-Hirabayashi, K. Masuyama, S. Fujita, H. Kitano, Complex film of chitosan and carboxymethyl cellulose nanofibers, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 査読有, **139**, 2016, pp. 95-99
DOI:10.1016/j.colsurfb.2015.11.056
3. O. Batnyam, H. Shimizu, K. Saito, T. Ishida, S. Suye, S. Fujita, Biohybrid hematopoietic niche for expansion of hematopoietic stem/progenitor cells by using geometrically controlled fibrous layers, *RSC Adv.*, 査読有, **5**, 2015, pp. 80357-80364
DOI:10.1039/C5RA13332G
4. P. Hughes, S. Fujita, S. Suye, A holistic approach into the impact of sodium hypochlorite on polypropylene fibre reinforced concrete, *Constr. Build. Mater.*, 査読有, **85**, 2015, pp. 175-181
DOI:10.1016/j.conbuildmat.2015.03.041
5. P. Hughes, S. Fujita, S. Suye, The effects of sodium hypochlorite upon polypropylene fibres utilised within marine concrete, *Indian Concrete J.*, 査読有, **89**, 2015, pp. 91-96
http://www.icjonline.com/main_2015.04_Apr_techpapers.htm

〔学会発表〕（計3件）

1. 西本 昇平, 藤田 聡, 末 信一郎, 芯鞘ナノファイバーを用いたコラーゲン高次構造の形成, 第4回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 2015
2. 和久田 弓加, 西本 昇平, 末 信一郎, 藤田 聡, コアキシャル・エレクトロスピンングによるアルギン酸ナノファイバーの創製, 平成27年度高分子学会北陸地区若手研究会, 2015
3. 加藤 新, バトニャム オノン, 末 信一郎, 藤田 聡, 薬剤徐放のためのコラーゲン/PLLA, 芯鞘ナノファイバーの創製, 第64回高分子討論会, 2015

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：ハイドロゲル繊維の製造方法及び当該製造方法により製造されたハイドロゲル繊維

発明者：藤田 聡, 西本 昇平

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-104696

出願年月日：平成27年5月22日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/bioeng/suye/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 聡 (FUJITA, Satoshi)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60504652

(2) 研究協力者

末 信一郎 (SUYE, Shin-ichiro)

松村 和明 (MATSUMURA, Kazuaki)

坂元 博昭 (SAKAMOTO, Hiroaki)

バトニャム オノン (BATNYAM, Onon)

西本 昇平 (NISHIMOTO, Shohei)