



Title	Construction of Three-Dimensional Tissues with Controlled Cell Density by Formation of Collagen Nanofiber Matrix on Cell Surfaces
Author(s)	劉, 俊彦
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54007
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (刘俊彦 (Chun-Yen Liu))	
論文題名	Construction of Three-Dimensional Tissues with Controlled Cell Density by Formation of Collagen Nanofiber Matrix on Cell Surfaces (細胞表面のコラーゲンナノファイバーマトリックスの形成による細胞密度を制御した三次元組織の構築)
論文内容の要旨	

This study reported fabrication of micrometer-sized collagen-nanofiber matrices on cell surfaces for in vitro construction of three-dimensional (3D) tissues. In this study, formation of the collagen-nanofiber matrices on cell surfaces was successfully optimized by controlling physicochemical factors. Thickness of the collagen matrices was controlled from 3 to 40 μm by multiple coating. Two-dimensional distance between the coated cells was longer than that of uncoated cells. Furthermore, thick 3D-tissues with over 1 mm thickness were easily constructed by seeding the coated cells into cell-culture insert. The obtained novel 3D-tissues will be useful for tissue engineering and pharmaceutical applications.

In Chapter 1, 0.03 wt% type I collagen solutions were applied to coat cell surfaces by collagen-nanofiber matrices. Furthermore, thickness of the collagen nanofiber matrices on cell surfaces was modulated *via* multiple coating. Although cell proliferation speed of the coated cells decreased with increasing thicknesses of the collagen matrices on cell surfaces, cell viabilities were over 95% independent of the thickness. Two-dimensional distance between the coated cells was longer than that of uncoated cells. Thick 3D-tissues with controlled cell density were easily constructed after 1 day culture.

In Chapter 2, triple-helix structures of collagen molecules on cell surfaces or in collagen gels were characterized from nanometer- to micrometer-sized levels. Formation of collagen nanofibers on cell surfaces was accelerated at both body temperature and neutral pH conditions. X-ray diffraction analyses suggested that triple-helix structures of collagen molecules were stable after adsorption on cell membrane. The results indicated that cell surface did not have any effect on triple-helix formation of collagen molecules.

In Chapter 3, thickness of 3D-tissues using the coated cells was controlled by altering coating times. Three-times coating provided thickest 3D-tissues with over 2 mm (2000 μm). By changing coating times and seeding cell number, thickness of the obtained 3D-tissues was easily controlled from 5 to 2000 μm . Besides, cell-cell distance and cell density were also controllable by altering these factors. Moreover, when both two- and three-times coatings were employed for tissue construction sequentially, 3D-tissues with gradient cell densities were successfully constructed.

In Chapter 4, different kinds of cells such as induced pluripotent stem cells derived cardiac myoblasts (iPSC-CMs) and Human umbilical vein epithelial cells (HUVECs) were employed in this study for construction of functional thick 3D-tissues. The 3D-iPSC-CM tissues with 1 mm thickness were successfully constructed by this coating method, and synchronous beating was observed during incubation for over 1 week. When sandwich culture of HUVECs between ten-layered normal human dermal fibroblasts (NHDF) was used, blood-capillary network was formed inside the 3D-thick tissues. These functional thick 3D-tissues will be useful as an implantable tissue for regenerative medicine and as a human tissue model for pharmaceutical assessment.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (刘 俊彦 (Chun-Yen Liu))	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主査 准教授 木田 敏之
	副査 特任教授 明石 满
	副査 教授 神戸 宣明
	副査 教授 真嶋 哲朗
	副査 教授 三浦 雅博
	副査 教授 茶谷 直人
	副査 准教授 森 直
	副査 教授 安田 誠
	副査 教授 生越 専介

論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞表面上へのマイクロメータサイズのコラーゲンナノファイバマトリックスの作製に関するものである。細胞表面上へのコラーゲンコーティングの最適条件を明らかにするとともに、多様なコーティング法を用いることで、細胞表面上に様々な厚さのコラーゲンナノファイバマトリックスを作製することに成功している。本手法により、組織工学と創薬に応用可能な、多様な細胞密度をもつ厚い三次元組織を簡単に構築することができる。

第一章では、I型コラーゲンの水溶液を用いて、細胞表面上に様々な厚さのコラーゲンナノファイバマトリックスをコーティングすることに成功している。また、これらのコラーゲンナノファイバマトリックスでコーティングされた細胞は、高い生存率と正常な増殖性を示すことを明らかにしている。コラーゲンナノファイバマトリックスでコーティングされた細胞を用いることで、細胞間距離を制御できることを見出している。さらに、細胞表面のコラーゲンナノファイバマトリックスが、細胞を保護し、乾燥条件下での細胞からの水分損失速度を低減する効果を示すことも明らかにしている。コラーゲンナノファイバでコーティングされた細胞を使用することによって、低細胞密度の厚い三次元組織の構築に成功している。

第二章では、細胞表面上のコラーゲンナノファイバマトリックスまたはバルクのコラーゲンゲルにおいて、ナノメートルからマイクロメートルレベルのコラーゲン分子の三重らせん構造を明らかにしている。円二色性 (CD) スペクトルから、体温付近の温度と中性付近の pH の両方が纖維形成を促進することを明らかにしている。また、赤外分光 (IR) スペクトルおよび X 線回折 (XRD) スペクトルより、細胞表面に吸着したコラーゲン分子が構造を安定に保つことを見出し、細胞表面がコラーゲン分子の三重らせん構造に影響を与えないことを明らかにしている。

第三章では、コラーゲンナノファイバマトリックスのコーティング回数を変えることで、様々な厚さの三次元組織の構築に成功している。2~3 回コーティングすることで、従来の手法では困難であった、厚さ 2 mm (2000 μm) の三次元組織を安定に作製可能であり、構築された組織内の細胞間距離と細胞密度は、培養期間中に一定であることを見出している。また、細胞密度の異なる組織を積層して作製した、細胞密度の勾配を有する三次元組織の構築にも成功し、その界面構造は数日間の培養期間中において安定であることを明らかにしている。

第四章では、ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) 及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) のような、複数種類の細胞を用いた厚い三次元組織の構築に成功している。毛細血管網を有する厚いヒト心筋組織を構築するため、iPS-CM 表面にコラーゲンナノファイバマトリックスを形成して三次元組織を構築している。その際、HUVEC を混

合することで、毛細血管構造を有し、同期拍動する厚さ約1mmの三次元組織が構築できることを見出している。これは世界で初めての報告であり、移植片として再生医療分野への応用が期待される。

以上のように、本論文は、三次元組織内の細胞間距離と細胞密度を制御可能な、細胞表面上へのコラーゲンナノファイバマトリックスの形成と様々な機能性三次元組織の構築に関する内容である。構築したコラーゲンマトリックスの構造を分子レベルで明らかにし、様々な構造の三次元組織が作製できることを見出しており、再生医療や創薬分野への応用が期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。