OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	ハイドロゲルテンプレート法による培養細胞と細胞外マトリックスから構成された三次元組織の構築 : 合成物フリーな三次元組織体の構築法
Author(s)	吉田, 裕安材; 松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54065
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

5-2-10　ハイドロゲルテンプレート法による培養細胞と細胞外マトリックスから構成された三次元組織の構築
—合成物フリーな三次元組織体の構築法—

吉田裕安材[*1)]　松崎典弥[*2)]　明石　満[*3)]

中心論文：M. Matsusaki, H. Yoshida and M. Akashi: The construction of 3D-engineered tissues composed of cells and extracellular matrices by hydrogel template approach, Biomaterials **28** (2007) 2729-2737.

生体外で培養細胞とそれらが産生した細胞外マトリックス(ECM)から構成された三次元組織を構築するべく，分解性が制御可能なハイドロゲルをテンプレートにした三次元組織の作製法を開発した．ゲルの中で一定期間細胞を培養した後，細胞毒性のない条件下でゲルのみを溶解除去させることで，細胞とECMのみからなる組織が得られた．さらに，ゲルの孔構造や細胞培養法を工夫し，得られる組織に配向性や立体構造を持たせることにも成功した．

A method for constructing 3-dimensional (3D) engineered tissues composed of cultured cells and extracellular matrices (ECM) produced by the cells was developed by using hydrogels with controlled degradability. Such 3D-engineered tissues were simply obtained after 3D-cell culture in porous hydrogels followed by selective removal of the hydrogels under non-cytotoxic conditions. Furthermore, controlling pore structures of the hydrogels and combination with a 3D-cell assembly technique allowed construction of oriented engineered tissues and complex tissues like blood vessels.

1. はじめに

再生医療研究において，肝臓や腎臓など多種類の細胞と細胞外マトリックス(ECM)から構築され，配向性や血管網を兼ね備えた複雑な生体組織は，未だ基礎研究の段階である[(1)]．これまでに生体外で三次元組織を構築するため，高分子足場材料を用いた細胞の三次元培養が活発に研究されてきたが，細胞の過密化に伴う内部細胞の死滅や合成した高分子足場材料の低い分解性に伴う炎症や腫瘍形成が問題とされてきた．安全性と治療効果がより高い再生治療を行うためには，生体外で細胞とECMのみからなる組織の構築が望まれる．

そこで我々は，分解制御が可能な足場材料を用いた三次元培養の後，足場のみを選択的に溶解除去できれば，細胞とECMのみから構成された三次元組織が回収できると考えた(**図1**)．本稿では，この新規な三次元組織構築法に加え，この手法を利用して作製した配向組織や立体組織についても紹介する．

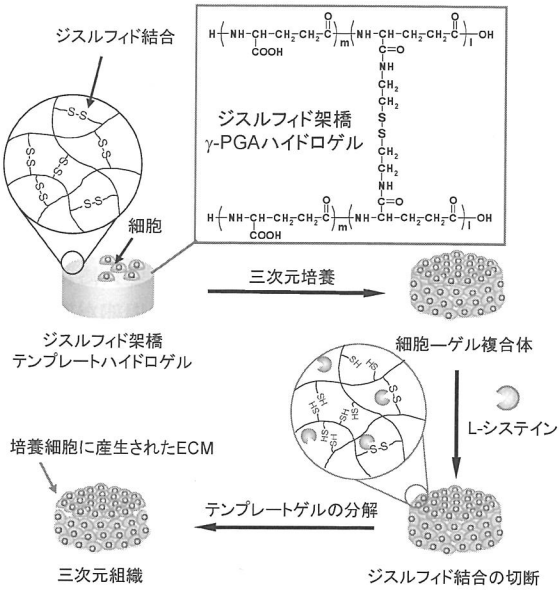

図1　ハイドロゲルテンプレート法による三次元組織の構築のイメージ図．(文献(2)より改変し引用)

2. ハイドロゲルテンプレート法

(1) 分解制御可能な足場材料の作製

培養環境中で細胞に毒性を与えることなく分解除去可能な足場材料を作製するために，ジスルフィド結合に着目した．ジスルフィド結合は生体内に存在する還元剤により切断されることが広く知られており，この結合を架橋点に付与したジスルフィド架橋ゲルは同様の還元剤による分解が期待される．

ポリγ-グルタミン酸(γ-PGA)は天然由来のポリアミノ酸であり，生分解性・生体適合性に優れている．このγ-PGAを，縮合剤存在下で内部にジスルフィド結合を有するジアミン系架橋剤(シスタミン)で架橋することでハイドロゲルを調製した(**図2**左)．得られたゲルはアミノ酸であるL-システ

* 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻；1)特任研究員，2)助教，3)教授(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)
1)Hiroaki Yoshida, 2)Michiya Matsusaki, 3)Mitsuru Akashi (Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University)
e-mail: akashi@chem.eng.osaka-u.ac.jp
Keywords：刺激応答性ハイドロゲル，ジスルフィド結合，足場材料，三次元組織，組織工学

インを5 mM添加した培地中で，L929マウス線維芽細胞に毒性を与えることなく分解できることが分かった．

(2)　三次元組織の構築

作製したジスルフィド架橋ハイドロゲル(直径1 cm，厚さ1 mm)を，凍結乾燥により多孔化し(孔サイズ20～100 μm)，L929マウス線維芽細胞を播種して10日間三次元培養した．その後，培地中にL-システイン5 mMを添加したところ，ゲルのみが溶解除去され，細胞とECMのみから構成された三次元組織が回収できた(**図2**右)．WST-1染色やLIVE/DEAD染色により組織中の細胞の生存を，コラーゲン染色により組織全体にわたるType Ⅰコラーゲンの産生を確認した．得られた組織中のゲル・ポリマーの残存を調べるために，蛍光ラベル化γ-PGAを用いて作製したジスルフィド架橋ゲルをテンプレートとして組織を作製したところ，組織中に蛍光は観察されなかった．以上の結果より，ハイドロゲルテンプレート法により細胞とECMのみから構成された三次元組織が構築できることが明らかとなった．このような組織は足場材料の残存に伴う問題点を解決でき，安全性の高い再生治療に貢献できると期待される．

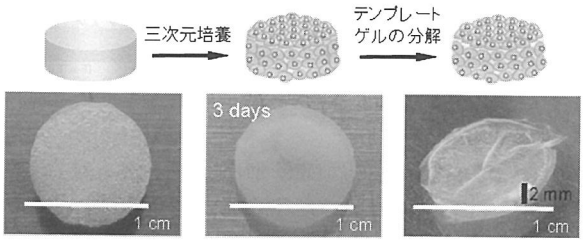

図2　ジスルフィド架橋ゲルを用いた三次元組織の構築．(文献(2)より改変し引用)

3.　複雑な三次元組織の構築

前項では，ハイドロゲルテンプレート法により細胞とECMからなる三次元組織が構築できることを示した[2]．本項では，テンプレートゲルの孔構造の制御や新たな細胞操作法の利用により，複雑な三次元組織が構築できることを示す．

図3(a)はシリカクロスと呼ばれるシリカファイバー(直径620 μm)からなる布をテンプレートとして作製したハイドロゲルである．先述と同様に，このゲルをテンプレートとしてL929マウス線維芽細胞の三次元組織化を行ったところ，**図3**(b)のような布状の三次元組織が回収できた[3]．興味深いことに，ゲル除去前のみならずゲル除去後においても細胞は配向しており，細胞によって産生されたType Ⅰコラーゲンも同様に配向していた．これらの結果は，孔構造を適切に制御することで，得られる三次元組織の配向性を制御できることを示している．

近年，我々のグループでは，基材表面に細胞を連続的に積層する細胞積層法を発表した[4]．この手法を用いて，キャピラリー孔を有するゲル(**図3**(c))の孔表面で血管平滑筋細胞と血管内皮細胞を積層させると，環状多層血管を有するハイブリッドゲルが得られた．さらに，ゲルのみを除去すると，細胞とECMのみからなる環状多層血管チューブが回収できた(**図3**(d))[5]．このように，孔構造や細胞操作法を工夫すれば，生体組織に類似した多様な組織が構築可能となる．

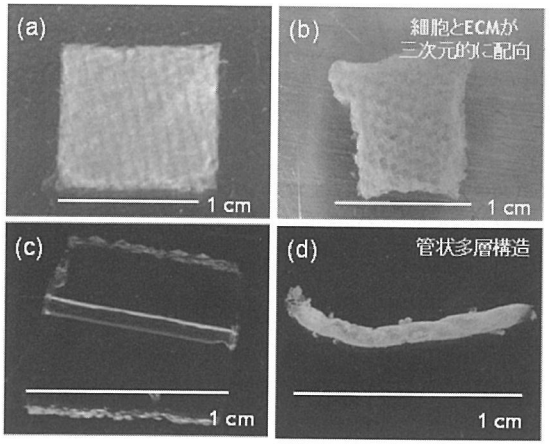

図3　配向や立体構造が制御された三次元組織の構築．(文献(3)，(5)より改変し引用)

4.　将　来　展　望

LangerおよびVacantiにより足場材料を用いた再生医療法が提唱されて以来[6]，数多くの足場材料が開発されてきたが，培養環境中で選択的に除去可能な足場は報告例がなかった．近年，細胞とタンパク質を巧みに用いた三次元組織化法が急速な展開を見せている[7][8]．このような手法との複合化により，複雑な臓器・組織体の構築など，組織工学のさらなる発展が期待される．

文　　献

(1) T. Dvir, B.P. Timko, D.S. Kohane and R. Langer: Nat. Nanotechnol. **6** (2011) 13–22.
(2) M. Matsusaki, H. Yoshida and M. Akashi: Biomaterials **28** (2007) 2729–2737.
(3) H. Yoshida, M. Matsusaki and M. Akashi: Adv. Funct. Mater. **19** (2009) 1001–1007.
(4) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara and M. Akashi: Angew. Chem. Int. Ed. **46** (2007) 4689–4692.
(5) H. Yoshida, M. Matsusaki and M. Akashi: Adv. Funct. Mater. **23** (2013) 1736–1742.
(6) R. Langer and J.P. Vacanti: Science **260** (1993) 920–926.
(7) A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki and M. Akashi: Adv. Mater. **23** (2011) 3506–3510.
(8) M. Matsusaki, H. Ajiro, T. Kida, T. Serizawa and M. Akashi: Adv. Mater. **24** (2012) 454–474.