

平成 27 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：個人研究

研究期間：平成 27 年 10 月～平成 28 年 9 月

研究課題名：血管網形成モデルを利用した細胞間コミュニケーションによる血管新生メカニズムの解明
ラボ長

所属：物質創成専攻・化学工学領域

氏名：劉楊

研究成果（当初の研究目的と得られた結果を記載してください。図表を含め 3 ページ程度）：

本研究では、生体と類似な三次元培養条件下で血管網形成のモデルを開発し、それを利用して細胞接触と細胞自己分泌両方に着目し、細胞間コミュニケーションによる血管網形成のメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究で設計した三次元培養の組織モデルは、細胞で覆われたヒドロゲル粒子及び細胞包括ヒドロゲル微粒子（図 1）を基礎単位として構成されるものである。



図 1 細胞で覆われたヒドロゲル粒子及び細胞包括ヒドロゲル微粒子の模式図

本年度（平成 27 年 10 月～平成 28 年 3 月）は、三次元培養の組織モデルの新規作製法の開発を行った。まず、細胞培養に適合するヒドロゲル微粒子の新規作製法の開発を施した。従来のヒドロゲル微粒子の作製方法では、マイクロチャンネルを用いて、高分子材料の水溶液を連続流動する油相溶液の中央に注入させ、油-水両相の界面張力によって生じたレイリー-プラトーの不安定性を利用することで液滴を形成させる。その後、液滴内の高分子材料をゲル化させ、ヒドロゲル微粒子を作製する。しかし、油相からヒドロゲル微粒子の回収は煩雑な操作を必要とする。そのゆえ、油を使わずにヒドロゲル微粒子を作製する方法の開発が求められている。水性溶液のみで形成した水性二相系は油-水系の代替として挙げられるが、水性二相系では界面張力が非常に小さいため、レイリー-プラトー不安定性のみによる球状液滴の形成が困難である。ポリエチレングリコール（PEG）-デキストラン（DEX）はよく研究されている水性二相系である。本研究では、マイクロチャンネルの設計を改善し、また、外側の流動相に周期的に変化する圧力を加えることにより、均一な DEX 液滴を PEG 溶液内に形成する方法の開発が成功した（図 2A）。本研究で使用した DEX 溶液は 10%(wt.)、PEG 溶液は 7.5%(wt.)であった。各溶液に与える圧力の強度を調整することにより、液滴のサイズをコントロール可能であることが確認された（図 2B）。次に、フェノール性水酸基（Ph）を導入した高分子材料（alginate-Ph と carboxymethylcellulose (CMC)-Ph など；最終濃度はすべて 1%(wt.)であった）と西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP；最終濃度は 100 units/mL であった）を DEX 溶液に混合し、その混合液からなる液滴を作製した後、HRP 酵素反応によって液滴中の高分子材料を架橋させることで、alginate-Ph または CMC-Ph ヒドロゲル微粒子の作製を実現した。濾過のみによって微粒子の回収が可能になったため、油-水系より後処理の時間を大幅に短縮することができた。さらに、微粒子の表面に細胞接着性を付与するため、フェノール性水酸基を導入したゼラチン誘導體（gelatin-Ph）を添加した（最終濃度は 0.6%(wt.)であった）。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）がヒドロゲル微粒子の表面に接着することが確認さ

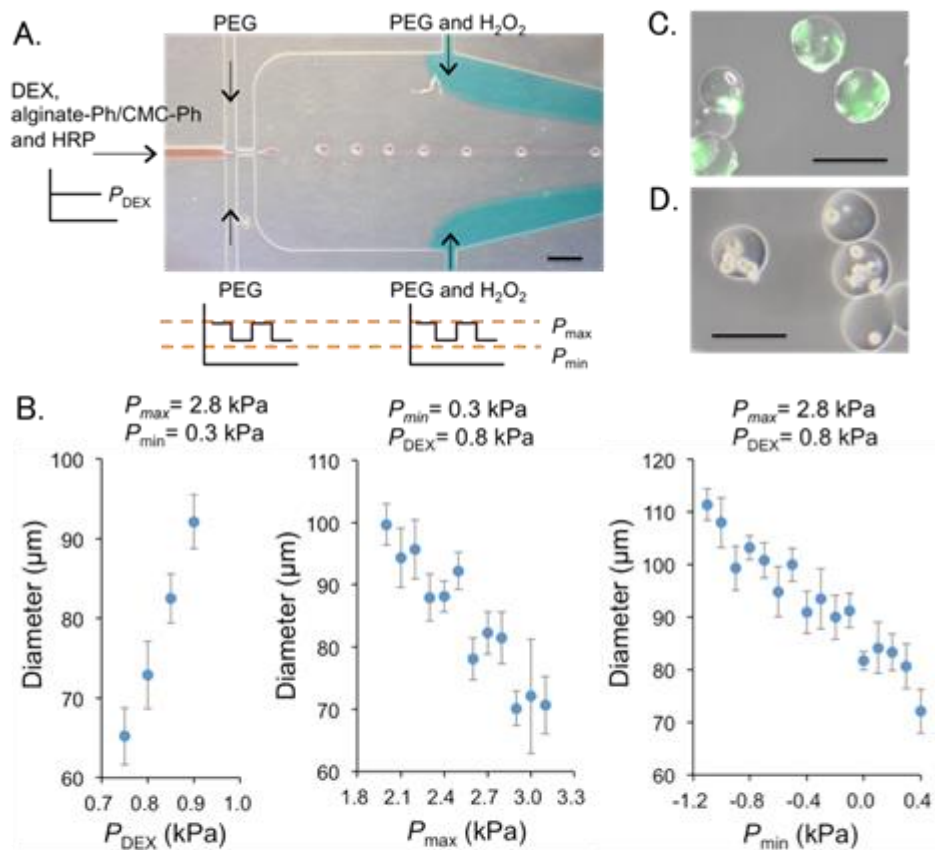


図 2 A. PEG-DEX の水性二相系を用いてヒドロゲル微粒子の作製方法. Bar: 400 μ m.
 B. 各溶液に与える圧力と得られた液滴の粒径の関係. Vertical bars: standard deviation.
 C. HUVEC 細胞で覆われたヒドロゲル微粒子 (緑: HUVEC 細胞) ; D. HepG2 細胞を
 包括したヒドロゲル微粒子. C-D. Bars: 100 μ m.

れた (図 2 C)。また、ヒト肝臓由来 HepG2 細胞を DEX 相の溶液中加入することで、細胞包括ヒドロゲル微粒子の作製にも成功した (図 2 D)。作製直後、または培養 6 日後、ゲル内部の細胞は高い生存率 (90%以上) を維持することが確認された。同時に、ゲル内で細胞増殖する様子も観察できた。

次に、細胞で覆われたヒドロゲル微粒子を三次元マトリクス中に均一に配置することを試みた。PDMS マイクロウェルを鋳型として利用し、細胞外マトリクスであるコラーゲンゲル中に微粒子を入れることを試みたが、操作上の問題が起こった。それは、コラーゲンゲルと PDMS 鋳型を分離するとき、微粒子がほとんどの PDMS ウェル中に残った。そこで、PDMS モールドを用いてコラーゲンゲルからなるマイクロウェルを作製し、微粒子をコラーゲンゲル中に直接的に配置する方法を考えたが、コラーゲンゲルの機械強度は弱すぎて、ウェルの形状が維持できなかった。この問題の解決策として、alginate/Ca²⁺ゲルをコラーゲンゲル中に混入し、コラーゲンゲルの機械強度を向上した。微粒子を混合ゲル

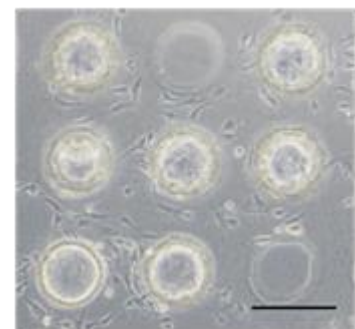


図 3 Collagen/alginate の混合ゲル中に細胞で覆われたヒドロゲル微粒子を均一に配置して培養 1 日後の写真. Bar: 200 μ m.

中に配置された後、クエン酸ナトリウム溶液を利用して Ca^{2+} を除去し、alginate/ Ca^{2+} ゲルを溶出することが可能であった。図3は得られた実験結果である。ヒドロゲル微粒子をコラーゲン-alginate/ Ca^{2+} 混合ゲル中に均一に配置することができた。今後、この方法を利用してヒドロゲル粒子間の距離を調節し、組織体間の細胞相互作用について詳しく調査する予定である。

キーワード：

組織工学，細胞間コミュニケーション，血管新生，組織体モデル

研究経費（H27年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
243,000円	392,000円	0円	0円	0円	635,000円

共同研究者等

(1)共同研究者（氏名・所属）

なし

(2)研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

なし

発表論文等（平成28年3月31日現在）

〔雑誌論文〕

1. Yang Liu, Shinji Sakai, Masahito Taya: Engineering tissues with a perfusable vessel-like network using endothelialized alginate hydrogel fiber and spheroid-enclosing microcapsules, Heliyon, 2, e00067, 2016.

〔学会発表〕

1. 劉楊, Natalia Oshima Nambu, 境慎司, 田谷正仁:水性二相分配系を用いたヒドロゲル微粒子の作製および細胞培養担体としての応用, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2015年11月9-10日.

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金等を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

該当しない

参考となるHP等

<http://mrl.es.osaka-u.ac.jp/labo/liu>