

動物細胞包括中空ヒドロゲルファイバーを用いた小口径血管様構造体の作製

武井 孝行 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, takei@cen.kagoshima-u.ac.jp)

岸原 尚也 (九州大学 大学院工学府)

吉田 昌弘 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp)

Fabrication of small tubular constructs using hollow alginate/gelatin hydrogel fibers

Takayuki Takei (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Naoya Kishihara (Graduate School of Engineering, Kyushu University, Japan)

Masahiro Yoshida (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

要約

再生医工学は皮膚等の組織の再生に関してはある一定の成果を挙げてきているが、肝臓に代表される代謝系臓器の再生に関しては未だ基礎研究の域を脱し得ていない。これは、組織内部の細胞にまで十分な酸素・栄養素を供給するために不可欠な血管網を組織内部に配置する手法が未だ開発段階にあるためである。口径の大きな血管（数ミリ以上）を人工的に作製する手法はこれまでに多く報告されているが、生体組織内部において緻密な血管網を作製するのに適した微細なサイズの血管を作製する手法は少ない。本研究では、中空構造を有する微細なアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーを用いた血管様構造体作製法の開発を目的とした。具体的にゲルファイバーは、液-液coflowing stream法を応用して作製した。その際、種々の操作因子を変化させることで、ファイバーの外径および中空径を制御可能であった。また、酸化アルギン酸でゼラチンを架橋することで、ゲルファイバーからのゼラチンの溶出を抑え、ファイバーに細胞接着性を付与できた。そのファイバーの中空部に血管内皮細胞を、ゲル部分に血管平滑筋細胞を包括することで、生体の微細な血管を模倣した血管様構造体を作製した。

キーワード

ヒドロゲル, ファイバー, 血管, 再生医療, アルギン酸

1. はじめに

近年の再生医工学分野の進歩はめざましく、特に皮膚や軟骨等の再生に関しては臨床適用も数多く行われている (Hansbrough et al., 1994)。しかし、肝臓に代表される代謝系臓器の再生に関しては未だ基礎研究の域を脱し得ていない。これは、組織内部の細胞にまで十分な酸素・栄養素を供給するために不可欠な血管網を組織内部に配置する手法が未だ開発段階にあるためである (Sakaguchi et al., 2013)。

血管を人工的に作製する手法はこれまでに多く報告されているが、それらの多くは口径が数ミリ以上の血管を対象としたものであり、生体組織内部において緻密な血管網を作製するのに適した微細なサイズの血管を作製する手法は少ない。これまでに我々のグループは、アルギン酸を主材料とした微細なヒドロゲルファイバーを用いて、それと同等の口径を有する血管様構造体を作製する手法を報告している (Sakai et al., 2008)。以下にその具体的な作製手順を示す。まず、境ら (Sakai et al., 2004) が報告した液体微粒化技術である液-液coflowing stream法を利用し、血管内皮細胞 (ECs) を包括した直径数百 μm のアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーを作製する。続いて、ファイバー表面に血管平滑筋細胞 (SMCs) を播種し、その流路表面を SMCs によって覆わせる。このファイバーをコラーゲンゲル内に包埋後、ファイバーのみを特異的に分解する。この処理により、ファイバーの部分のみを流路とすることができる。さらに、その表面を、あらかじめファイバー内に包括した ECs によって覆わせることで、SMCs 層を ECs が裏打ちした、生体血管と類似の構造を有する小口径

血管様構造体を作製することができる。上記で使用したゲルファイバーは柔軟性に優れているため、複雑に屈曲した形状の血管様構造体を作製することができ、生体と同様の緻密な血管網を作製するのに好適である。

本稿では、中空構造を有する微細なゲルファイバーを用いた小口径血管様構造体作製法を報告する。具体的な手順を以下に示す (図1)。まず、上記の境らのゲルファイバー作製法を応用し、中空部に ECs、ゲル部に SMCs を包括した中空状のアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーを作製する。

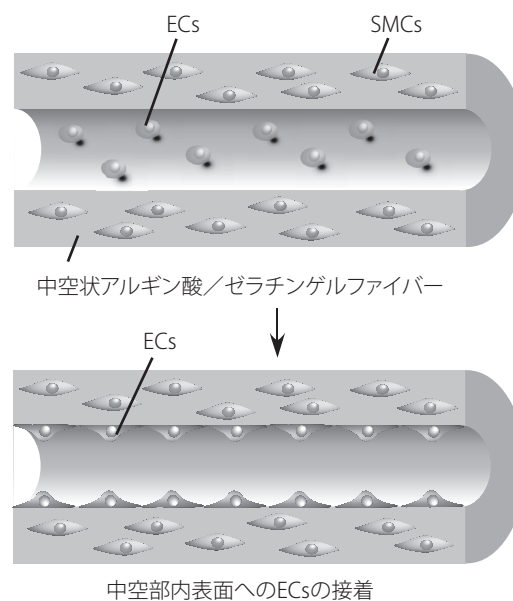


図1：本研究の小口径血管様構造体作製手順

続いて、ECsをファイバーの中空部表面に接着させ、その表面を覆わせる。本手法では従来法でのSMCsの播種操作を省くことができるため、血管様構造体作製プロセスの簡略化に繋がり、さらに構造体の強度を担うSMCs層の厚みの制御も容易になる。この中空ゲルファイバーは本系への適用のみならず神経等の移植用生体管状組織構築用の細胞培養担体としても利用できると考えられる。

2. 実験

2.1 試薬

アルギン酸ナトリウム (分子量：約7万) は株式会社キミカより提供されたものを使用した。ブタ皮膚由来ゼラチン (type A) はシグマアルドリッチ社より購入した。ポリビニルアルコール (PVA、重合度：1500～1800、鹸化度：>99%) は和光純薬工業株式会社より購入した。ウシ頸動脈由来血管内皮細胞 (BECs) およびp53ノックアウトマウス大動脈由来平滑筋細胞株 (LMAC01) はJCRB細胞バンクより購入した。

2.2 中空状アルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーの作製

中空ゲルファイバーの作製には同心3重円筒管を用いた (Takei et al., 2010)。円筒管の外筒 (内径: 5.5 mm) から 10 mM HEPES を含む 100 mM 塩化カルシウム水溶液 (pH : 7.4) を、中筒からカルシウムを含まない Krebs-Ringer HEPES (KRH) 緩衝液にアルギン酸ナトリウム (1% (w/v)) およびゼラチン (5% (w/v)) を溶解した水溶液 (pH : 7.4) を、内筒 (内径 : 290 μ m) から KRH 緩衝液に溶解した PVA 水溶液 (10% (w/v)) をそれぞれ同一方向に押し出すことで、中空ゲルファイバーを作製した。回収したファイバーを速やかに 4 $^{\circ}$ C の 10 mM HEPES を含む 100 mM 塩化カルシウム水溶液 (pH : 7.4) に浸し、ゼラチンを十分にゲル化させた。位相差顕微鏡を用いて、ファイバーの外径および中空径を測定した。

ECs および SMCs を包括したファイバーを作製する場合は、上記で使用した高分子水溶液に ECs および SMCs を加えたものを用いた。具体的には、LMAC01 を添加したアルギン酸ナトリウム/ゼラチン水溶液および BECs を加えた PVA 水溶液を用いて、上記と同様の手順で、中空部に BECs、ゲル部分に LMAC01 を固定化した中空状のアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーを作製した。

2.3 ゲルファイバーの細胞培養条件下での安定性評価

ゼラチンの架橋に使用した、分子内にアルデヒド基を有する酸化アルギン酸 (酸化率 : 35%) は我々の前報に従い調製した (Sakai et al., 2008)。その酸化アルギン酸をイーグル最小必須培地 (pH : 7.4) に 8% (w/v) 濃度で溶解し、その溶液内に中空ゲルファイバー (外径 : 約 1 mm、中空径 : 約 600 μ m) を浸し、室温で 3 ~ 6 時間静置した。ファイバーをリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、55 mM クエン酸三ナトリウム水溶液 (pH : 7.4) に 1 時間浸すことでファイバーからアルギン酸カルシウムゲルを除去した。その後、ファイバーを 10% (v/v) ウシ胎児血清を含むイーグル最小必須培地 (pH : 7.4) に浸し、37 $^{\circ}$ C で静置した。経時的に、ファイバーの直径を測定した。

2.4 アルギン酸カルシウム/ゼラチンゲル平板上での ECs の培養

アルギン酸カルシウム/ゼラチンゲル平板上での BECs の培養は以下の手順で行った。1% (w/v) アルギン酸ナトリウム/5% (w/v) ゼラチン水溶液 (pH : 7.4) を細胞培養用 96 穴プレート の各ウェルに加え、氷冷することでゼラチンをゲル化させた。続いて、そのゲル上に 4 $^{\circ}$ C の 10 mM HEPES/100 mM 塩化カルシウム水溶液 (pH : 7.4) を加えることで、アルギン酸を架橋した。そのゲルを、8% (w/v) 酸化アルギン酸を溶解したイーグル最小必須培地 (pH : 7.4) に 6 時間浸した。イーグル最小必須培地 (pH : 7.4) を用いてそのゲルを洗浄後、ゲル上に BECs を播種し (1.4 $\times 10^5$ cells/cm²)、20 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子を含むダルベッコ改変イーグル培地中で培養を行った。

3. 結果と考察

3.1 中空ゲルファイバーの外径および内径の制御

本研究の小口径血管様構造体作製法においては、調製した中空ゲルファイバーの中空径および外径が、それぞれ血管様構造体の中空径および外径に対応する。様々な用途に適したサイズの血管様構造体を作製できるように、まずは中空ゲルファイバーの外径および中空径の制御を行なった。なお、われわれの前報においても中空ゲルファイバーのサイズ制御を行っているが、そのファイバーはアルギン酸カルシウムゲルのみからなり、ゼラチンを含む場合のサイズ制御は行っていない。

まず、中筒先端内径 (535 μ m)、塩化カルシウム水溶液流速 (20 cm/s) および中筒先端におけるアルギン酸/ゼラチン水溶液と PVA 水溶液の流速 (10 cm/s) を固定し、core volume ratio (PVA 水溶液流量 / (アルギン酸/ゼラチン水溶液流量 + PVA 水溶液流量)) がファイバー外径および中空径に及ぼす影響を調査した。アルギン酸/ゼラチン水溶液および PVA 水溶液の合計流量を一定にしているため、core volume ratio を変化させてもファイバー外径はほぼ一定であった (図2)。一方、core volume ratio の増加とともに中空径は増加した。

続いて、塩化カルシウム水溶液流速 (20 cm/s)、中筒先端におけるアルギン酸/ゼラチン水溶液と PVA 水溶液の流速 (10 cm/s) および core volume ratio (0.2) を固定し、中筒先端内径 (290、535、770 μ m) を変化させた。中筒先端内径の増加とともにファイバーの外径は増加した (図3)。このとき、外径に対する中空径の割合はほぼ一定であった。以上の結果より、ファイバーの外径および中空径は中筒先端内径および core volume ratio を変化させることにより制御可能であることが示された。

3.2 ゲルファイバーの細胞培養条件下での安定性評価

本研究のゲルファイバーを使用して血管様構造体を作製するためには、中空部への ECs の接着に必要なゼラチンがファイバーから漏れ出すことを防ぐ必要がある。そのため、本研究では、酸化アルギン酸を用いてゼラチンを架橋することにした。図4に、酸化アルギン酸を使用して 3 ~ 6 時間架橋したアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーからアル

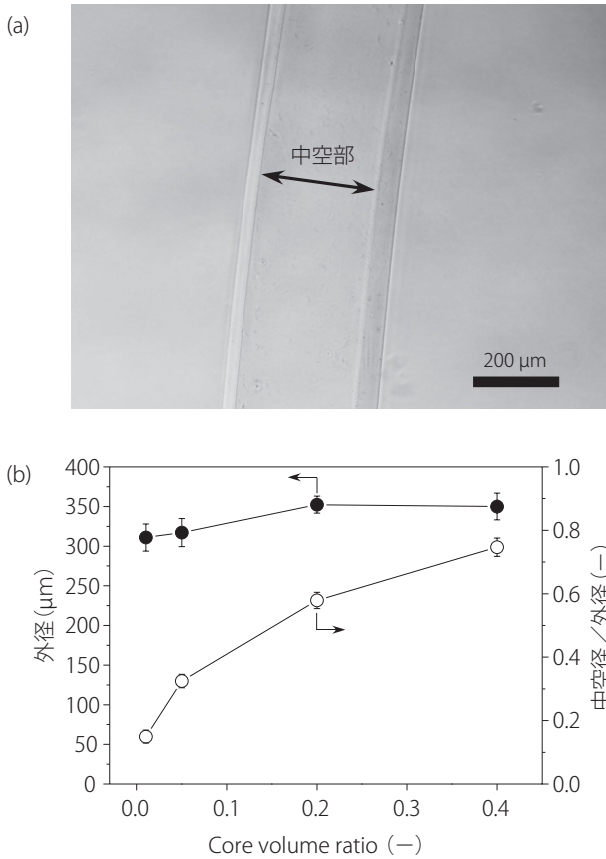


図2：(a) 中空状アルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバー、(b) core volume ratioとファイバー外径および中空径との関係

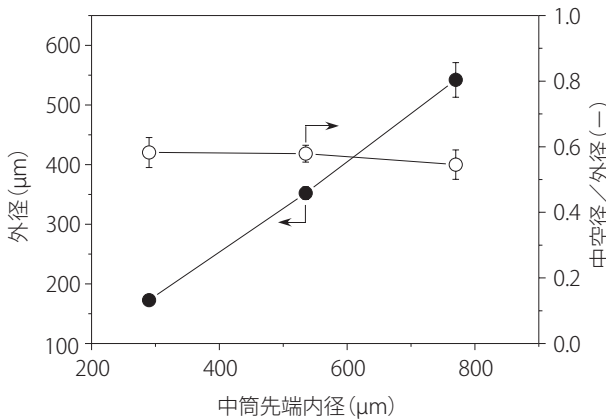


図3：中筒先端内径とファイバー外径および中空径との関係

ギン酸ゲルを除去後、そのファイバーを培地に浸した後のファイバーの直径比（培養1～14日目のファイバー外径/作製直後のファイバーの外径）を示す。架橋時間が3～5時間ではファイバーは膨潤し、ゼラチンの架橋が不十分であったが、6時間架橋したものはほとんど膨潤することはなかった。そこで酸化アルギン酸によるゼラチンの架橋時間は6時間で十分であると判断し、以降の架橋時間も6時間とした。

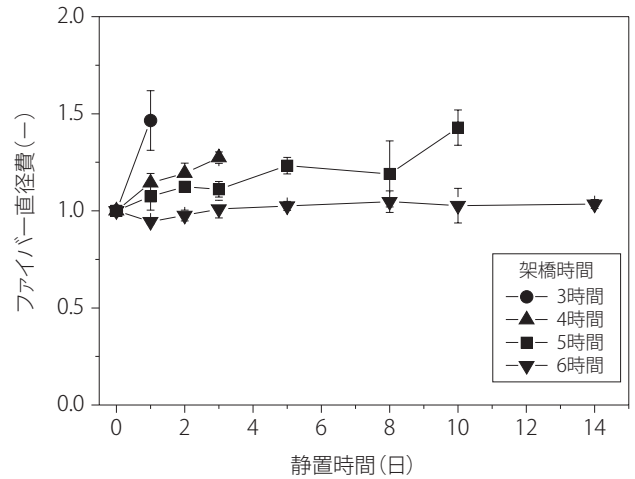


図4：酸化アルギン酸により架橋したゲルファイバーの直径比

3.3 アルギン酸カルシウム/ゼラチンゲル平板上での ECs の培養

次に、酸化アルギン酸を用いてゼラチンを6時間架橋したアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルにECsが接着できるか調査した。ここでは、平板状のゲルを使用した。図5 (a) および (b) に、BECs播種後4時間および3日後のゲル表面の写真を示す。BECsは播種後4時間目にはゲル上に接着・伸展し、3日後もその状態を保っていた。一方、酸化アルギン酸でゼラチンを架橋していないゲルでは、播種後4時間目にはBECsはそのゲル上に接着するものの、1日後には多くの細胞がゲルから剥がれた (図5 (c))。これは、培養期間中にゼラチンがファイバーから溶出したためであると考えられる。

3.4 ECs および SMCs 包括中空ゲルファイバーの作製と ECs の接着の確認

図6 (a) に、中空部にBECsを、ゲル部分にLMAC01を包括したファイバーの作製直後の写真を示す。2つの細胞を同時に包括した場合、BECsが中空部内表面に接着できるか確認が困難であるため、BECsのみを中空部に包括したファイバーを作製し、その確認を行なった。図6 (b) に示すとおり、曲面である中空部表面にもBECsは接着・伸展できることを確認した。以上より、本研究の中空ゲルファイバーは、ゲル部分にSMCsを固定化でき、かつ、その中空部表面をECsで覆わせることができることから、小口径血管様構造体のテンプレートとして有用である。

4. まとめ

本研究では、液-液coflowing stream法を応用することで作製できる中空状アルギン酸カルシウム/ゼラチンゲルファイバーの小口径血管様構造体のテンプレートとしての可能性を評価した。ファイバー作製時の種々の操作因子を変化させることで、ファイバーの外径および中空径を制御可能であった。また、酸化アルギン酸でゼラチンを架橋することで、ゲルファイバーからのゼラチンの溶出を抑えることができた。

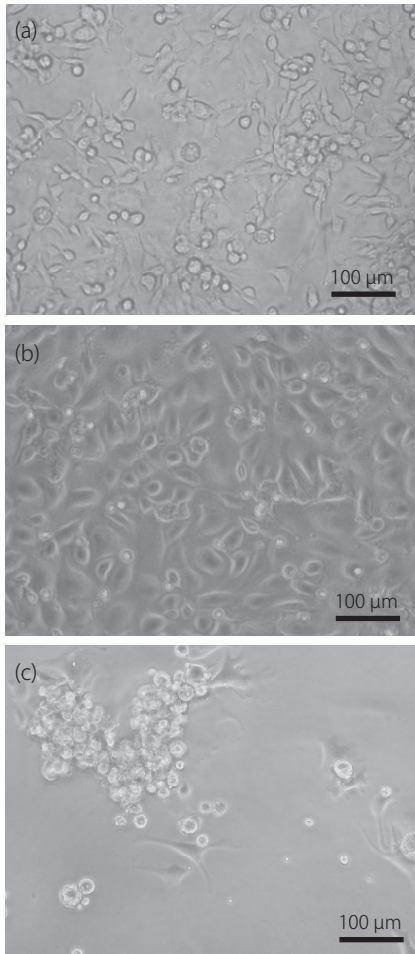


図5：(a) 酸化アルギン酸で6時間架橋したアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲル平板へのBECsの播種後4時間目でのゲル上のBECs、(b) (a)のファイバーへのBECsの播種後3日目のゲル上のBECs、(c) 酸化アルギン酸で架橋していないアルギン酸カルシウム/ゼラチンゲル平板へのBECsの播種後1日目のゲル上のBECs

そのファイバーの中空部にECsを、ゲル部分にSMCsを包括することで、血管様構造体を作製することができた。

謝辞

本研究の一部はJSPS科研費 若手研究 (B) 25820383の助成を受けたものです。

引用文献

- Hansbrough, J. F., Morgan, J., Greenleaf, G. and Underwood, J. (1994). Development of a temporary living skin replacement composed of human neonatal fibroblasts cultured in Bio-brane, a synthetic dressing material. *Surgery*, Vol. 115, No. 5, 633-644.
- Sakaguchi, K., Shimizu, T., Horaguchi, S., Sekine, H., Yamato, M., Umezu, M. and Okano, T. (2013). In vitro engineering of vascularized tissue surrogates. *Scientific Reports*, Vol. 3, 1316.
- Sakai, S., Kawabata, K., Ono, T., Ijima, H., and Kawakami, K. (2004).

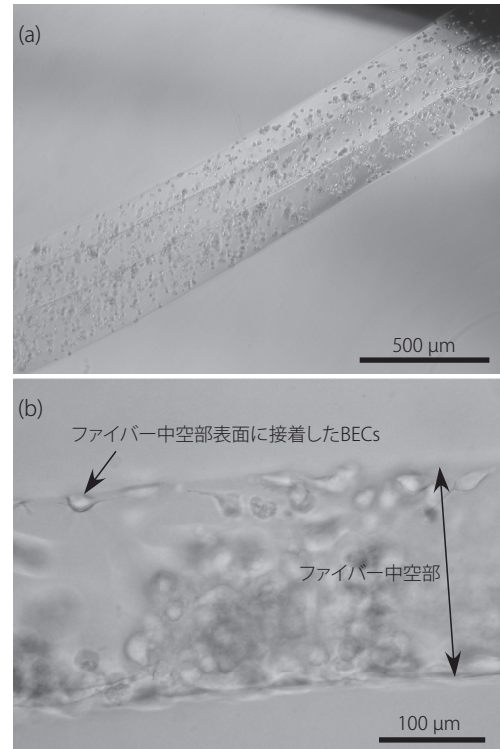


図6：(a) BECsおよびLMAC01を包括した中空ゲルファイバー、(b) BECsのみを中空部に包括したファイバーの培養4時間目でのファイバー中空部

Preparation of mammalian cell-enclosing subsieve-sized capsules (<100 μm) in a coflowing stream. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 86, No. 2, 168-173.

Sakai, S., Yamaguchi, S., Takei, T., and Kawakami, K. (2008). Oxidized alginate-crosslinked alginate/gelatin hydrogel fibers for fabricating tubular constructs with layered smooth muscle cells and endothelial cells in collagen gel. *Biomacromolecules*, Vol. 9, No. 7, 2036-2041.

Takei, T., Kishihara, N., Sakai, S., and Kawakami, K. (2010). Novel technique to control inner and outer diameter of calcium-alginate hydrogel hollow microfibers, and immobilization of mammalian cells. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 49, No. 1, 143-147.

(受稿：2014年11月21日 受理：2014年12月6日)