Patterning collagen for 3D cell structures

三次元状生体組織作製のためのコラーゲンパターニング

Shinjiro UMEZU and Tomohiko AOKI

Dept. of Mechanical Engineering, Tokai Univ. 4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292 Japan

TEL: x81-0463-58-1211(EX.4356) e-mail: 9aem1224@mail.tokai-u.jp

Hitoshi OHMORI

The Institute of Physical and Chemical Research(Riken), 2-1 Hirosawa, Wako Saitama 351-0198, Japan

TEL: x81-048-462-1111

(Received 9 January, 2013 Accepted 26 February, 2013)

The goal of this study is to fabricate 3-dimensional living tissue utilizing our ink-jet technology. Our inkjet technology has two merits; those were high resolution to print and ability to eject highly viscous liquid. In this paper, collagen was used as a scaffold material of the cells. Alginate gel is used as supporting scaffolds. We developed basic technology to fabricate 3-dimensional living tissue.

Keywords : Ink-jet, Cell, Collagen, Scaffold, Alginate

I. INTRODUCTION

近年、慢性的なドナー不足の深刻化や、難病の克服、新薬の開発などを目的としたミクロな領域でのナノバイオ分野での研究が注目を浴びている。ナノバイオ分野の研究において代表例である iPS 細胞といったヒトの皮膚細胞から万能細胞を作製させる技術確立した山中氏が先日ノーベル賞を受賞したが、iPS 細胞は、再生医療分野において、これらの問題解決の中核の技術になると考えられている。¹⁻⁵ 多くの細胞に分化できる上に患者本人の細胞から作製が可能であるという理由から難病のメカニズムを解明し、新薬を開発する研究が盛んに行われている。また、マクロな領域であるドナー不足の問題に関しては、現代医療では臓器移植なくしては、治療できない現状がある。しかしながら、ドナーが必要な患者に対してのドナー数が圧倒的に不足している。これを人工的に解決するためには、患者由来の細胞を用いて、立体の臓器を人工的に作製する技術の確立が必要であると考えている。これらよりミクロな領域でのナノバイオ分野の

研究成果をマクロな領域での臓器などを対象とした研究に応用するためにこれらをつなぐ中間の技術が必要不可欠である。そこで我々はこの再生医療分野における問題を機械工学の視点から着目し、この中間の技術の達成を目指している。具体的には、インクジェット技術を用いて、細胞やバイオマテリアルを任意の箇所にプリントするといったバイオプリントと呼ばれる分野の技術開発に取り組んでいる。国内の研究において、インクジェット技術を用いて三次元組織を作製するプロジェクトが富山大学中村氏をリーダーとして行われている。中村氏の研究はアルギン酸や細胞を三次元状にプリントし、チューブ等を作製している。⁶ しかし実際にスキャホールドとして一般的なのはコラーゲンやフィブリンである。また、3D の細胞組織を作製するプロジェクトとして大阪大学松崎氏をリーダーとした研究が行われている。松崎氏はコラーゲンやフィブリンといった細胞外マトリックスを用いて三次元状細胞組織を作製している。⁷ しかしながら、細胞外マトリックスを用いてはいるがこれらのプリントは行われていない。それはコラーゲンといったバイオマテリアルは高粘性な液体であり、これら高粘性な液体を高精度にプリントすることが困難であるといった背景が

SAS Award was given to this paper presented as Poster Presentation at the 2012 SAS Intelligent Symposium.

あるからである．一方で本研究室が保有している静電インクジェット方式では，高粘性な液体を高画質にプリントすることが可能となっているため，狙った箇所に細胞や高粘性なバイオマテリアルを配置させることが可能である．⁸したがって我々は高粘性な液体も同様にプリントし，細胞だけでなくコラーゲンも狙った箇所にパターンニングが可能となっている．

三次元状細胞組織の作製にあたり，実際の細胞組織は足場となるスキャホールドが不可欠である．⁹⁻¹²現在，細胞の足場となるスキャホールドの作製に関する研究は非常に多くなされており，エレクトロスピニング法を用いてのポリマーなどの合成高分子材料やコラーゲンといった天然高分子材料などがスキャホールドの材料として広く用いられている．¹³⁻¹⁵また，細胞のスキャホールド材の応用例として，臓器や軟骨，神経や靱帯といった損傷からの回復を助ける再生医療の研究も多く行われている．¹⁶⁻²²また，バイオマテリアルであるアルギン酸ゲルの剛性や親和性に着目した生体への応用に向けた研究も盛んに行われており，アルギン酸ゲルを用いた軟骨再生の研究²³⁻²⁶やアルギン酸カプセル²⁷を用いたアルギン酸ビーズでの細胞培養，²⁸⁻³⁰ビーズ内に薬を閉じ込め体内に搬送するといったドラッグデリバリー³¹などの研究が盛んに行われている．これらより生体親和性が高く剛性の高いアルギン酸ゲルを使用することが三次元状デバイスを形成させるために好ましいと考えられる．

本研究では，三次元状の生体組織作製のために細胞外マトリックスであるコラーゲンに着目し，アルギン酸ゲル上にコラーゲンをプリントすることで，細胞の接着性・増殖性を向上させることが出来ると考えた．アルギン酸ゲル上に直接細胞をプリントし，細胞の接着性および成長の様子を観察したところ，接着の確認は出来たが人工的に細胞組織を作製する上での細胞の増殖性としては不十分であった．その理由の一つとして細胞の足場となるスキャホールドが十分に存在していなかったと考えられる．そこで，体内にも存在する細胞外マトリックスであるコラーゲンをアルギン酸ゲル上にプリントすることで，細胞の接着性・増殖性を向上させたので報告する．

II. METHODS AND MATERIALS

II-A. Experimental equipment

本研究では，インクジェット技術である静電インクジェット方式を用いて細胞やバイオマテリアルをプリントし，三次元状の細胞組織を作製することを目的とする．Figure 1 に示すような実験装置図を構成した．サンエイテック社製注射器シリンジ(10ml)の先端にサンエイテッ

ク社製の導電性キャピラリーチューブ(I.D. 0.33mm)を取り付けた．シリンジに導電性の液体を満たしたものを液体針電極とし，対向電極に対して垂直に設置する．パターンニングを行う対象物は対向電極上に設置する．シリンジ内部に高電圧を印加することでノズル先端部と対向電極間に静電力が発生し，ノズル先端部の液体がテラーコーンと呼ばれる三角錐状の形状になる．その際にテラーコーンの先端から液滴がちぎれるように吐出することでノズル径よりもはるかに細いプリントが可能である．またシリンジを覆うように保冷剤を設置し，温度調整を行うことで安定した吐出を可能にした．高電圧電源はグリーンテクノ社製の GS50(電圧範囲:0~50kV)を使用した．ノズル先端からシャーレ上の液体表面といった対象物との電極間距離(gap)や印加電圧などの条件を変化させることでパターンニングをコントロールする．

Fig. 1. Experimental set-up (1: nozzle, 2: high voltage apply, 3: syringe covered with refrigerant, 4: dish, 5: xyz linear stage) .

II-B. Patterning collagen for 3D cell structures

アルギン酸ゲル上に細胞を配置させるにあたり，細胞の足場となるスキャホールドを作製する必要がある．そこで，細胞外マトリックスであるコラーゲンをスキャホールドとして用いた．コラーゲンのパターンニングにあたり，コラーゲンにおける基礎特性を調べた．使用したコラーゲンは新田ゼラチン社製の Cellmatrix Type1-A 培養キットを用いて，コラーゲン，濃縮培地，再構成用緩衝液を 7:2:1 の割合で混合させ使用した．コラーゲンの温度は 5℃に保冷し，pH 値は 7.0 である．この時の粘度は約 20 mPa・s であった．また，使用した細胞はウシの頸動脈血管内皮細胞(HH 細胞)である．アルギン酸ゲル上に細胞を配置するにあたり，塩化カルシウム 10%水溶液をシャーレ上に浸し，アルギン酸ナトリウム 1%水溶液をノズル先端から吐出する．これによって厚さ 5mm のアルギン酸ゲルを作製した．作製したアルギン酸ゲル上に直接 HH 細胞をプリントし，観察した．またアルギン酸

ゲル上にコラーゲンをパターニングし、その上に細胞を配置させてアルギン酸ゲル上における細胞の接着性・増殖性を比較した。これらを行い、アルギン酸ゲル上における細胞の接着性・増殖性の向上を確認した。

III. RESULTS

コラーゲンをスキヤホールドとしてパターニングするにあたり、コラーゲンにおける基礎特性を明らかにした。コラーゲンにおける各印加電圧と電極間距離を変化させた時の吐出状態の領域を Fig.2 に示す。電圧を印加し、Drop mode の領域に達すると液滴状に吐出し始め、さらに電圧を印加し、Droplet mode の領域となるとさらに小さな液滴が吐出される。印加電圧のさらに高い領域ではスプレー状の吐出をする。Droplet mode は、印加電圧の範囲が狭く、Spray mode での吐出は比較的範囲が広いといった特性がわかった。Droplet mode においてラインを描いた際の印加電圧とライン幅の関係を Fig.3 に示す。

Fig. 2. Mode of droplet formation (Collagen is ejected.).

Fig. 3. Line width when the applied voltage is changed in case that gap is changed.

Figure 3 に示すように Droplet mode の領域において、ライン幅は印加電圧を上げることでライン幅は細くなっている。これは、印加電圧が高くなるにつれてコラーゲンが引き寄せられる力が強くなり、ノズル先端から液体がより細かくちぎれるようになったことが考えられる。

これらの特性を明らかにしたうえで、アルギン酸ゲル上にコラーゲンをプリントする。Figure 4 に示すようにア

Fig. 4. Schematic views.

Fig. 5. Photographs of HH cells on alginate gel.

Fig. 6. Photographs of printed HH cells those are covered with collagen on the alginate gel.

ルギン酸ゲル上に細胞を配置させる上で、コラーゲンをプリントすることでより細胞の接着性・増殖性を向上させることが可能であると考えた。そこでアルギン酸ゲル上に直接細胞をプリントし、細胞の接着の観察をした写真を Fig.5 に示す。細胞が接着していることを確認したが、増殖性に関しては不十分であった。次にアルギン酸ゲル上にコラーゲンをスキヤホールドとしてプリントし、細胞を同様に観察した結果を Fig.6 に示す。コラーゲン

をパターンニングすることで細胞は接着し、しっかりと増殖しているのが確認出来る。これらの結果は、アルギン酸ゲル上の表面がスキャホールドとして好ましくない足場であったと考えられる。そこで細胞外マトリックスであるコラーゲンをアルギン酸ゲル上にパターンニングすることで表面が細胞の接着に好ましい足場となったために細胞の接着性や増殖性が大きく向上したものと考えられる。これは人工的に三次元状生体組織を作製するための作製時間の短縮につながり、非常に重要であるといえる。

IV. CONCLUSION

三次元状生体組織作製において、アルギン酸ゲル上にコラーゲンをスキャホールドとしてパターンニングすることで細胞の接着性・増殖性を向上することが出来た。これらの結果より、コラーゲンをを用いてアルギン酸ゲルを骨組みとした三次元生体組織の作製が期待出来る。

ACKNOWLEDGEMENTS

本研究では、科研費若手(B)の助成を受けて推進されました。付記して、謝意を表します。

REFERENCES

- ¹ S. Yamanaka, *Cell*, 137, pp.13-17 (2009).
- ² Y. Yoshida, S. Yamanaka, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50, pp.327-332 (2011).
- ³ K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell*, 126, pp.663-676 (2006).
- ⁴ D. Taura, M. Noguchi, M. Sone, K. Hosoda, E. Mori, Y. Okada, K. Takahashi, K. Homma, N. Oyamada, M. Inuzuka, T. Sonoyama, K. Ebihara, N. Tamura, H. Itoh, H. Suemori, N. Nakatsuji, H. Okano, S. Yamanaka, K. Nakao, *FEBS Letters*, 583, pp.1029-1033 (2009).
- ⁵ N. Yokoo, S. Baba, S. Kaichi, A. Niwa, T. Mima, H. Doi, S. Yamanaka, T. Nakahata, T. Heike, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387, pp.482-488 (2009).
- ⁶ M. Nakamura, M. Mie, H. Mihara, M. Nakamura, Eiry Kobatake, *Biomaterials*, 29, pp.2977-2986 (2008).
- ⁷ P. Chetprayoon, K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Acta Biomaterialia*, 9, pp.4698-4706 (2013).
- ⁸ S. Umezu, T. Kitajima, H. Ohmori, Y. Ito, *Sensors and Actuators A: Physical*, 166-2 pp.251-255, (2011).
- ⁹ D. Dado, S. Levenberg, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, pp.656-664 (2009).
- ¹⁰ F. Causa, P. A. Netti, L. Ambrosio, *Biomaterials*, 28, pp.5093-5099 (2007).
- ¹¹ J. Wang, F. Jia, T. Gilbert, S. Woo, *Journal of Biomechanics*, 36, pp.97-102 (2003).
- ¹² S. Cai, J. Xi, *Computer-Aided Design*, 40, pp.1040-1050 (2008).
- ¹³ M. Horst, S. Madduri, V. Milleret, T. Sulser, R. Gobet, D. Eberli, *Biomaterials*, 34, pp.1537-1545 (2013).
- ¹⁴ K. Chatterjee, L. Sun, L. Chow, M. Young, C. Simon Jr, *Biomaterials*, 32, pp.1361-1369 (2011).
- ¹⁵ S. Joughehdoust, A. Behnamghader, M. Imani, M. Daliri, A. Hashemi Doulabi, E. Jabbari, *Ceramics International*, 39, pp.209-218 (2013).
- ¹⁶ C. Huang, R. Chen, Q. Ke, Y. Morsi, K. Zhang, X. Mo, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82, pp.307-315 (2011).
- ¹⁷ C. Shi, Q. Li, Y. Zhao, W. Chen, B. Chen, Z. Xiao, H. Lin, L. Nie, D. Wang, J. Dai, *Biomaterials*, 32, pp.2508-2515 (2011).
- ¹⁸ B. Kanungo, E. Silva, K. Van Vliet, L. Gibson, *Acta Biomaterialia*, 4, 490-503 (2008).
- ¹⁹ S. Park, E. Gil, H. Shi, H. Kim, K. Lee, D. Kaplan, *Biomaterials*, 31, pp.6162-6172 (2010).
- ²⁰ N. Nagai, S. Yunoki, T. Suzuki, M. Sakata, K. Tajima, M. Munekata, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, pp.389-394 (2004).
- ²¹ B. Kanungo, L. Gibson, *Acta Biomaterialia*, 6, pp.344-353 (2010).
- ²² B. Kim, Y. Kang, J. Phi, Y. Kim, D. Hwang, J. Choi, S. Ryu, A. Elastal, S. Paek, K. Wang, S. Lee, S. Kim, B. Yoon, *Cytotherapy*, 12, pp.841-845 (2010).
- ²³ Y. Kuo, C. Chung, *Biomaterials*, 33, pp.8955-8966 (2012).
- ²⁴ Y. Lee, S. Polio, W. Lee, G. Dai, L. Menon, R. Carroll, S. Yoo, *Experimental Neurology*, 223, pp.645-652 (2010).
- ²⁵ T. Re'em, O. Tsur-Gang, S. Cohen, *Biomaterials*, 31, pp.6746-6755 (2010).
- ²⁶ R. Rezende, M. Rezende, P. Bártolo, A. Mendes, R. Filho, *Computer Aided Chemical Engineering*, 27, pp.1935-1940 (2009).

- ²⁷J. Wikström, M. Elomaa, H. Syväjärvi, J. Kuokkanen, M. Yliperttula, P. Honkakoski, A. Urtti, *Biomaterials*, 29, pp.869-876 (2008).
- ²⁸G. Klinkenberg, K. Lystad, D. Levine, N. Dyrset, *Journal of Dairy Science*, 84, pp.1118-1127 (2001).
- ²⁹I. Constantinidis, I. Rask, R. Long Jr, A. Sambanis, *Biomaterials*, 20, pp.2019-2027 (1999).
- ³⁰S. Huang, M. Wu, G. Lee, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147, pp.755-764 (2010).
- ³¹K. Koyama, M. Seki, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, pp.111-118 (2004).