

細胞外マトリクスのナノファイバー構造に着目した 3次元組織ビルドアップ

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

概 要	
	生体中の組織構造を効率的に修復させるには、従来型の均質な材料とは異なった、配向性の高い足場材料が有用である。そこで、細胞周辺の微小環境を構成する細胞外マトリクス(ECM)がナノメートルサイズの繊維で構成されていることに着目し、ナノファイバーの足場材料への検討をおこなった。エレクトロスピンニング法を用いて、ランダムなファイバーと配向性を有したナノファイバー基材を作製し、この上でのマウス筋芽細胞(C2C12)を培養したところ、細胞は足場に沿って自発的に伸展・配向した。次に、レーザー加工機で加工した基材上に、エレクトロスピンニング法を用いて配向性を有したファイバー層を作製し、これらを積層することで、三次元培養を可能とした足場基材を構築した。その結果、一定の方向に配向した組織が3次元的な広がりをもって構築された。
関連キーワード	ナノファイバー, 再生医療, 細胞外マトリクス, 三次元組織構築, 生体材料

研究の背景および目的

生体組織中では、異方性を有した ECM の幾何構造のもとで細胞の形状が変化し、細胞形状が細胞機能に影響を与えることが知られている。これまで、生体修復材料にはハイドロゲル等の均質な高分子材料が用いられてきた。しかし、筋繊維に見られるように、生体組織では、細胞同士が規則的に配列した異方性の高い構造を有し、複雑な組織を構成している。したがって、生体中の組織構造を効率的に修復させるには、従来型の均質な材料とは異なった、異方性の高い足場材料が有用であると考えられる。

なかでも、細胞同士の微小環境を構築する細胞外マトリクス(ECM)がナノメートルサイズの繊維で構成されていることから、ナノファイバーに期待が集まっている。これまでもナノファイバー基材上での細胞機能の向上について報告例がある

ものの、それらではシートやマット状の薄い不織布が用いられている。そのため、立体的な組織構造を模倣するためには厚みのある構造体を用いる必要がある。このようにして作製された三次元的な材料が細胞増殖・分化の良好な足場として強く望まれている。

そこでまず、エレクトロスピンニング法を用いて作製したナノファイバーを用いて、マウス筋芽細胞(C2C12)の伸展および増殖に与える影響を評価した。

次に、レーザー加工機で加工した基材上に、エレクトロスピンニング法を用いて配向性を有したファイバー層を作製し、これらを積層することで、三次元培養を可能とした足場基材を構築した。本報告では、細胞の生存率及び形状を評価した結果について述べる。

研究の内容および成果

(1) 配向性基材上での筋芽細胞の培養

ガラス基板にあらかじめポリウレタン(PU)をスピンコートし、ここにエレクトロスピンニング法を用いて、ファイバーを紡糸した。配向性を有したファイバーはコレクタを高速で回転(1,500 rpm)させることにより作製した。

作製した基板を酸素プラズマ処理したのち、C2C12細胞を播種、培養した。播種後48h、72h後の細胞数を計測し、倍加時間を算出した。また播種48h後に免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

その結果、ファイバーがある場合、細胞が細長く伸長している様子が見られた(図1)。ファイバーがあることによって、細胞の接着できる領域に広がりをもたらされ、細胞が伸長しやすくなったものと考えられる。また、ディッシュ上で培養した場合よりもファイバー上で培養を行った場合、増殖が早い傾向が得られた。しかし、配向性の異なるファイバーにおいては、増殖速度に有意差は見られなかった(図2)。

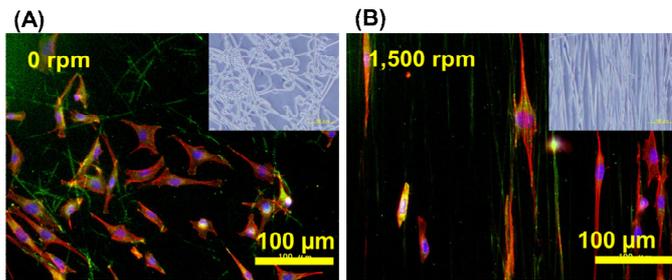


図1 無配向ナノファイバー(A)および配向ナノファイバー(B)上で培養した細胞の形態。赤:F-Actin, 緑:ファイバー, 青:核。

(2) 三次元足場基材上での培養

レーザー加工機を用いて、PMMA 板を加工し、細胞培養用の基材を作製した。治具上の棒に引っかけて、足場基材を固定した。

作製した PMMA 基材上に PCL 溶液を用い、エレクトロスピンニング法により、ファイバーを担持した足場基材を作製した。配向性を有するファイバーを作製するため、コレクタを高速 (900 rpm) で回転させた。作製したナノファイバー基材に酸素プラズマ処理を施した後、マウス由来筋芽細胞 C2C12 を播種した。播種 2 時間後、細胞が接着したファイバー足場基材を治具にセットし培養を行った。培養 48 時間後、ファイバー足場基材 2 層を直交する方向に積層し、培養を行った。培養後、免疫染色し観察を行った。

その結果を図 3 に示す。これらの画像は同一視野で高さの異なる点をそれぞれ撮影したものである。それぞれファイバー方向に細胞が伸長し、生

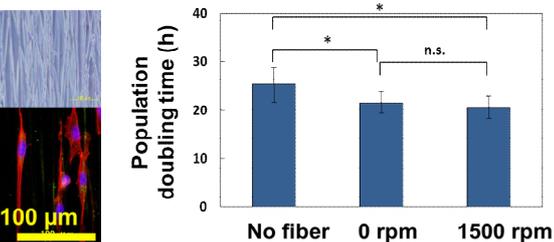


図2 ナノファイバー上で培養した細胞の倍加時間。

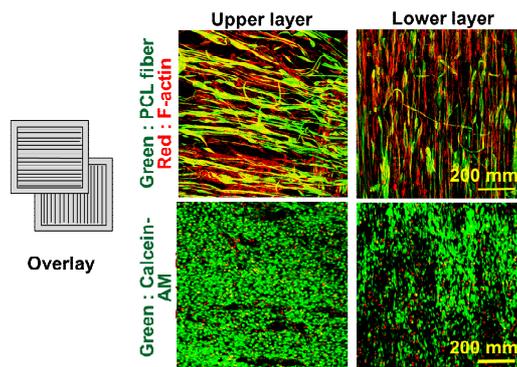


図3 積層ファイバー基材を用いた厚みのある培養。

存している細胞が多い様子が見てとれる。

本結果から、厚みのある配向性を有する基材の作製に成功し、自発的に細胞が配向形状をとったことから、今後はこの基材を用いて細胞分化等のさらなる検討を行う。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な学会発表」

荻原 裕佑,末 信一郎,藤田 聡,シングルナノファイバーを用いた細胞浸潤の解析,第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会,金沢,2012.12.

久野 大地,吉村 英晃,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,筋芽細胞の増殖に対するナノファイバーの配向性の影響の解析 第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会,金沢,2012.12.

吉村 英晃,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,エレクトロスピンニング法で作製したナノファイバーの積層による三次元培養法の構築,第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会,金沢,2012.12.

吉村 英晃,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,三次元培養を可能とした積層技術の開発,第 6 1 回高分子学会北陸支部研究発表会,福井,2012.11.

荻原 裕佑,末 信一郎,藤田 聡,シングルナノファイバー上での癌細胞の浸潤現象の解析,平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会,福井,2012.9.

吉村 英晃,鈴木 智也,末 信一郎,藤田 聡,配向性を有したナノファイバー上での筋芽細胞の増殖および分化,平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会,2012.9.

S.Fujita,H.Yoshimura,H.Shimizu,S.Suye,Cell behavior on nanofiber scaffold with different geometry,3rd TERMIS World Congress 2012,Viena,2012.9.

Y.Ogihara,S.Suye,S.Fujita,Invasion of a cancer cell on a single nanofiber embedded in collagen gel,2012 International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology,Tainan,2012.9.

吉村 英晃,鈴木 智也,坂元 博昭,末 信一郎,藤田 聡,ナノファイバー上で培養した筋芽細胞の分化挙動の解析,第 43 回繊維学会夏季セミナー,奈良,2012.8. (優秀ポスター賞受賞)

藤田 聡,吉村 英晃,清水 遥絵,末 信一郎,幾何構造の異なるナノファイバー基材上で培養した間葉系幹細胞の挙動,第 23 回プラスチック成形加工学会年次大会,東京,2012.6.