

繊維性 scaffold 内における毛細血管網構築に関する研究

Study on fabrication of capillary networks within a fibrous scaffold

○ 釜島 黎 (東京電機大) 幡多徳彦 (東京電機大) 野口展士 (東京電機大)

荒船龍彦 (東京電機大) 福井康裕 (東京電機大) 本間章彦 (東京電機大)

Rei KAMASHIMA, Tokyo Denki University
Hiroo NOGUCHI, Tokyo Denki University
Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University

Norihiko HATA, Tokyo Denki University
Tatsuhiko ARAFUNE, Tokyo Denki University
Akihiko HOMMA, Tokyo Denki University

Abstract: Studies on capillary network culture techniques by in-vitro are conducted flourishingly. However, the capillary construction is required techniques of high efficiency culture and any molding. In this study, the capillary construction system has been developed by using a property the blood vessel endothelium cells in three dimensional fibrous scaffold was formed to a capillary state. The three-dimensional culture system was constructed by putting scaffold artificial blood vessel with two pieces of scaffold sheet. The cells seeded at 1.0×10^5 cells/cm² in developed system with static and perfusion was cultured for 21 days. As results, the cells cultured by static and perfusion formed capillaries in the scaffold sheet. In the developed system with perfusion, the blood vessel average length per unit area at the twelfth day was extended to 0.97 mm⁻¹, which improved 62 % than static culture. In conclusion, it was suggested that this system could be build the culture capillary.

Key Words: Fibrous Scaffold, Electro Spinning, Artificial Capillary, Capillary Network

1. 背景及び目的

現在再生医療の発展に伴い、in-vitroでの培養組織の構築が盛んに行われている。一般的に行われているin-vitroでの毛細血管網の構築方法は、心筋-血管内皮共培養細胞シートを積層させ、流路を設けたコラーゲンゲル上で灌流培養を行うことで、組織及び毛細血管網を構築する方法である¹⁾。しかし、毛細血管網構築までに時間を要する・細胞シートを任意形状に構築出来ないという問題点があり、より効率的に毛細血管網を構築する方法が求められている。本研究では、エレクトロスピンニング法(ES法)によって構築した任意形状に構築可能な繊維性 scaffold を立体的に構築し、scaffold内へ血管内皮細胞を播種・培養することで効率良く毛細血管網を構築するシステムを開発し、そのシステムによって培養毛細血管網を構築・評価を行うことを目的とした。

2. 培養毛細血管網作製実験

2-1 エレクトロスピンニング法(ES法)

ES法とは、細胞培養を行う上で適した高分子材料を有機溶媒で溶解することで溶液状にし、その高分子溶液に高電圧をかけることで溶液を噴射し、帯電したプレートに吹き付け scaffold を作製する方法の一つである。この方法によって作製された scaffold は繊維性であり、非常に細い繊維径と、非常に大きな表面積を持つのが特徴である。また、長時間スピニングを行うことで人工血管の作製や3次元構造を有する scaffold を作製することが可能である。ES法の概要をFig.1に示す。

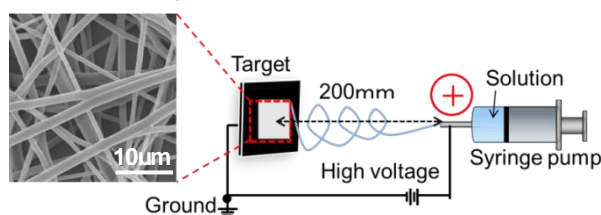
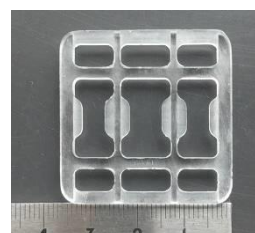


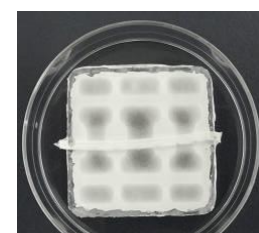
Fig.1 Diagram of electrospinning method

2-2 3次元構造 scaffold プレートでの培養実験方法

繊維性 scaffold を3次的に構築し、かつ細胞培養及び観察を行うためアクリル板を加工し、培養プレートを作製した。作製したプレートをFig.2に示す。このプレート上に scaffold を堆積させ、小口径人工血管と組み合わせて3次元培養構造を構築した。繊維性 scaffold および小口径人工血管は、セグメント化ポリウレタンを用いてES法にて作製した。作製した培養プレートに10[min]間スピニングを行い、壁面に0.7[mm]穴を開けた人工血管を設置した。最後に人工血管を設置した培養プレートに5[min]間スピニングを行い、人工血管付きの3次元繊維性 scaffold を作製した。作製した3次元繊維性 scaffold プレートにマウス由来血管内皮腫様細胞(RCB1994UV♀2)を播種濃度 $X_0 = 1.0 \times 10^5$ [cells/cm²]で播種し、21日間の静置・灌流培養及び3日ごとの画像撮影を行った。



(a) Acrylics plate



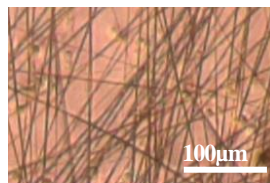
(b) Acrylics plate with scaffold

Fig.2 Cell culture plate

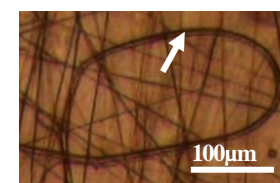
3. 静置培養結果及び考察

3-1 毛細管の観察画像

位相差顕微鏡での観察結果をFig.3に示す。



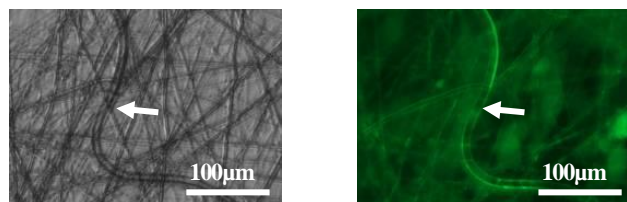
(a) Seeded cells on the scaffold



(b) Cultured capillary at 21days

Fig.3 Phase microscope image

撮影画像より、培養開始から21日目までに、scaffoldとは径の異なる毛細管が構築されていることが確認され、培養毛細管であると示唆された。更にこの培養毛細管が細胞が形態を変化させたものであるかを確認するため、細胞質のみを染めるCalcein-AM蛍光染色試薬(タカラバイオ社)を用いて、蛍光顕微鏡の励起波長500[nm]で観察を行った。その結果をFig.4に示す。



(a) Bright-field image (b) Fluorescence staining image

Fig.4 Fluorescence staining of capillary

この結果より、染色後の画像において培養毛細管の輪郭に沿って蛍光していることが確認された。これより構築された培養毛細管は、細胞が形態を変化させたものであると示唆された。

3-2 培養毛細管の単位面積当たりの管長評価

構築された培養毛細管の評価を行うため、位相差顕微鏡で撮影した画像より培養毛細管を検出し、解析を行った。培養開始から培養毛細管の管長を計測し、単位面積あたりの管長に対する頻度分布の経時変化をFig.5に示す。

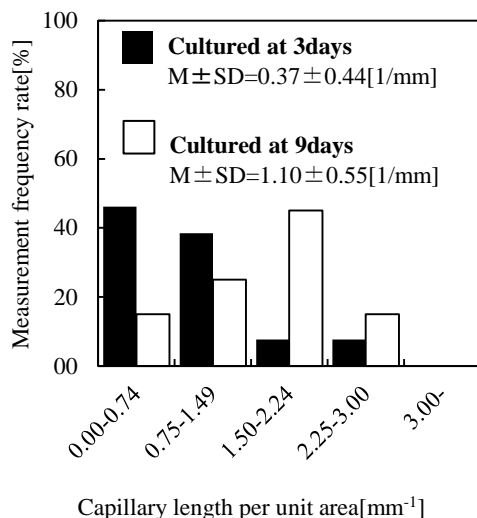


Fig.5 Frequency Distribution of capillary length per unit area

Fig.5より、培養開始から3日目の単位面積あたりの管長は、 $1.50[\text{mm}^{-1}]$ 未満の範囲に多く分布していることが分かる。これに比べて9日目の場合、 $1.50-2.24[\text{mm}^{-1}]$ の範囲に多く分布することが確認された。このことから、培養日数の経過に伴って、毛細管が伸長していることが明らかとなった。また、培養毛細管を長期的に培養することで伸長させ、細胞へ効率よく栄養を供給する毛細管網として使用出来る可能性が示唆された。

4. 灌流培養実験

静置培養時に用いた3次元繊維性 scaffold プレーットの人工血管を

タイゴンチューブと接続し、人工血管の壁面に穿孔した穴より培地を流出させ、ローラポンプを用いて灌流培養を行った。Fig.6に灌流培養システムを示す。また、プレート上部を流の少ない培地滞留領域、プレート下部を流の多い培地流出領域とし、それぞれの領域とで構築された培養毛細管平均管長の比較を行った。その結果をFig.7に示す。

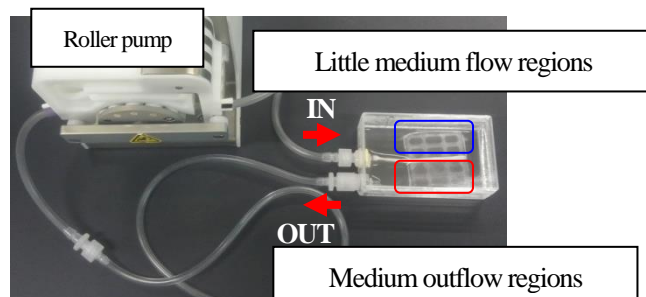


Fig.6 Perfusion culture system

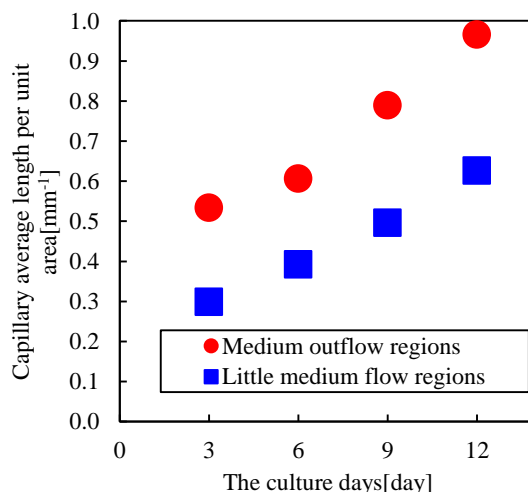


Fig.7 Capillary average length per unit area

Fig.7より、培養開始から12日目までの単位面積あたりの平均管長を、培地滞留領域と培地流出領域で比較すると、培地流出領域において12日目では $0.97[\text{mm}^{-1}]$ を示し、全体として62%伸長していることが確認された。このことから、灌流培養を行うことで、より効率的に培養毛細管を構築可能であると示唆された。

5. まとめ

本実験では3次元繊維性 scaffold 内への毛細管網構築システムの開発と、そのシステムを用いて構築した培養毛細管の評価を行った。その結果、開発した毛細管網構築システムを用いて培養毛細管を構築することが可能となった。また、灌流培養を行うことで、滞留領域より流出領域においてより scaffold 内部への培養毛細管を構築することが可能であると示唆された。

6. 参考文献

- (1) Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Katsuhisa Sakaguchi, Izumi Dobashi, Masanaori Wada, Masayuki Yamato, Eiji Kobayashi, Mituo Umezu, Teruo Okano
Nature Communications(2013) DOI10.1038/ncomms2406