

ウムによって生/死細胞染色を行った。

#### 5) 細胞接着性の観察

1日おきに観察を行った。(培地交換は24 hごとに行い、PBSで1回washしたのち、EBM-1を2 mlずつ加えた)

### B8.2.3 CMC-Gelatinハイドロゲルの血管新生評価

#### 1) CMC-CHO, Gelatin-ADH溶液の調整

凍結乾燥したCMC-CHO、Gelatin-ADHをPBSでCMC-CHO 4.0 wt%、Gelatin-ADH 5.0 wt%となるように希釈した。

#### 2) CMC-Gelatinハイドロゲル内への包埋

GFP-HUVECを $1 \times 10^5$  cells/mlで混合したGelatin-ADH溶液とCMC-CHO溶液をダブルシリンジを用いて混合することでゲル化させた。

#### 3) 細胞増殖の観察

2日おきに観察を行った。(培地交換は24 hごとに行い、PBSで1回washしたのち、EBM-1を2 mlずつ加えた)

#### 4) 組織の固定

培養7日目にサンプルの培地を捨て、基盤をPBS-で洗浄し、2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒドPBS-溶液中に室温で1時間浸漬させた後、PBS-で洗浄した。

### B8.2.4 電気化学を用いた細胞転写 (Fig. 8)

#### 1) 基板洗浄

ガラス基板を25%アンモニア水:30%過酸化水素水:純水=1:1:4の沸騰水溶液に5分間浸漬させ、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

#### 2) Au/Cr層のスパッタリング

Au/Cr層のスパッタリングを行った。(出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCr:1分間、Au:2分間)

#### 3) 金表面へのRGDペプチドの修飾

RGDペプチドを表面に修飾するために、純水を用いて1.0 mMに希釈したRGDペプチド溶液に、予めアセトンで洗浄した金ガラス基板をそれぞれ一晩浸漬させた後、純水で洗浄した。更にクリーンベンチ内で70%エタノール内に5分間浸漬を二回行い、滅菌した純水でよくすすいだ。

#### 4) 細胞播種

$5 \times 10^5$  cells/mlの細胞懸濁液1 mlを金ガラス基板上に垂らし、インキュベータ内で1日間培養を行った。

#### 5) ハイドロゲルの作製

培養後、基板上的細胞混濁液を吸い取り、すぐにPDMSで作った囲いをガラス基板にセットし、ダブルシリンジを用いて、HA-CHO 2 wt%、Gelatin-ADH 5 wt%の化学架橋ハイドロゲルを作製した。

#### 6) 負電位印加

対極に白金、参照極に銀-塩化銀電極を接続し、この金ガラス基板にポテンシオスタットを用いて-1.0 Vの負電位を5分間印加後、ゲルをゆっくり金ガラス基板からはがし、 $\phi 35$  mm dishに培養液を加え培養した。

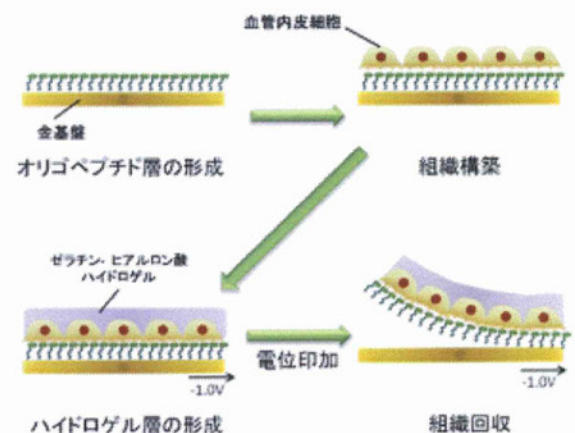


Fig. 8 ハイドロゲルへの細胞転写

## C. 研究結果と考察

## C1. ブリッジ型オリゴペプチドと両性イオンオリゴペプチドの評価

### C1.1 QCMを用いたオリゴペプチド吸着量の評価

細胞非接着性オリゴペプチドの吸着量をFig. 9に示した。このオリゴペプチドが表面に四角配置で吸着していると仮定すると、ペプチド分子間の距離は約1.2 nmと見積もられる。この値は、アルカンチオール自己組織化単分子膜の分子間距離が約0.6 nmであること、およびアミノ酸のサイズがおおよそ0.5 nmであることを考慮すると十分に密に吸着していると判断できる。一般にタンパク質は、直径10 nm～50 nm程度である。今回の吸着密度からタンパク質の非特異吸着を抑制できる可能性が示唆された。

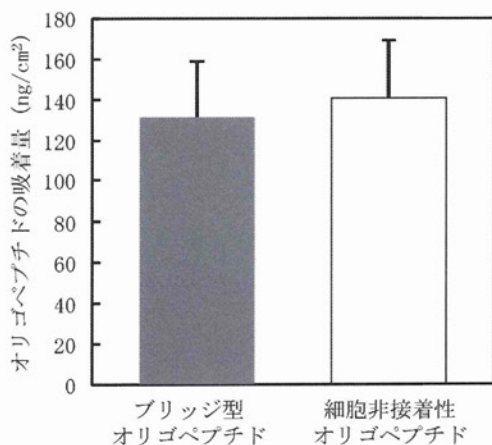


Fig. 9 金表面へのオリゴペプチド吸着量

また比較として、両末端にシステインを有するブリッジ型ペプチドの吸着量もFig. 9に示した。2つのオリゴペプチドの吸着量に大きな差は見られなかった。ただし、ブリッジ型オリゴペプチドは、両末端にチオール基を含むアミノ酸であるシステインを有するため、ジスルフィド結合によりペプチド分子同士が数珠つなぎとなっている可能性がある。そこで実際に次にタンパク質の非特異吸着を評価した。

### C1.2 オリゴペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着量の評価

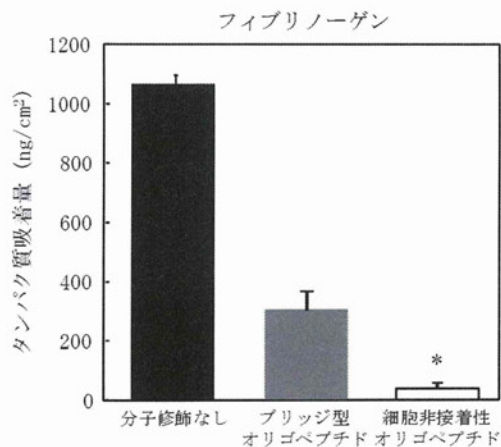


Fig. 10 オリゴペプチド修飾表面におけるフィブリノーゲン吸着の抑制効果

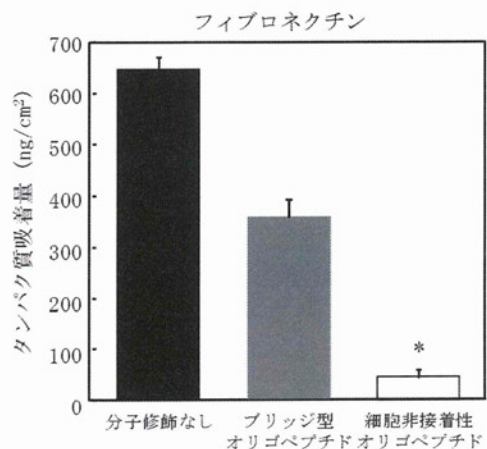


Fig. 11 オリゴペプチド修飾表面におけるフィブロネクチン吸着の抑制効果

Fig. 10, 11 に示すように、細胞非接着性オリゴペプチドおよびブリッジ型ペプチドを修飾した表面において、未修飾表面と比較してタンパク質の吸着は抑制された。ただし、減少割合には大きな差があり、フィブロネクチンの吸着において、ブリッジ型オリゴペプチドでは未修飾の 55%、細胞非接着性オリゴペプチドでは 6.8%、フィブリノーゲンの吸着では、ブリッジ型オリゴペプチド

では 29%、細胞非接着性オリゴペプチドでは 3.6%であった。フィブロネクチンは細胞外マトリックスの一種であり、他の細胞外マトリックスとの橋渡し役としての役割や、細胞表面のインテグリンレセプターとの相互作用を通して細胞接着に大きく関わる。また、フィブリノーゲンはフィブロネクチンと構造的に似ており、培養表面に素早く吸着する。したがって、この2つのタンパク質の吸着を抑制できる表面は、細胞接着抑制や、細胞のパターニングに有用である可能性が高い。

### C1.3 接着・非接着オリゴペプチド混合修飾表面における細胞接着挙動

二種類のオリゴペプチドを特定の割合で混合し修飾した培養表面への細胞の初期接着数を評価した。その結果を、Fig. 12 に示す。細胞接着性オリゴペプチドの割合が 100%~1%においては、接着細胞数に大きな違いはなかった。一方、0.1%以下では、細胞接着性オリゴペプチドの割合が減少するにつれ接着細胞数は減少した。また細胞形態についても、100%~1%では、細胞が強く伸展しているのに対し、0.1%以下では、より球形の形態を示した。以上より、予想通りオリゴペプチドの混合比が細胞接着に大きな影響を及ぼすことが示された。

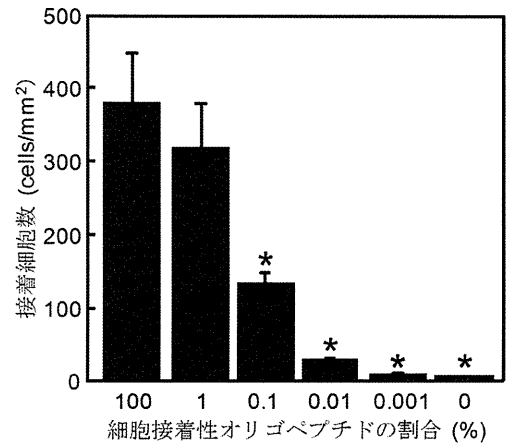


Fig. 12 細胞接着性オリゴペプチドの混合比と接着細胞数の関係

### C1.4 電気化学的な細胞脱離の評価

Fig. 13 に、電位を印加した際の細胞脱離の様子を示す。電位印加 1 分間で多くの細胞が脱離している。この変化を、細胞数をカウントすることでより定量的に評価した結果を Fig. 14 に示した。ここで、縦軸は電位印加前に基板に接着していた細胞数を 100%としたときの残存細胞率 (%)を示しており、横軸は電位印加時間である。従来法であるブリッジ型オリゴペプチドを用いた場合は 5 分間の電位印加後にも 10%ほどの細胞が残存している。また、アルカンチオール分子を用いた場合、5 分間の電位印加で全ての細胞が脱離している。一方、細胞接着性オリゴペプチドを修飾した基板では、電位印加 1 分後には約 70%の細胞が脱離し、2 分後にはほぼ 100%の細胞が脱離した。なお、コントロールとして分子を修飾していない基板上における細胞脱離も評価したが、この場合においても一部の細胞が脱離している。この原因として、細胞は吸着タンパクや細胞外マトリックスを介して金基板に接着しており、これらの一部が負電位の印加により除去されたことが考えられる。いずれにしても、新しく設計したオ



オリゴペプチドを用いることで、より素早くかつ確実な細胞脱離が実現された。

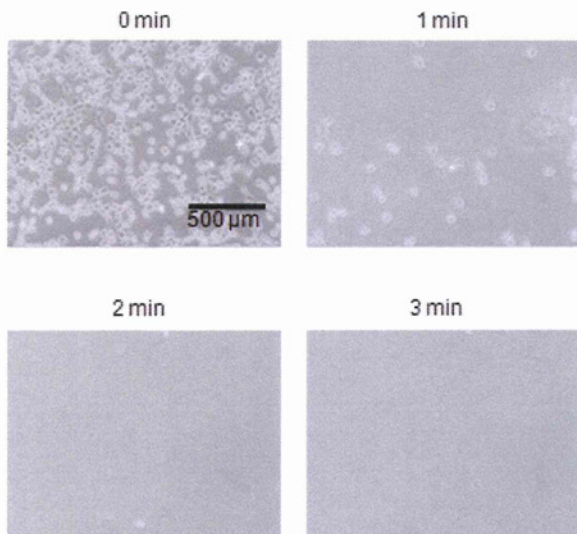


Fig. 13 電位印加時間と培養皿表面の細胞の様子

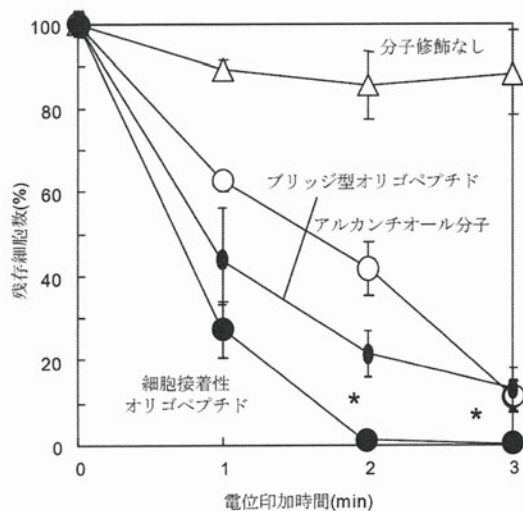


Fig. 14 修飾分子による細胞脱離挙動の違い

## C2. 両性イオンオリゴペプチドの最適化

### C2.1 CD スペクトルによる溶液中での二次構造の評価

オリゴペプチド (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK,

CFKEKEKEK)それぞれの溶液中での二次構造を CD スペクトルにより評価した。その結果を、Fig. 15 に示す。オリゴペプチド CPPPKKEKEKEKEK においては、200 nm 付近に大きな負の極大、225 nm 付近に弱い正の極大がみられた。これは、CPPPKKEKEKEKEK が溶液中で安定な二次構造であるポリプロリンヘリックス構造を形成していることを示している。一方、その他の配列のオリゴペプチド (CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)においては、210 nm 付近の楕円率が小さく、195 nm 付近に負の極大がみられる。つまり、ランダムな構造をとっていることが示された。

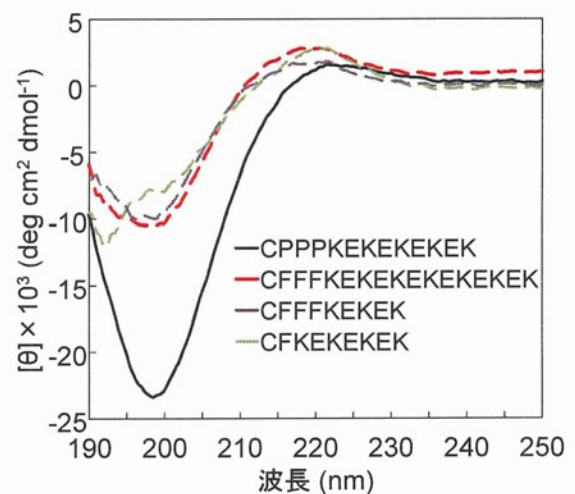


Fig. 15 CD スペクトル

### C2.2 QCMを用いたオリゴペプチド吸着量の評価

オリゴペプチド (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)の吸着量をFig. 16に示した。このオリゴペプチドが表面に四角配置で吸着していると仮定すると、ペプチド分子間の距離は約1.2~1.4 nmと見積もられ、C1で示した結果とほぼ同じである。

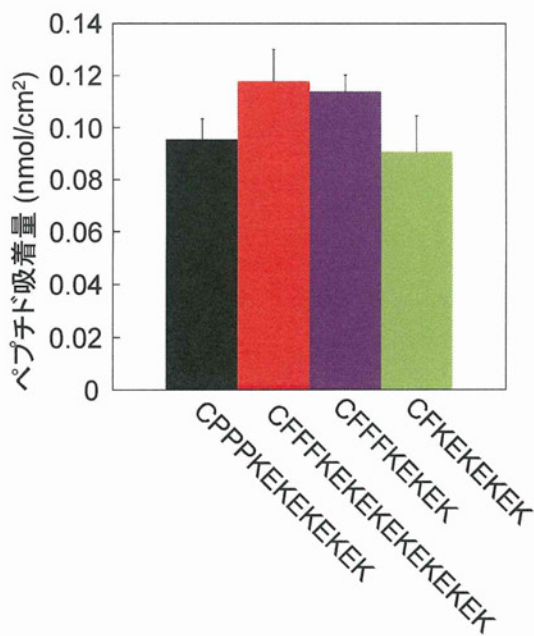


Fig. 16 金表面へのオリゴペプチド吸着量

### C2.3 ペプチド修飾表面の濡れ性評価

Fig. 17 に示すように、いずれのオリゴペプチドを修飾した表面においても、ペプチド修飾前の金表面と比較して金表面は親水性となった。特に、CPPPKEKEKEKEKEK もしくは CFFFKEKEKEKEKEKEKEK を修飾した場合、特に親水性となった。続いて、実際にペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着抑制効果を評価した。

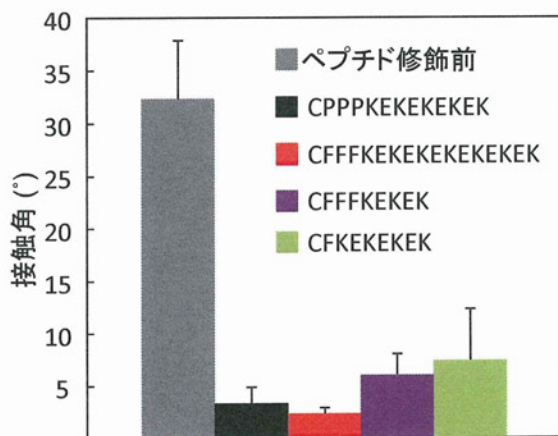


Fig. 17 ペプチド修飾表面への水の接触角

### C2.4 オリゴペプチド修飾表面へのタンパクの非特異吸着量の評価

Fig. 18 に示すように、いずれのオリゴペプチドを修飾した表面においても、未修飾表面と比較してタンパク質の吸着は抑制された。ただし、減少割合には大きな差があり、最も吸着が抑制されたオリゴペプチド (CPPPKEKEKEKEKEK) では 6.3%、その他のオリゴペプチド (CFFFKEKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEK, CFKEKEKEK) では 50~65% であった。フィブリノーゲンは細胞外マトリックスの一種であるフィブロネクチンと構造的に似ており、通常の培養系においても培養表面に素早く吸着する。したがって、このフィブリノーゲンの吸着を抑制できる表面は、細胞接着抑制や、細胞のパターニングに有用である可能性が高い。

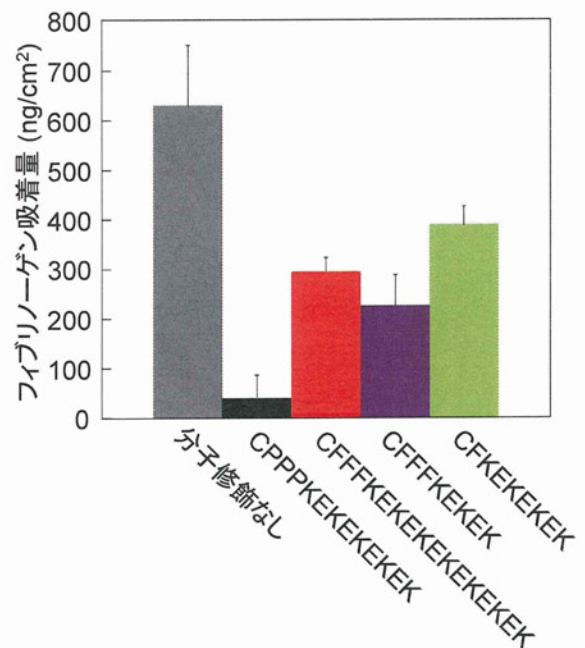


Fig. 18 オリゴペプチド修飾表面におけるタンパク吸着の抑制効果

### C3. 多孔質メンブラン上からの細胞脱離

#### C3.1 シングル細胞の脱離

オリゴペプチドによる脱離効果を明確にするために、次の3条件において細胞の脱離挙動を定量的に評価した。1) オリゴペプチドあり/電位印加なし、2) オリゴペプチドなし/電位印加あり、3) オリゴペプチドあり/電位印加あり。これらの条件における細胞の脱離挙動をFig. 19に示した。ここで、縦軸は電位印加に伴って基板から脱離した細胞脱離率を示しており、電位印加して脱離した細胞数とトリプシン処理によって剥がれた細胞数の合計を100とした。

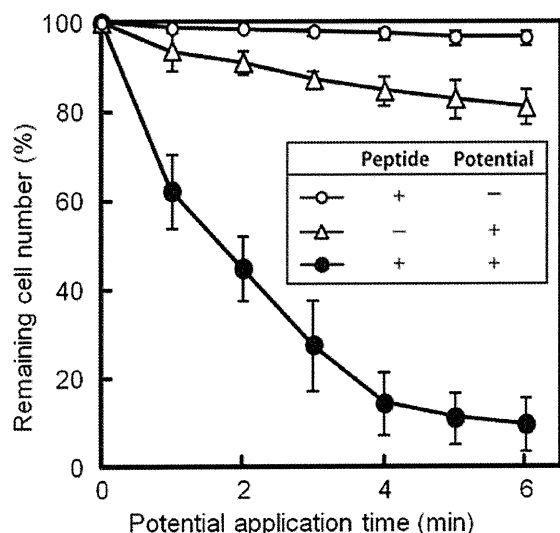


Fig. 19 多孔質メンブランからの細胞脱離挙動

オリゴペプチドを修飾した基板を使用し、-1.0 V(vs Ag/AgCl)の電位を印加した場合、最初の2分間で半数以上の細胞が脱離し、電位印加5分後には約90%の細胞が脱離した。これに対し、オリゴペプチドを修飾し、電位印加していない場合は、5分後もほとんどの細胞は基板に接着した状態であった。したがって、電位印加によってオリゴ

ペプチドが基板から脱離するのに伴って、ペプチドを介して接着していた細胞も脱離したものと考えられる。

一方、オリゴペプチドを修飾していない基板を使用し、-1.0 V(vs Ag/AgCl)の電位を印加した場合、電位印加5分後には20%弱の細胞が脱離している。オリゴペプチドを修飾していないのにも関わらず、一部の細胞が脱離しているのは、細胞が金表面に接着する際、吸着タンパクや細胞外マトリックスを介して接着しており、これらの一部は負電位の印加により除去されたため、細胞が足場を失い脱離したためと考えられる。実際に、電極に電位を走査することで、電極表面の有機物等を除去する、電解洗浄という手法が知られている。

以上より、オリゴペプチドを介して細胞を接着させることで、5分間という短時間のうちに、ほぼ全ての細胞を回収することが可能であり、オリゴペプチドの脱離によって細胞脱離現象が起こることが示された。

#### C3.2 電子顕微鏡による付着細胞の観察

多孔質メンブランの高密度タイプは透明度が低く、位相差顕微鏡では細胞が観察することができない。そこで、電気化学的に細胞が脱離されているかを確認するために、電位印加前後のメンブラン表面を、電子顕微鏡にて観察した。Fig. 20(A) が負電位印加前、(B)が負電位を5分間印加後に培地交換を行ったメンブラン表面の電子顕微鏡画像である。これらにより、メンブラン上の細胞がオリゴペプチドの脱離によって、電気化学的に脱離されることが確認された。

さらに、電気化学的に脱離させた細胞が、電位印加によってダメージを受けて本来の機能を失っていないかどうかを調べるため



に、脱離した細胞を新しいプラスチック製ディッシュに播種し、細胞数変化をカウントした。その結果、トリプシン処理によって回収した細胞と比較しても、増殖能は変わらないことが分かった。さらに、この結果から倍加時間を算出したところ、電位印加によって回収した細胞の倍加時間は $15 \pm 1.6$  hr、トリプシン処理によって回収した細胞の倍加時間は $16 \pm 1.5$  hrとなり、差がないことが示された。さらに文献値によると倍加時間は16.6 hrであることから、文献値と比較しても増殖能は変わらないことが確認できた。つまり電位印加による細胞へのダメージは見られず、良好な生存状態および増殖能を保持されていることが示された。

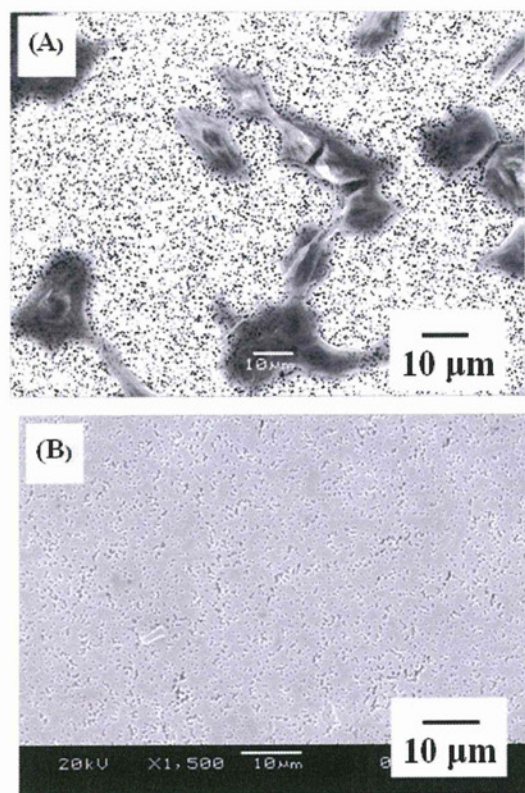


Fig. 20 多孔質メンブレン上に接着した細胞の電子顕微鏡写真。(A)電位印加前 (B)電位印加5分後

以上より、多孔質メンブレン上で線維芽

細胞の単細胞脱離を評価した結果、5分以内にほぼ全ての細胞が脱離した。脱離させた細胞を再培養することによって、良好な生存状態と増殖能を確認できた。すなわち、メンブレン上においてもオリゴペプチドの電気化学的細胞脱離は有用であることが示された。

#### C4. 細胞シートの脱離・積層化

##### C4.1 多孔質メンブレン上での細胞シートの形成

3種類の基板、すなわち多孔質メンブレンφ400 nm(高密度)、多孔質メンブレンφ400 nm(低密度)、ガラス基板を用いて、マウス線維芽細胞を2週間培養することで、細胞シートを構築した。Fig. 21は、それぞれの細胞シートの組織切片をヘマトキシリン-エオジン(H.E.)染色したものである。この染色法では、細胞核はヘマトキシリンによって濃紫に、細胞質はエオジンによって淡紫に染められる。通常ガラス基板では単層にしか成長しない線維芽細胞が、多孔質メンブレンを用いることによって、より厚みのある細胞シートが構築された。これは、通常ガラス基板では培地は細胞の上面のみにしか接することができないが、多孔質メンブレンでは400 nmの貫通孔を通して、細胞の上面・下面の両面から酸素が供給され、増殖が促進されたためであると考えられる。特に、多孔質メンブレンφ400 nm(高密度)上で培養した細胞シートは、厚さ50 μmにも達しており、これは人間の角膜最外層である角膜上皮とほぼ同等の厚みである。

次に、培養日数と細胞シート厚さの関係を評価するため、多孔質メンブレンφ400 nm(高密度)上で3日間・1週間・2週間・3週間それぞれ細胞を培養し、構築した細

胞シートの組織切片をH.E.染色した(Fig. 22)。ここで、細胞はマウス線維芽細胞であり、播種密度は $1.0 \times 10^6$  cellsである。培養3～7日間で2層から3層の細胞シートが構築され、2週間で50  $\mu\text{m}$ 以上の厚みが形成された。2週間と3週間の培養を比較すると、組織切片の厚みという観点からは、大きな変化は観察できなかった。このことから、多孔質メンブレン $\phi 400$  nm(高密度)上で細胞シートを構築するには、2週間程度で十分であることが分かった。

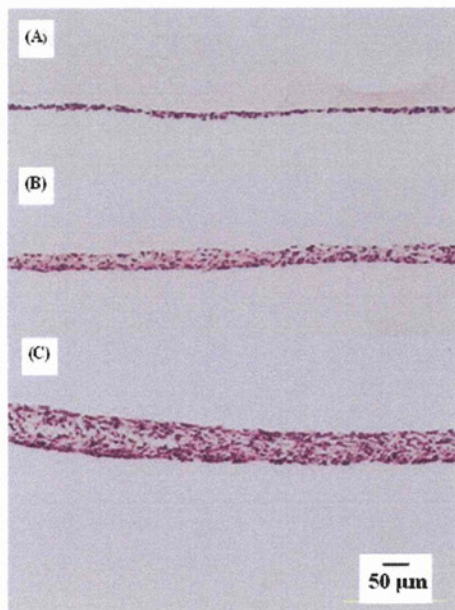


Fig. 21 マウス線維芽細胞シート切片のH.E染色。(A)ガラス基板上で培養 (B)メンブレン $\phi 400\text{nm}$ 上で培養 (C)メンブレン $\phi 400\text{nmHD}$ 上で3週間培養

さらに、メンブレン上と通常のポリスチレン上の培養にともなう細胞数の変化を、DNA抽出法によって測定した(Fig. 23)。メンブレン上の線維芽細胞は、最初の6日間で非常に高い増殖能を示し、10日後には平衡状態に達した。一方で、通常のポリスチレン平面基板の細胞は、3日目までは高い増殖能を示していたが、6日目以降は増殖は

停止した。これらは、メンブレンを用いることによって、細胞への酸素供給の律速が改善されたことに起因すると考えられる。

以上より、多孔質メンブレンでは、約2週間の培養が、厚みのある細胞シートの構築に有用であることが示された。

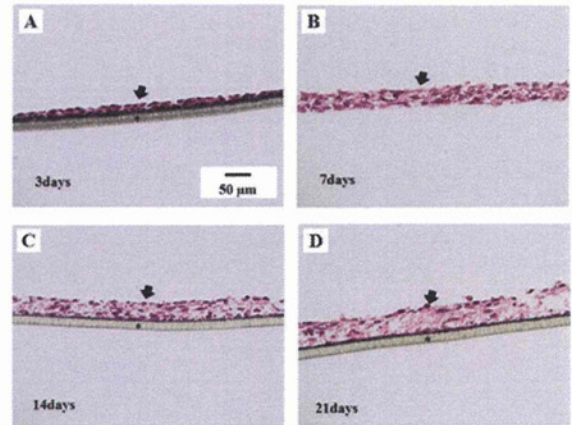


Fig. 22 メンブレン $\phi 400$  nmHD上で(A)3日間 (B)1週間 (C)2週間 (D)3週間培養したマウス線維芽細胞シート切片のH.E.染色

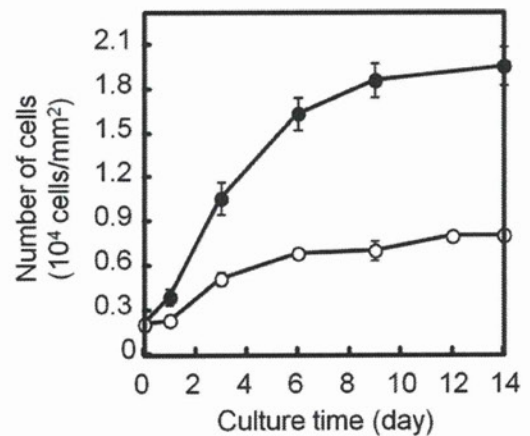


Fig. 23 細胞シートを構成する細胞の細胞数変化 (●メンブレン上、○通常のポリスチレン基板上)

#### C4.2 細胞シートの回収・積層化

2次元的に結合した細胞シートを回収するために、多孔質メンブレン上で細胞シートを構築した後に、単細胞の場合と同じよ



うに電位印加により剥離させた。さらに、剥離した細胞シートを別の基板上で形成したシートに重ね、2層を結合させた後、基板に電位を印加することで2層の積層シートが構築可能となる。この操作を繰り返すことで、3次元的な厚みを持った多層化細胞シートを形成させた (Fig. 24)。

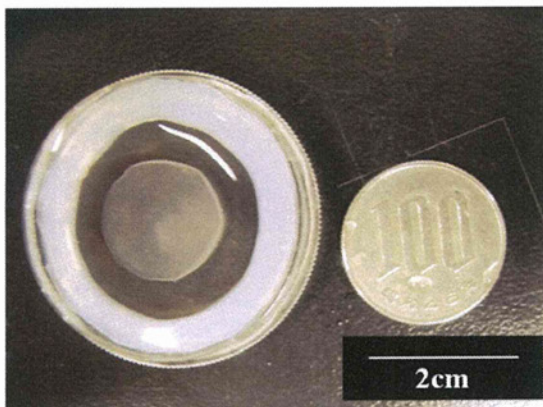
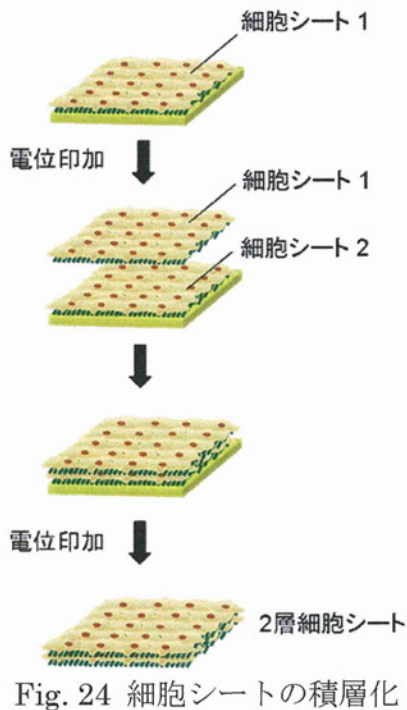


Fig. 25 回収した細胞シートの全体写真

多孔質メンブレン上でマウス線維芽細胞を2週間培養し、電位を5分間印加して回収した細胞シートの写真をFig. 25に示す。回収前

の細胞シートのサイズは、メンブレンと同様に直径25 mmであるが、回収後細胞シートは自発的に収縮した。

また、細胞の生存状態を確認するために、回収した細胞シートを生細胞/死細胞染色をおこない、蛍光顕微鏡で観察した。FDA / EB染色では、生細胞はFDAによって緑に、死細胞はEBによって赤に染まる。Fig. 26の上が位相差顕微鏡、下が蛍光顕微鏡で観察した細胞シートであるが、ほとんどの細胞が緑に染まっている、すなわち生存状態であることが確認された。

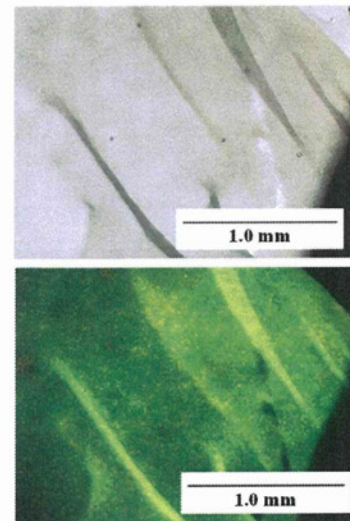


Fig. 26 回収した細胞シートの生死染色 (上)位相差顕微鏡写真、(下)蛍光顕微鏡写真

さらに、回収した細胞シートをディッシュに入れ、その上から新たな細胞シートを重ね、37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Airの雰囲気下で30分間インキュベートした。その後、さらに新たな細胞シートをその上から重ね、同様にインキュベートさせることで、積層化された細胞シートを作製した。回収した細胞シートの下面には、脱離したオリゴペプチドの他に、細胞自身が生産した細胞外マトリックスが存在する。よって、細胞シート同士は単純に重ねることによって、30分ほ

どで完全に接着した。回収した細胞シートを次々に重ねていくことで、多層化細胞シートを作製した。1~3層を積層化した際の細胞シート断面を、ヘマトキシリン-エオジン(H.E.)染色したものをFig. 27に示す。H.E.染色では生細胞しか染色されないが、Fig. 27(A-C)のようにシート中央部もきちんと染まっている、すなわち生存状態であることが分かった。Fig. 27(D)は、実際にシートを重ねている様子である。細胞シートの端の部分が自発的に収縮している様子が確認できる。従来手法によって3枚積層化した細胞シートと比較すると、本手法では約7倍の厚みである140  $\mu\text{m}$ の細胞組織を得ることができた (Fig. 27(C))。

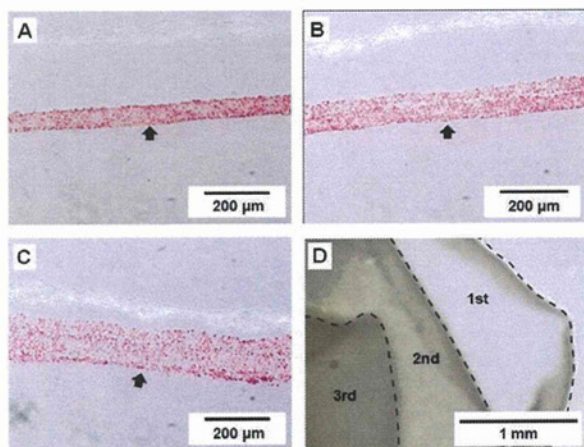


Fig. 27 積層化した細胞シートの断面 (H.E.染色, (A)1層、(B)2層、(C)3層。(D)3枚重ねた際の位相差顕微鏡写真

さらに同様の操作を繰り返してシートを重ねることによって、5枚の多層化シートを構築した際の断面をFig. 28に示す。H.E.染色の様子からも分かる通り、細胞シート間の境目が曖昧になる程にそれぞれの細胞シートが強固に結合し、細胞が蜜になっている様子が確認できた。このことから細胞の形態や細胞間の結合が損なわれることなく、組織が構築することができたと考えられ

る。また、主要な細胞外マトリックスであるフィブロネクチンの免疫染色を行うことで、細胞シート内のフィブロネクチンの発現を観察した (Fig. 29)。この結果は、細胞シートの積層化プロセスが短い理由を説明するのみならず、移植時にも生体への高い生着性が期待できる。

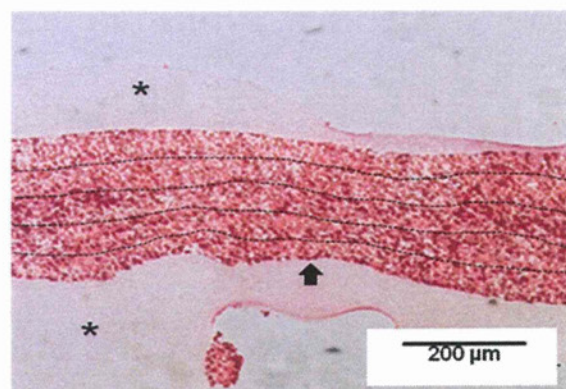


Fig. 28 積層化した細胞シートの断面 (H.E.染色, 5層)

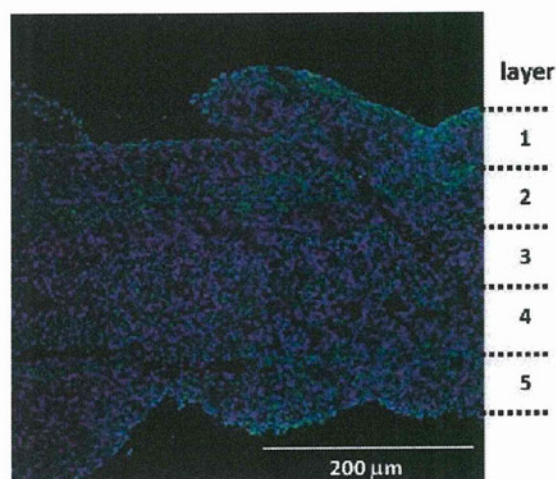


Fig. 29 積層化した細胞シートの断面 (フィブロネクチン蛍光染色/DAPI, 5層)

## C5. マウス皮下への細胞シート移植

### C5.1 移植用細胞シートの準備と移植

オリゴペプチドを修飾した多孔質メンブレン上で1週間培養した線維芽細胞シートを、電気化学的手法に基づき培養基板から回収



した。まず、電位印加によって細胞の染色体に影響が無いかどうかを調べるために、性状変化の有無を核型分析によって解析した。DAPI染色による50細胞の染色体数検査の結果、48細胞が正常染色体数の46であり、正常ヒト細胞と一致した。その他、正常染色体数±1の45本と47本の細胞がそれぞれ1細胞ずつ観察された (Fig. 30)。次に、培養過程における性状変化の有無を調べるために、Qバンド法 (ヘキストキナクリン染色) を用いて、トリプシン処理で回収した細胞および電位印加によって回収した細胞、それぞれ5細胞の核型解析を行った。結果、全ての細胞が44+XYの正常核型であった (Fig. 31)。すなわち、いずれの細胞も50細胞中2細胞に染色体数のずれ (±1) があり、低頻度で染色体数のばらつきがあったが、最頻値は46本であり、正常ヒト細胞と一致した。また、キナクリン・ヘキスト2重染色による染色体分染では、5細胞分の染色体のバンドパターンを正常ヒト染色体と比較した結果、核板バンドパターンが正常ヒト染色体と一致し、欠失、転座、重複など染色体レベルで、確認できる目立った異常は認められなかった。

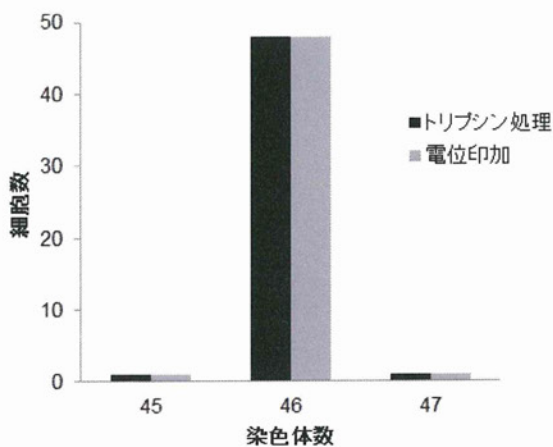


Fig. 30 染色体分布

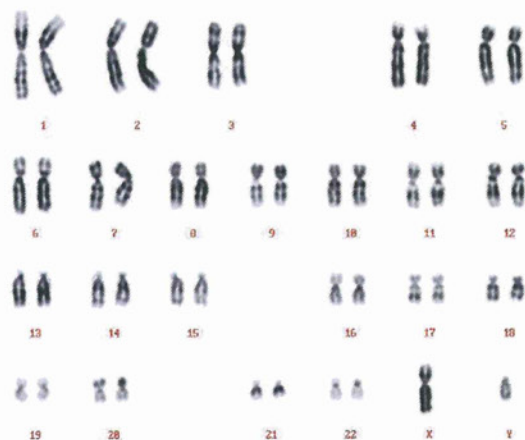


Fig. 31 移植細胞の核型解析

次に、PKHによる細胞膜染色を施した後、回収した細胞シートは、移植担体であるベスキチン(1.5 × 1.0 cm)上に展開した (Fig. 32A)。準備した移植片を、4週齢のヌードマウスの皮下に生着させた (Fig. 32B)。ベスキチンを用いることによって、細胞シートを容易に移植部位に運搬することが可能であった。細胞シートが皮弁に接着したのを確認した後、ベスキチンを取り除き、挙上下皮弁を縫着した。

#### C5.2 移植した細胞シートの組織学的評価

移植して1か月後の組織切片をFig. 33に示す。ここで非移植群は、細胞シートを移植せずに縫合したものである。細胞の核はDAPIにより青色に、細胞シートはPKHにより赤色で示されているが、真皮下部にPKHの発現が認められることから、細胞シートが1ヶ月後においても移植部位に留まっており、本手法によって作製・回収した細胞シートの生体への高い生着性が示された。

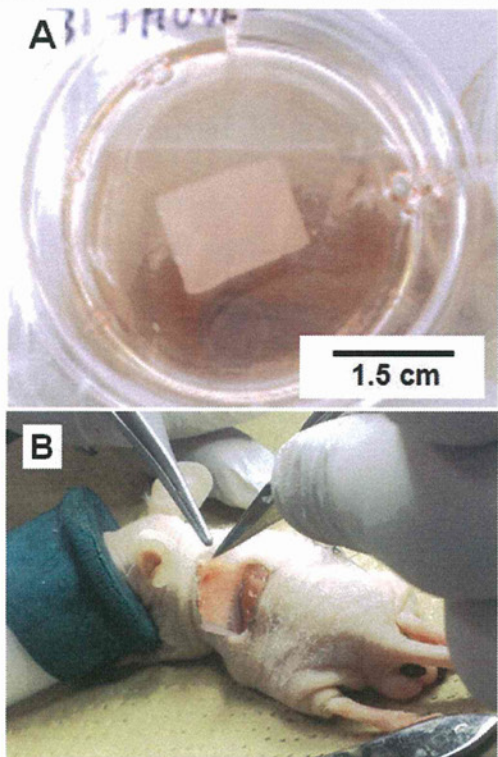


Fig. 32 (A) ベスキチン上に展開した移植片  
(B) ノードマウス皮下へ移植の様子

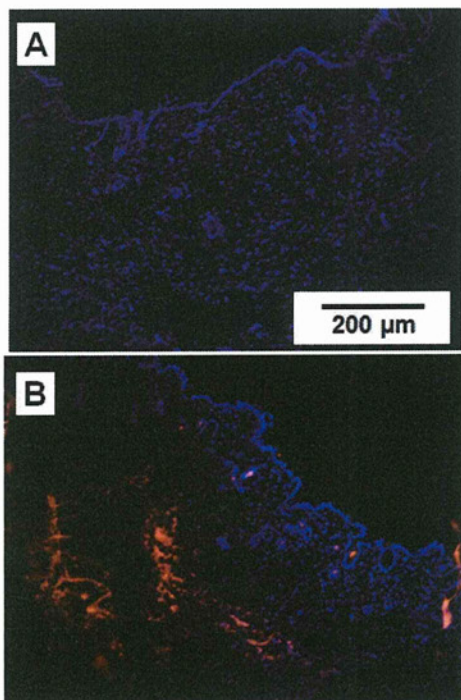


Fig. 33 移植1ヶ月後の組織切片断面  
(DAPI/PKH)  
(A) 非移植群 (B) 移植群

さらに、移植して2ヶ月後に切り出した組織切片をFig. 34に示す。まず、HE染色の結果、2ヶ月後においても細胞シートが移植部位に存在し、1ヶ月後と同様に肉様膜と真皮の間に生着している様子が観察された(Fig. 34Bの点線枠は移植箇所を示す)。また、免疫不全モデルを用いた実験とはいえ、今回の異種間移植において、2ヶ月という経過観察期間で明らかな腫瘍化や、極端な細胞浸潤は認められなかった。

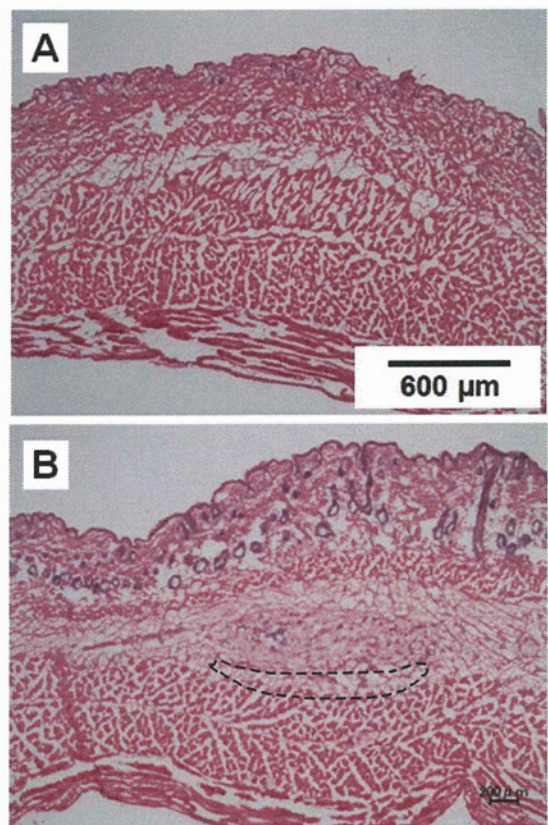


Fig. 34 移植2ヶ月後の組織切片断面  
(HE染色)  
(A) 非移植群 (B) 移植群

次に、移植した細胞シートの機能発現を見るために、抗コラーゲン抗体を用いて免疫染色を行った。細胞の核は青色、細胞シートは赤色、コラーゲンは緑色に染色されている(Fig. 35)。細胞シートの内部および周辺



に、コラーゲンの産生が認められた。すなわち、移植して2ヶ月後においても、細胞シートは移植部位に生着し続け、コラーゲン等の機能発現を有することから、移植による高い治療効果が期待できる。

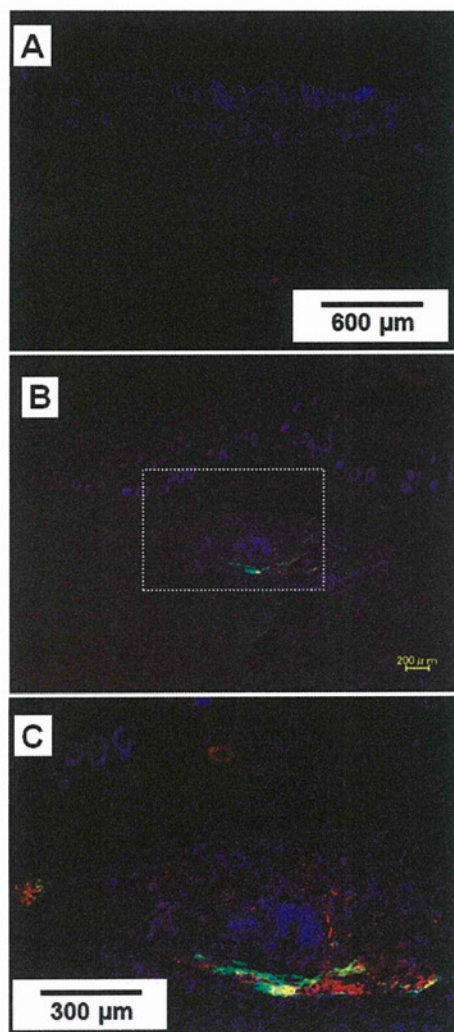


Fig. 35 移植2ヶ月後の組織切片断面 (DAPI/PKH/Anti-collgaen)

(A) 非移植群 (B,C) 移植群 (x40, x100)

## C6. 血管内皮細胞との共培養細胞シートの作製・回収および積層化

### C6.1 共培養シートの作製と内皮細胞の形態観察

多孔質メンブレン上で線維芽細胞と血管

内皮細胞を3:1の割合で播種し、共培養を行った。結果、3日後に内皮細胞の細かな網目構造が細胞シート内に形成され始め、1週間後にはよりはっきりと目視できる網目構造が確認できた(Fig. 36)。すなわち、細胞シート内に血管様構造を付与し、また培養と共に細胞シート内の血管網が時々刻々に変化していく様子が捉えられた。

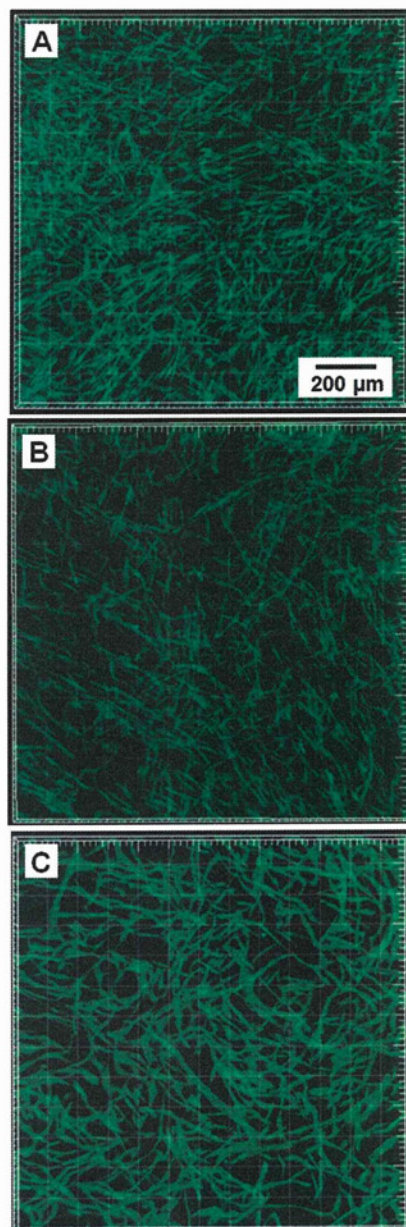


Fig. 36 共培養シート内の内皮細胞 (GFP)

(A) 培養3日目 (B) 5日目 (C) 7日目

細胞シート内に形成した血管様構造を定量的に評価するために、3次元画像解析ソフトウェア (Imaris) を用いて内皮細胞の形態を立体構築した (Fig. 37)。この立体データを基に、血管様構造の平均直径、体積、分岐数を算出した (Fig. 38-40)。その結果、平均直径と体積は培養3日目から5日目にかけて減少するが、それから7日目にかけて増加すること、一方で分岐数は培養するにつれて減少し、3日目から5日目にかけて半減していることが分かった。これらから、細胞シート内の血管内皮細胞は、まずシート内全体に血管様網を張り巡らせたのち、徐々に形態を変化させ、適切な立体配置や空間密度を獲得していくことが示唆された。

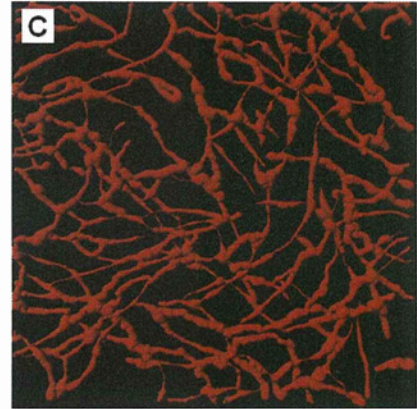
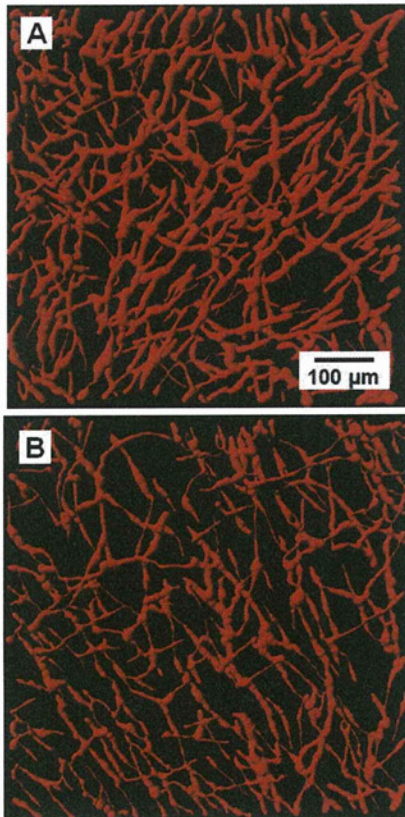


Fig. 37 3D構築後の内皮細胞ネットワーク (A) 培養3日目 (B) 5日目 (C) 7日目

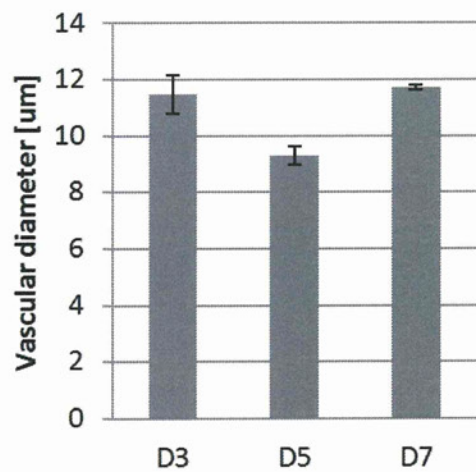


Fig. 38 毛細血管様構造の平均直径 (n=3)

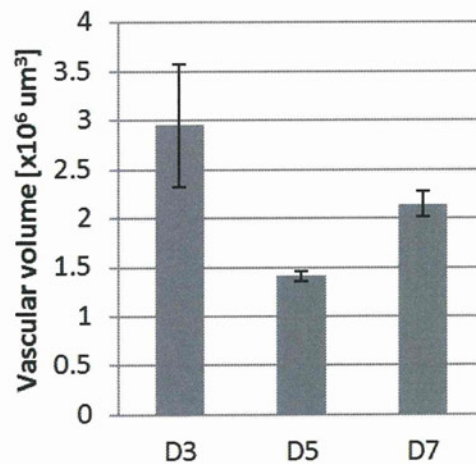


Fig. 39 毛細血管様構造の体積 (n=3)



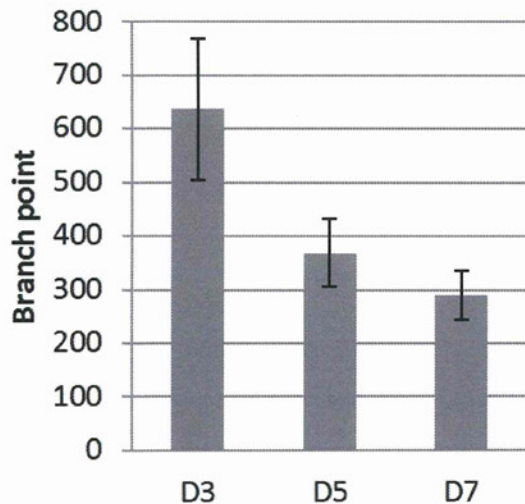


Fig. 40 毛細血管様構造の分岐の数 (n=3)

### C6.2 共培養シートの回収と積層化

多孔質メンブレン上で線維芽細胞と血管内皮細胞を2週間共培養した後、 $-1.0\text{ V}$  (vs Ag/AgCl)の電位を10分間印加して回収し、3枚積層化した (Fig. 41A)。HE染色の結果、積層化細胞シートの厚みは約 $200\text{ }\mu\text{m}$ であり、純粹に線維芽細胞シートを3枚積層化したものよりも約1.5倍厚みのある組織が形成された。これは、血管内皮細胞の管腔形成によって酸素供給や代謝産物の拡散が促進されたことが考えられる。

また、フィブロネクチンと平滑筋アクチンの2重蛍光免疫染色を行うことで、線維芽細胞シート内に血管内皮細胞が存在していることが確認できた (Fig. 41B,D)。DAPIによる核染色の結果をFig. 41Cに示すが、細胞シートの内部に渡ってきちんと細胞が存在し、高い細胞密度の細胞組織が作製できていることが分かった。

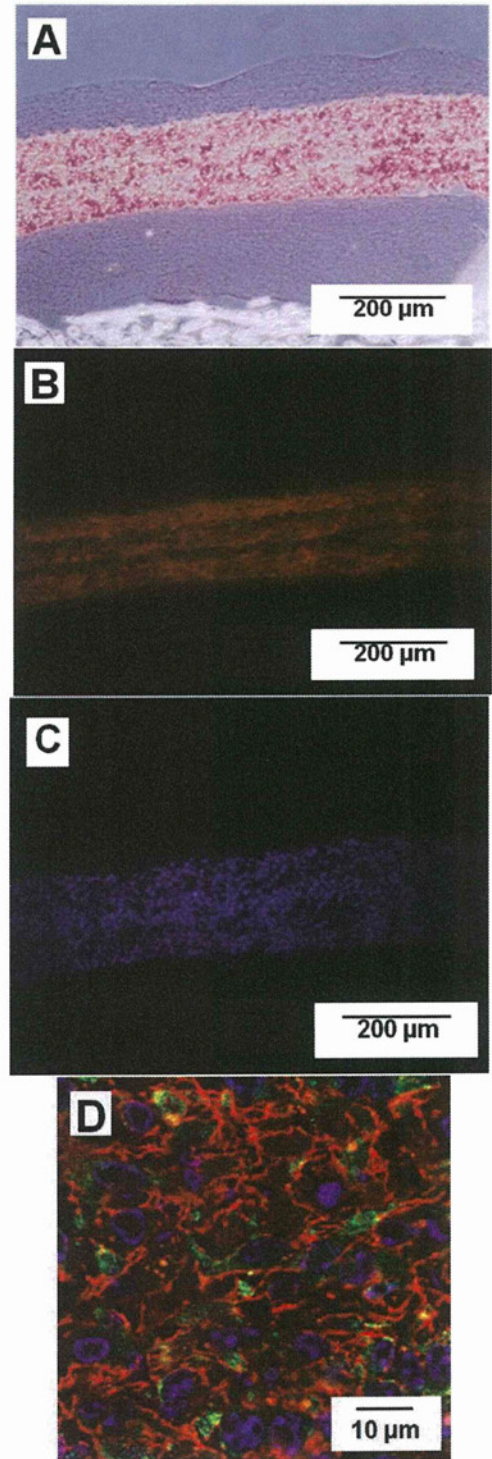


Fig. 41 積層化共培養シートの断面 (A) HE染色 (B) フィブロネクチン/平滑筋アクチン 2重染色 (C) DAPI (D) フィブロネクチン/平滑筋アクチン/ DAPI 3重染色

## C7. 2液混合型ゼラチンハイドロゲルの評価

### C7.1 CMC-CHOの合成

カルボキシメチルセルロース (CMC)と合成したCMC-CHOの<sup>1</sup>H NMRスペクトルの結果を比較しアルデヒド基の修飾が確認され、修飾率は80%であると見積もった。

### C7.2 Gelatin-ADHの合成

HA-CHOの場合と異なり、<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析では判断が困難であったため、TNBSアッセイを用いた。このTNBSアッセイにより、ゼラチンのカルボキシル基へのアジポヒドラジドの修飾率は27%と見積もられた。この値は一般に高くないが、ゼラチンの細胞接着配列である、R (Arg)-G (Glu)-D (Asp)のD (Asp) はカルボキシル基を側鎖に持っているため、すべて反応してしまうとRGD配列が少なくなり、細胞接着率の低下につながる。そのため、この程度の修飾率が適当であると判断した。

### C7.3 Gelatin-ADHとCMC-CHOのゲル化

ダブルシリンジを用いて、Gelatin-ADHとCMC-CHOを混合させることによって、常温下において10秒程度でゲル化する様子が確認された(Table 1, Fig. 42)。さらに、物性試験機で強度の指標であるヤング率をハイドロゲルの濃度を変化させながら測定したところ、ゲルの濃度が増加するに従ってヤング率は増加する傾向があることが示された(Fig. 43)。

Table 1 Gelatin-ADHとCMC-CHOの混合濃度とゲル化時間の関係

ゲル濃度 (wt%)	ゲル化時間 (s)
CMC2.0-Gelatin2.5	166±6
CMC4.0-Gelatin5.0	28±3
CMC6.0-Gelatin7.5	13±1

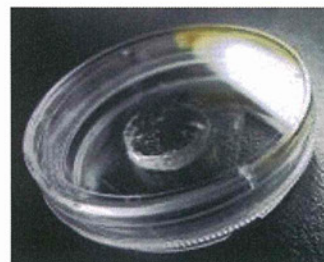


Fig. 42 Gelatin-ADHとCMC-CHOの混合ゲル

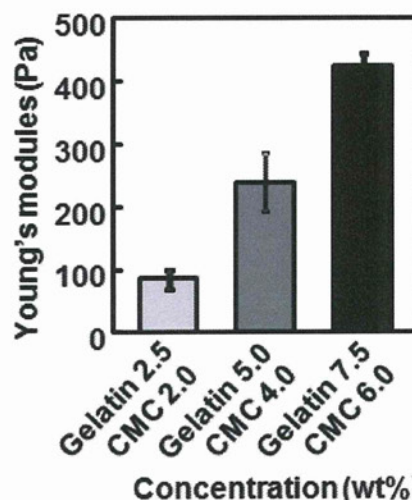


Fig. 43 Gelatin-CMCハイドロゲルのヤング率評価

### C7.4 Gelatin-CMCハイドロゲルの孔径評価

凍結乾燥したゲルの孔径は細胞の遊走や血管内皮細胞の血管新生に大きく関わっている。この孔径を評価したところゲルの濃度が増加するに従って孔径が小さくなる傾向が見られた(Fig. 44)。これらより、Gelatin-ADHとCMC-CHOの濃度を変化させることで容易にゲル強度の変更が可能であることを示した。



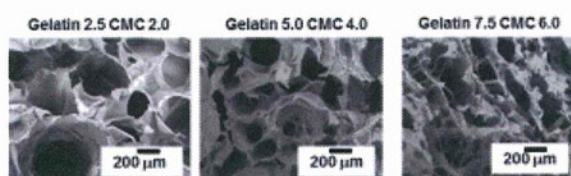
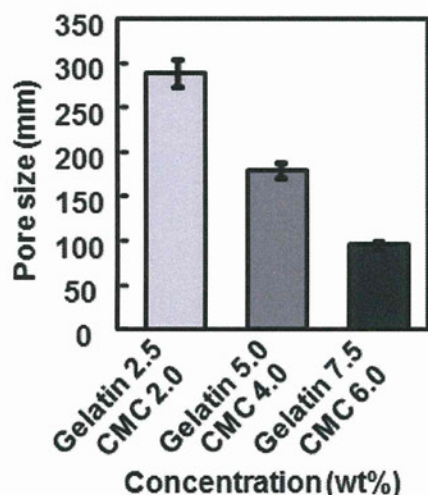


Fig. 44 Gelatin-CMCハイドロゲルの孔径評価

### C7.5 Gelatin-CMCハイドロゲルの生分解性評価

CMC2.0wt%-Gelatin2.5wt%ではネットワーク強度が弱く培養5日目に分解した(Fig. 45)。また、CMC6.0 wt%-Gelatin7.5 wt%では大きな膨潤が見られ、最大時には1.6倍の膨潤が認められた。そのため分解も早くに生じる傾向が認められた。CMC4.0wt%-Gelatin5.0 wt%では、さほど大きな膨潤もなく、少なくとも2週間は構造を維持した。

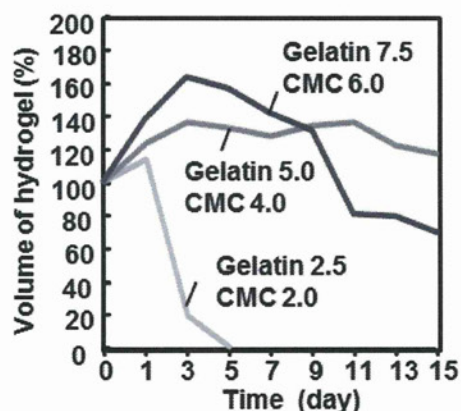


Fig. 45 Gelatin-CMCハイドロゲルの生分解性評価

### C8. 細胞を用いたハイドロゲルの評価

#### C8.1 ハイドロゲル原料の細胞毒性評価

ゲル原料の細胞毒性を調べたところ、Gelatin-ADHでは、すべての濃度で90%程度の生存率を示したが、CMC-CHOでは、濃度を増加させるに従って生存率は大きく減少した (Fig. 46、Fig. 47)。これは、架橋の反応基として用いているアルデヒドが高濃度になると細胞に影響を与えていることが考えられるが、この多くがゲル化の際に架橋に用いられるためCMC-CHOとGelatin-ADHを混合したゲルでは細胞毒性は少なく (Fig. 48)、細胞の足場材料としての利用が可能であると示された。

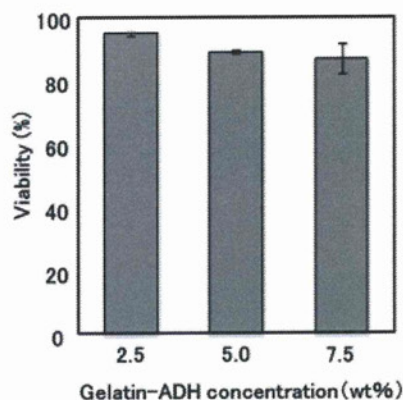


Fig. 46 Gelatin-ADHの細胞毒性

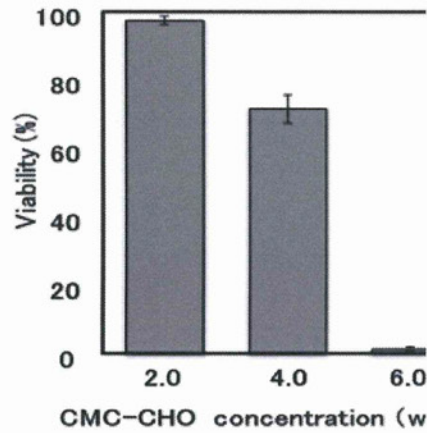


Fig. 47 CMC-CHOの細胞毒性

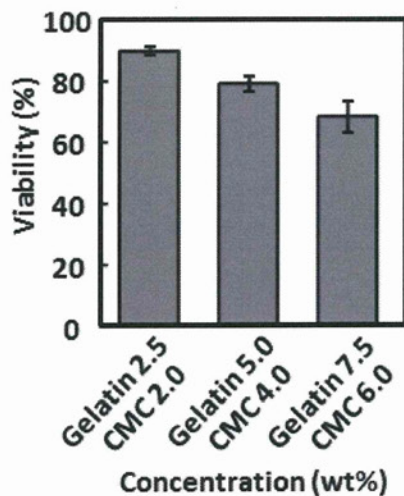


Fig. 48 CMC-Gelatinハイドロゲルの細胞毒性

### C8.2 HA-CHO、Gelatin-ADHゲルの細胞接着評価

細胞接着評価を行ったところ、混合比は変化させずに濃度を上げていくと、細胞接着の形態が変化した(Fig. 49)。これは、ゼラチンに含まれる細胞接着因子の量の増加、ゲルの強度、ゲルの膨潤度が大きく関係しているためと考えられる。また、濃度を上げていくと、ゲル化時間も早くなり、強度も強くなるが、ハイドロゲルの膨潤が大きくなり、より早く分解した。このことから、

長期的な培養では、他の要素も踏まえて最適なゲル濃度を決定する必要があることが分かった。

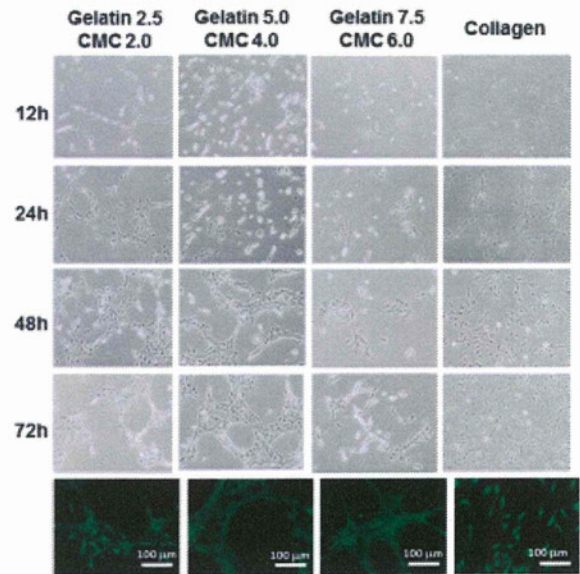


Fig. 49 ゲル上への細胞接着

### C8.3 CMC-Gelatinハイドロゲルの血管新生評価

これまでの評価で最適と考えられたGelatin 5.0wt%-CMC 4.0wt%のものを使用して、血管内皮細胞包埋による血管新生能の評価を行った。培養により、ゲル内での細胞増殖が認められ(Fig. 50)、血管内皮細胞の血管新生が認められた(Fig. 51)。

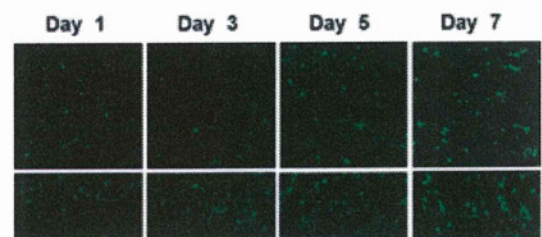


Fig. 50 ゲル内での細胞増殖



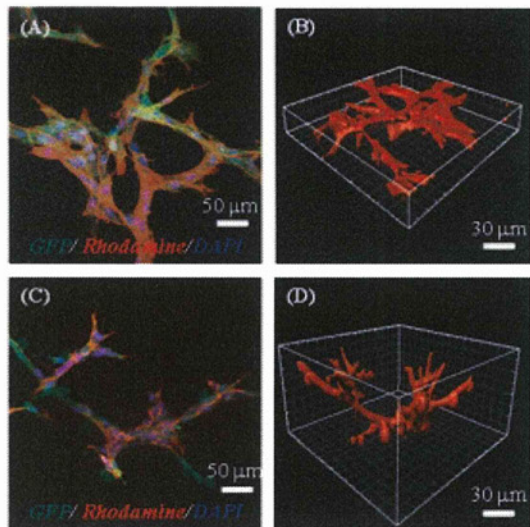


Fig. 51 構築した血管ネットワーク  
(A)、(B) ゲル上での培養 (培養3日目)  
(C)、(D) ゲル内での培養 (培養7日目)

#### C8.4 電気化学を用いた細胞転写

電位印加によって細胞はCMC-CHO, Gelatin-ADHゲルに転写され、蛍光写真での生存も確認された(Fig. 52)。また、電位印加後の生存状態は良好で転写した細胞は増殖し、ゲル上を覆っていった。さらに、細胞脱離を電位印加時間やペプチドの有無によって評価したところ、5分間の電位印加によってペプチドを用いた場合のみ、ほとんどの細胞が回収できることが示された。

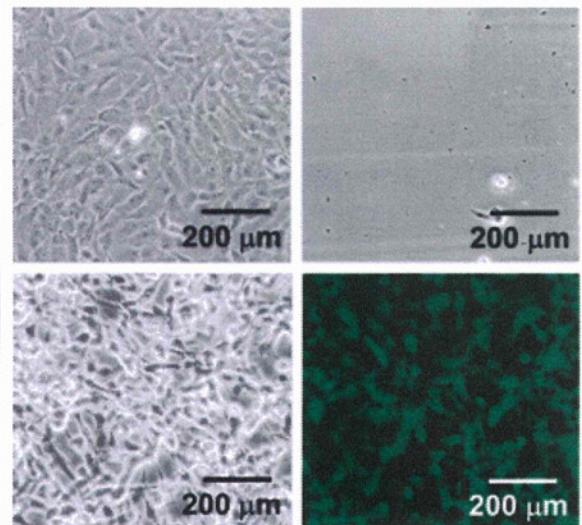


Fig. 52 CMC-Gelatinハイドロゲルへの電気化学細胞脱離を用いた細胞転写。

左上：電位印加前の金基板、  
右上：電位印加後の金基板、  
左下：電位印加後のゲル、  
右下：電位印加後の蛍光写真

#### D. 結論

電気化学的な細胞脱離に利用するオリゴペプチドを新しく設計し、素早い細胞脱離が可能な配列を見出した。特に、静電的な相互作用で自己組織化する配列が重要であり、またリンカー部分の2次構造も影響を及ぼすことが示唆された。また、ナノ孔を有するメンブラン上で厚みのある細胞シートを形成させ、これを回収する技術を確立した。そしてこの細胞シートをヌードマウスに移植することでプロセスの安全性を示した。細胞シートの取り扱いを容易にするために、膨潤を低減したゼラチンベースの2液混合型ハイドロゲルを作製した。移植した細胞シートは2ヵ月後も生着していることが示された。さらに厚みのある細胞シートを作製するために、血管内皮細胞を導入した細胞シートを作製したところ、細胞シート内部で血管ネットワーク構造を形

成することが示された。以上により、厚みのある細胞シートを形成・回収する手法を確立した。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. N. Sadr, M. Zhu, T. Osaki, T. Kakegawa, Y. Yang, M. Moretti, J. Fukuda, A. Khademhosseini, SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures, *Biomaterials (IF=7.88)*, 32(30), pp. 7479-90 (2011)
2. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, Spatio-temporal detachment of single cells using microarrayed transparent electrodes, *Biomaterials (IF=7.88)*, 32(28), pp. 6663-9 (2011)
3. N. Mochizuki, T. Kakegawa, T. Osaki, N. Sadr, NN. Kachouie, H. Suzuki, J. Fukuda, Tissue Engineering Based on Electrochemical Desorption of an RGD-Containing Oligopeptide, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (IF=3.53)*, 7, 236-243 (2013)
4. T. Kakegawa, N. Mochizuki, N. Sadr, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell-Adhesive and Cell-Repulsive Zwitterionic Oligopeptides for Micropatterning and Rapid Electrochemical Detachment of Cells, *TISSUE ENGINEERING: Part A (IF=4.022)*, 19(1-2):290-8 (2013)

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

1. T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Surface Engineering for Rapid Cell Detachment by Using Electrochemical Desorption of a Zwitterionic Oligopeptide Layer, MRS Fall

Meeting & Exhibit 2011, 2011.12.1, Boston, USA

2. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, On-demand Detachment of Single Cells Using Microarrayed ITO Electrodes, Asian Biomaterials Congress, 2011.9.17, Busan, Korea
3. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, Electrical Detachment of cells for Engineering Capillary-Like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel, TERMIS-AP 2011, 2011.8.4, Singapore, Singapore
4. T. Kakegawa, A. Gautieri, N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Zwitterionic Oligopeptides for Cell Micropatterning and Electrochemical Rapid Cell Detachment, 3rd TERMIS World Congress, 2012.9.8, Vienna, Austria
5. T. Kakegawa, A. Gautieri, N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrochemical Cell Detachment using Zwitterionic Oligopeptides, Biofabrication 2012, 2012.10.29, Manchester, U. K.

###### 国内学会

1. 福田淳二、望月直人、掛川貴弘、鈴木博章、自己組織化単分子膜の電気化学還元脱離を用いた細胞脱離技術、第33回日本バイオマテリアル学会大会、2011.11.2、京都府民総合交流プラザ（京都府）
2. 福田淳二、微細加工技術を利用した細胞培養チップ、第63回日本生物工学会大会（招待講演）、2011.9.28、東京農工大学（府中市）
3. 福田淳二、掛川貴弘、望月直人、大崎達哉、鈴木博章、両性イオンペプチド分子層の還元脱離を利用した細胞組織の構築、電気化学会第79回大会、2012.3.29、アクトシティ浜松（浜松市）
4. 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞脱離、