

Electrospinning of Native Collagen Hydrogel Nanofibers

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤田, 聡 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/10485

未変性コラーゲンハイドロゲルファイバーのエレクトロスピンニング

Electrospinning of native collagen hydrogel nanofibers

藤 田 聡

1. はじめに

生体組織は約 60 兆個の細胞で構成されていると考えられているが、細胞だけで成り立つ訳ではない。細胞の周辺は細胞外マトリクス(extracellular matrix、以下 ECM)と呼ばれる生体高分子で満たされている。ECM 成分としては、コラーゲンやエラスチン等のタンパク質、ヒアルロン酸等の多糖類、プロテオグリカン等が知られており、これらの生体高分子が水分子を多く含んだ繊維状や網目状の構造体、すなわちハイドロゲルを形成している。このためハイドロゲルは、生体組織を模倣(バイオミメティック)した材料として、細胞培養の基材や再生医療での組織修復の足場などに広く使用されている。本稿では、代表的な ECM タンパク質であるコラーゲンをエレクトロスピンニング法によりナノファイバー化し、異方性のあるコラーゲンハイドロゲルファイバーを開発し、これを ECM の代替として細胞培養基材として利用した結果とその可能性について述べる。

2. 細胞培養での異方性ハイドロゲルの利用

2. 1. 細胞外マトリクスの異方性

生体組織中の ECM は、一定方向に配向した異方性を有しており、これが生理活性に重要な役割を果たす。例えば血管においては、平滑筋細胞が ECM 繊維に沿って血管の円周方向に配列して収縮力を付与する一方で、血管内皮細胞はそれに直交するように血流方向に伸展するなど、異方性のある構造を有しており、これが血管組織全体の力学的特性を決定している²⁾。

ECM の異方性は個々の細胞にも影響を与える。従来、細胞の生理活性は、細胞の分泌する生物学的なシグナルや、ECM 成分による化学的なシグナルに影響を受けると考えられてきた。ところが、ここ 15 年ほどの細胞生物学の研究によると、従来見出されていた生物学的・化学的シグナルに加えて、細胞周辺環境の幾何学的な構造変化や硬さなどの物理的な要因も細胞機能に重要な役割を果たすことがわかってきた。これは、周辺環境の物理的な要因が細胞骨格の形成や細胞接着を介したシグナルを与え、その結果、細胞の増殖や分化等の細胞挙動が変化するためである^{3,4)}。筆者らも、配向性をもたないランダムナノファイバー不織布と、一方向に配向したナノファイバーシートの上での間葉系幹細胞の分化挙動などの細胞機能に影響することを報告した^{5,6)}。

このように ECM が作り出す細胞微小環境の物理的な影響は、再生医療で用いられる細胞基材設計におけ

る重要な指針と認識されつつある。しかし、現在、細胞接着の基材に使用されているハイドロゲルの多くは、均質かつ等方的であるため、生体組織が有する異方性を十分に反映していない。分子レベルで見ても生体組織のように秩序だった高次構造を形成しておらず、その機械的強度も十分とは言えない。すなわちバイオミメティック材料として、ハイドロゲルは未だ不完全と言え、再生医療の実用化や培養細胞のバイオデバイスへの実装に向けては、細胞の機能や生理活性を十分に維持できる、異方性のある構造を有したハイドロゲルの開発が求められているのが現状である。

2. 2. エレクトロスピンニングによる異方性材料の作製

異方性材料を精密に制御しながら作製する手法として、エレクトロスピンニング法が注目される。エレクトロスピンニング法とは、高電圧を印加したノズル先端から溶液を射出することでマイクロないしナノメートルサイズの微細繊維を紡糸する手法である。溶液の濃度や溶媒の種類、紡糸時間等を変えることにより、ファイバー径や目付量等の制御も可能である。さらに、ファイバーを担持し回収するためのコレクタ部を高速回転することで、繊維が一方向に揃った、サブミクロンスケールでの異方性を有した材料も得られる。

エレクトロスピンニングにおいては、一般的に揮発性の高い有機溶媒や水系溶媒を用いることが多い。ハイドロゲル材料も水溶液を用いることで繊維化は可能である。しかしながら、ゲル化前のポリマー溶液の粘度は低いため、エレクトロスピンニングでは安定した紡糸が困難であり、スプレー上に噴射されてしまう。これを防ぐためには、他のポリマーをブレンドして溶液の粘度を上げたり、未架橋ポリマーを紡糸してから後処理として架橋をおこなったりする手法が用いられる。

2. 3. コラーゲン

コラーゲンは、皮膚、血管、腱、歯など広く組織に存在し、ヒトの全タンパク質の約 30% を占める繊維状のタンパク質である。生体中のコラーゲンは 3 本のコラーゲン分子鎖から成る剛直な三重らせん構造が会合してナノメートルスケールのコラーゲンフィブリルを構成し、さらにこれらが階層的に秩序化された高次構造を形成している⁷⁾。この頑丈な構造により、ECM は高い力学的強度を示す。生体から抽出されたコラーゲンは、コラーゲンフィブリルの外側に疎水性アミノ酸残基が存在するため、水に不溶である。これを酸処理

により加水分解することで調製したアテロコラーゲンは、三重らせん構造を維持したままコラーゲンフィブリルが解離して酸性水溶液に溶解する。アテロコラーゲン酸性溶液は、中性にし、37°Cに保持することで、疎水性相互作用によりコラーゲンフィブリルがネットワーク状に会合し水ゲルを形成する。こうして得られたコラーゲン水ゲルは、高い生体親和性や生理活性を示すために、細胞接着の基材として広く用いられている。しかしその構造は等方的で均質であり、生体中の間葉系組織が本来有する異方性のある構造とは異なる。

異方性を有するコラーゲン水ゲルの開発研究はこれまでもなされてきた。例えば、流動下でコラーゲンをゲル化させて異方性コラーゲンゲルを得るという報告⁸⁾や、せん断応力をかけながらゲル化させることで、形成されるコラーゲンフィブリルが一定方向になるという報告⁹⁾、また、円柱状の管にコラーゲン溶液を満ち、凍結乾燥を繰り返すことでゲルの収縮の方向をコントロールし、異方性コラーゲン水ゲルを作製するといった報告¹⁰⁾がある。これらの手法により形成された水ゲル上で細胞を培養すると細胞が一方向に伸長する。しかしながら、加工形状が一定に制限され、自在に組織修復の足場材料として作成することが難しかった。

コラーゲン水ゲルをナノスケールの微細ファイバー状に加工できれば、生体中のECMをよく模倣した細胞培養の足場として適切な材料となりうると期待される。そこでエレクトロスピニング法を用いたコラーゲンのナノファイバー化が試みられてきた。回転式コレクタなどを利用したエレクトロスピニング法は異方性コラーゲンゲルを得る手法として期待される。ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)やトリフルオロエタノール(TFE)等の高極性の有機溶媒を用いることでうまくナノファイバーが得られる。しかし、三重らせん構造等のコラーゲン特有の秩序ある高次構造が破壊されてしまい、アモルファスであるゼラチンファイバーとなってしまうことが課題であった¹¹⁾。

ゼラチンとは、コラーゲンの高次構造が熱処理や酸処理により、ランダムコイル状に変性したタンパク質である。高い親水性を有するため、細胞培養ディッシュに吸着させて細胞接着の足場としたり、移植用細胞シートの作製において、細胞シートを細胞培養基材から剥離させやすくするためのコートとしたり、多く利用されている。ゼラチンは低温下では分子鎖同士の絡まりにより物理ゲルを形成するが、培養温度(37°C)付近では水ゲルにはならず水に可溶であるため、水ゲルとして培養には直接用いることはできない。熱架橋やアルデヒド等による化学架橋をおこなって、水に不溶のファイバーを得る必要があった。エレクトロスピニング法により未変性コラーゲン水ゲルファイバーを得る手法はこれまで成功例が報告されていなかった。

3. コラーゲン水ゲルファイバーの開発

3. 1. 芯鞘エレクトロスピニング

水ゲルを紡糸するために芯鞘エレクトロスピニング法を用いた。その基本的な作製スキームを図1に示す。芯鞘エレクトロスピニングとは、芯・鞘層それぞれ別の溶液を導入できる同軸ノズルを用い、内層・外層にそれぞれ別のポリマーから成る芯鞘ナノファイバーを作製する手法である。筆者らはこれまでにいくつかの組み合わせのポリマーを用いて芯鞘ナノファイバーを作製している¹²⁾。ここでは、鞘溶液に水溶性でかつ紡糸しやすいポリマーを用いる。(a)同軸ノズルを介したエレクトロスピニングにより、鞘部のポリマーが繊維化する際にガイド材として働き、芯部の水ゲルの繊維化が期待できる。(b)紡糸時にはコレクタ部を高速で回転させることで、異方性のある繊維を回収する。(c)作製した芯鞘ナノファイバーから鞘材を除去することで芯部の水ゲル層を単離する。この一連のプロセスにより、水ゲルファイバーから成る異方性ゲル材料を作製する。

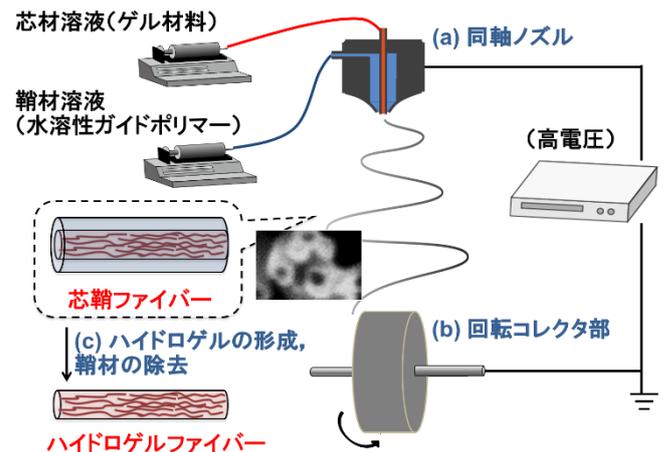


図1 芯鞘エレクトロスピニングを用いた水ゲルファイバーの作製スキーム¹⁾。

コラーゲン水ゲルファイバーを得るために、繊維化しやすいガイドポリマーとしてポリビニルピロリドン(PVP)を鞘とし、芯にコラーゲン水溶液を封入した芯鞘ナノファイバーを作製した。これの芯部のコラーゲンをゲル化させたのち、鞘部のガイドポリマーを除去することで、コラーゲンのみから成るゲルファイバーを得ることを試みた。

豚皮由来アテロコラーゲン (beMatrix®, Collagen FD; 新田ゼラチン) 酸性水溶液 (1%) およびポリビニルピロリドン(PVP K90)水溶液(30%)をそれぞれ、芯および鞘として、同軸ノズルを用いたエレクトロスピニングによりコラーゲン/PVP の二層構造のナノファイバーを作製した。紡糸する際には、コレクタ部を高速で回転させることで一方向に揃え、シート状の異方性のファイバーを回収した。

作製したコラーゲン/PVP ナノファイバーを蛍光顕

顕微鏡で観察したところ、コラーゲンと PVP の両方が同一のナノファイバーに局在しコラーゲン層は途切れずに繊維化していることが確認された。

3. 2. コラーゲンハイドロゲルナノファイバーの作製とキャラクタライズ

次に、得られた芯鞘ナノファイバーを塩基性エタノール水溶液に浸漬し、1 時間 37°C でインキュベートすることでコラーゲンをゲル化させた。この操作では化学的な架橋剤を添加しなかった。エタノールの存在はコラーゲンの三重らせん構造を安定化することが報告されていたため^{13, 14}、ここではエタノールをベースとした塩基性緩衝液をゲル化溶液に用いた。さらにその後、水で洗浄して鞘材を完全に除去することで、コラーゲンゲルファイバーのみを得た。

図 2 に、コラーゲン/PVP ナノファイバーをゲル化・洗浄操作の前の走査型電子顕微鏡画像(a)と、ゲル化・洗浄操作後の抗コラーゲン抗体による免疫染色画像(b)を示す。コラーゲンハイドロゲルファイバーは一方方向に配向し、紡糸時に形成されていた異方性が維持されていることがわかる。なお比較のために、コラーゲン溶液を中性化させて作製したコラーゲンハイドロゲルについても同様に観察したところ(c)、その繊維径は今回エレクトロスピンニング法で作製したコラーゲンファイブリルとほぼ同程度の約 300 nm であり、異方性のない均質な構造であった。

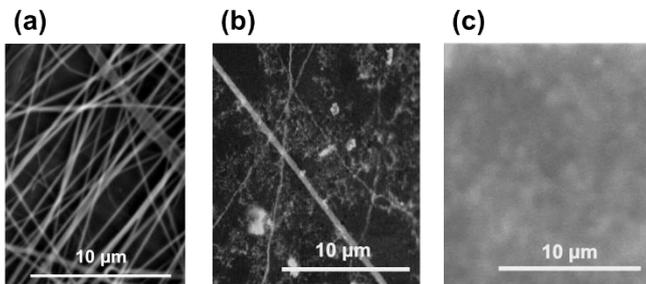


図 2 作製したファイバーの顕微鏡画像。

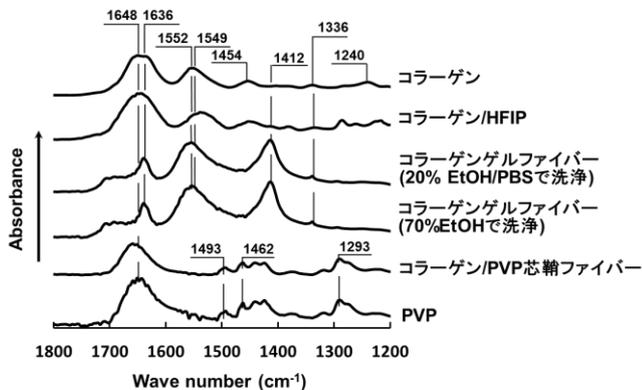


図 3 作製したファイバーの ATR-FTIR 測定。上段より、元のコラーゲン、HFIP 溶媒でエレクトロスピンニングをおこなったコラーゲン、作製したハイドロゲルファイバー（2 種類の洗浄条件）、紡糸直後のコラーゲン/PVP ファイバー、PVP ¹)。

また化学的組成を ATR-FTIR 測定により分析したところ、洗浄操作では PVP が表面からほぼ完全に除去されたことも確認された (図 3)。

作製したハイドロゲルファイバー中に、三重らせん構造がどの程度維持されているかどうかを調べるため、洗浄後に得られたゲルファイバー試料を、酢酸バッファに溶解し、溶液のコラーゲンの高次構造を CD スペクトル測定により評価した (図 4)。コラーゲン特有の三重らせん構造は 222 nm の正のコットン効果として観察できる。222 nm のモル楕円率の値について、エレクトロスピンニング前のコラーゲン溶液の値の比よりトリプルヘリックスの残存率を算出したところ、ゼラチン溶液のトリプルヘリックス残存率は約 25% であったのに対し、20% エタノールを含む PBS で洗浄したゲルファイバーは、約 77% と高い値が得られた。

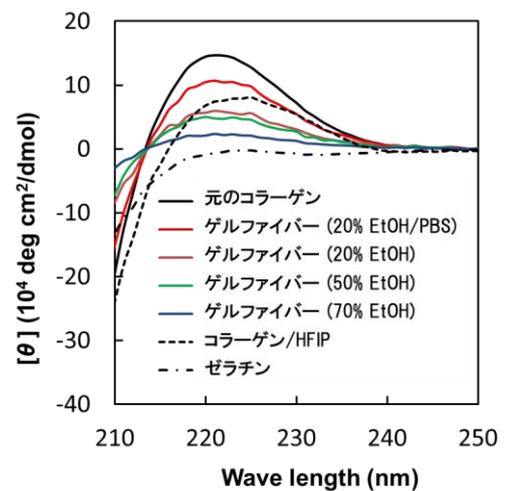


図 4 作製したファイバーを種々の条件で洗浄したハイドロゲルファイバーの CD 測定 ¹)。

ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) では、コラーゲンの分子鎖に関する情報が得られる。コラーゲン分子は、分子量が 110 kDa、130 kDa の $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖と呼ばれる二種類のポリペプチド鎖から成り、2 量体および 3 量体は、それぞれ β 鎖や γ 鎖を形成する。今回作製したゲルファイバーの SDS-PAGE をおこなっ

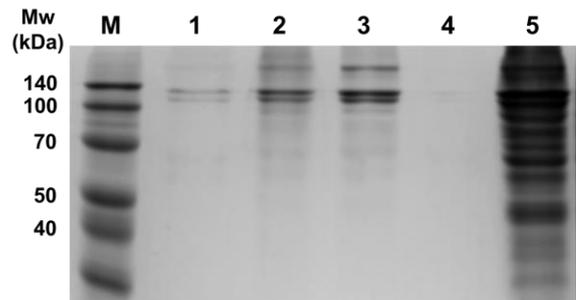


図 5 作製したファイバーの SDS-PAGE。M: マーカー、1: コラーゲン/PVP 芯鞘ファイバー、2: コラーゲンハイドロゲルファイバー、3: 元のコラーゲン、4: PVP、5: HFIP 溶媒でエレクトロスピンニングをおこなったコラーゲン ¹)。

たところ、コラーゲン溶液は、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖および β 鎖の、明瞭な 3 本のバンドが観察された (図 5)。コラーゲン/PVP ナノファイバーおよびこれらをゲル化・洗浄して得られたコラーゲンゲルファイバーも、元のコラーゲン溶液と同様のバンドが観察された。比較のため、コラーゲンを HFIP に溶解させて単層ノズルを用いてエレクトロスピニングをおこない、紡糸したナノファイバーを再溶解させて電気泳動した。その結果、断片化ペプチドのスメアなバンドが観察され、主鎖が開裂していることがわかった。これは、コラーゲン分子が HFIP に溶解し、変性することで、安定なヘリックス構造を失い、紡糸時にかかるシェアストレスにより断片化したものと考えられる。

3. 4. コラーゲンハイドロゲルナノファイバー上での細胞培養

作製したコラーゲンゲルファイバー上で、ヒト臍由来静脈内皮細胞(HUVEC)を播種し、細胞の伸展を観察した。播種翌日の観察を行った。その結果、図 6 に示すように通常のコラーゲンハイドロゲルでは、異方性なく細胞が伸展しているのに対し、コラーゲンゲルファイバー状では細胞は繊維方向に沿って伸展することが示された。この傾向は培養を継続しても維持された。このようにコラーゲンゲルファイバーでもアルギン酸ゲルファイバー同様、細胞の配向方向を一定方向に制御することが可能となった。なお得られたコラーゲンゲルファイバー中に、残存 PVP は、顕微鏡観察、FTIR 測定より、確認されなかったが、ファイバー内部で PVP が残存している可能性は完全には否定できない。しかし、PVP は細胞毒性が低く、医薬品としての使用が認可されているため、微量の PVP が残存していたとしても、細胞培養材料としてその影響は無視で

きると考えている。

4. ハイドロゲルナノファイバーの展望

今回開発した芯鞘型エレクトロスピニング法を用いることでハイドロゲルファイバーを作製し、これにより培養細胞の異方性を制御することができた。再生医療の実用化にあたり、幹細胞から組織・臓器を立体的に構築するために、細胞周辺の微小環境を適切に制御できる生体材料が強く望まれている^{15,16)}。生体中の ECM は、細胞接着の場として役割を果たすだけでなく、異方性や不均一性を有する構造によって細胞の配列や形態などへ影響を与えることで、増殖や分化等の細胞機能も制御している。効果的な生体材料の開発に向けては、ECM の持つ生理活性や異方性構造を再現することが望まれている。異方性ハイドロゲルを作製する技術は難しいが、再生医療の実現化には強く望まれている。エレクトロスピニング法は、厚みのある組織構造の作製や、異方性を位置特異的に制御した材料設計、チューブ状やバルク、シートなど種々の形態への加工がしやすい¹⁵⁾。そのため、本手法は、異方性ハイドロゲルを用いて人工血管等の異方性のある高次構造を有する組織材料を自由に設計・構築するのに有用な手法として、より生体のネイティブに近い組織修復を可能とすることが期待される。

今回、コラーゲンから架橋剤なしで水に不溶なハイドロゲルファイバーをエレクトロスピニング法により形成できた。三重らせん構造を保持し、かつ一定方向に配向したコラーゲン繊維から成る異方性コラーゲンハイドロゲルファイバーは、望まれながらもこれまでに実現されていなかった材料であり、天然コラーゲンと同等の生理活性を有する新規な細胞足場材料として利用できると期待される。コラーゲンハイドロゲルファイバーの臨床応用を考えた場合、従来式のエレクトロスピニング法で用いられてきた HFIP や TFE などのハロゲンを含む溶媒や、アルデヒドなどの反応性の官能基を含む架橋剤は残存してはならない。本手法はこれらの点もクリアしており、臨床に向けた安全性の面でもアドバンテージを有すると期待される。

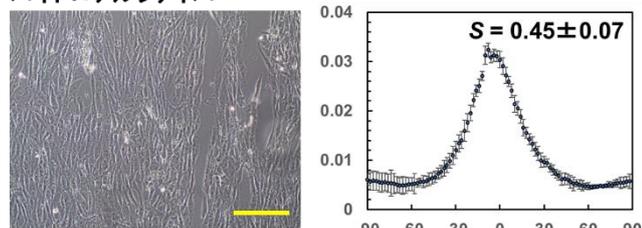
5. 謝辞

本研究は科研費(25870272)、高橋産業経済研究財団の支援を受けて実施しました。また共同研究者である福井大学末信一朗教授、卒業生和久田弓加氏、西本昇平氏に感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) Y. Wakuda, S. Nishimoto, S. Suye, S. Fujita, *Sci Rep.*, **8**, 6248 (2018).
- 2) N. L'Heureux, L. Germain, R. Labbé, F. A. Auger, *J. Vasc. Surg.*, **17**, 499 (1993).
- 3) R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, C. S. Chen, *Dev. Cell*, **6**, 483 (2004).

ハイドロゲルファイバー



通常の水ハイドロゲル

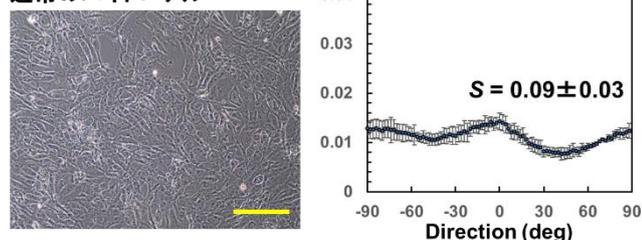


図 6 作製したファイバー上で HUVEC を 8 日間培養した後の位相差顕微鏡像。ファイバー配向方向 (上下方向) に細胞が配向した。下段は比較のため、通常の水ハイドロゲルで培養した結果。グラフは配向度および二次のオーダーパラメータ¹⁾。

- 4) A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell*, **126**, 677-689 (2006).
- 5) S. Fujita, H. Shimizu, S. Suye, *J. Nanotechnol.* 429890, (2012).
- 6) O. Batnyam, H. Shimizu, K. Saito, T. Ishida, S. Suye, S. Fujita, *RSC Adv.*, **5**, 80357 (2015).
- 7) F. W. Kotch, R. T. Raines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 3028 (2006).
- 8) M. T. I. Mredha, N. Kitamura, T. Nonoyama, S. Wada, K. Goto, X. Zhang, T. Nakajima, T. Kurokawa, Y. Takagi, K. Yasuda, J. P. Gong, *Biomaterials*, **132**, 85 (2017).
- 9) S. Yunoki, H. Hatayama, M. Ebisawa, E. Kondo, K. Yasuda, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103**, 3054 (2015).
- 10) C. J. Lowe, I. M. Reucroft, M. C. Grota, D. I. Shreiber, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2**, 643 (2016).
- 11) D. I. Zeugolis, S. T. Khew, E. S. Yew, A. K. Ekaputra, Y. W. Tong, L. Y. Yung, D. W. Huttmacher, C. Sheppard, M. Raghunath, *Biomaterials*, **29**, 2293 (2008).
- 12) 加藤新, 末信一朗, 藤田聡, *高分子論文集*, **73**, 366 (2016).
- 13) H. Yoshikawa, A. Hirano, T. Arakawa, K. Shiraki, *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**, 1286 (2012).
- 14) A. Gopinath, S. M. Reddy, B. Madhan, G. Shanmugam, J. R. Rao, *Eur. Biophys. J.*, **43**, 643 (2014).
- 15) 藤田聡, 岩田博夫, 再生医療分野におけるナノファイバーの組織再生への応用, *繊維機械学会誌*, **63**, 146 (2010).
- 16) 岩田博夫, 加藤功一, 木村俊作, 田畑泰彦, バイオマテリアル(化学マスター講座), 丸善出版 (2013).