

博士論文

オリゴ糖酸化物を用いて架橋した
アテロコラーゲンゲルによる血管網誘導機能の検討

望月 康晃

目次

I. 要旨

II. 序文

III. オリゴ糖酸化物で架橋したゲルの生成と機能に関する検討

IV. ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したゲルの機能に関する検討

V. β -シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したゲルの機能に関する検討

VI. 考察

VII. 結語

VIII. 謝辞

IX. 引用文献

オリゴ糖酸化物を用いて架橋した

アテロコラーゲンゲルによる血管網誘導機能の検討

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科学

指導教員 渡邊聡明教授

申請者 望月康晃

要旨

大型再生組織の構築には、ライフラインである血管網の付与が必須である。このために移植母床から血管網を誘導する機能を持つ三次元の足場材料を構築することをめざし、オリゴ糖酸化物を架橋剤として用いたアテロコラーゲンのゲル化技術の最適化を目的として本研究を行った。様々なオリゴ糖を検討し足場材料として最適なオリゴ糖を選択した。そのオリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルを使用し、ゲルに細胞を包埋する実験や、ゲルをラット筋膜下に移植しその組織像を観察する実験を通して、ゲルが足場材料として機能する最適な条件を求めた。最適な条件下での実験により優れた機能をもつ足場材料が実現できたと考えられた。

Ⅱ．序文

1．再生医療の現状と実現へむけての問題点

様々な病気に対する治療として、薬物療法や理学療法等の進歩、手術や血管内治療等の侵襲的治療の進歩により、長期の生存が得られるようになってきた。しかしながら、ひとたび心不全や腎不全といった臓器不全に至ると、治療により一旦改善しても再度増悪することが多い。このような臓器不全に対する最終的な治療方法の一つとして、移植手術が行われているが、免疫学的な観点から移植対象に限られることがある。また、生体からの移植はドナーへの侵襲が大きく、利用可能な臓器が限られ、脳死を含む死体からの移植は、日本人の価値観、死生観という問題に加えて、感染、腫瘍等の理由により利用可能な臓器に限りがあるため、あまり進んでいないのが現状である。このような状況を打破するべく、再生医療により臓器を再生しようとする試みが多く行われてきた[1]。

臓器再生に際しては、生存可能な対象臓器の細胞を増やし、細胞を三次元的に構築し、生体内で免疫学的な拒絶反応を引き起こすことなく生存させることが求められる。

個々の細胞を培養技術により増殖させることは可能となっているが、三次元培養の技術はいまだ十分に確立されていない。受動拡散による酸素や栄養物質の取り込みは数百マイクロメートルが限界とされており、それ以上の大きさに

なると、中心壊死を起こすことが知られている[2]。細胞をシート状に培養して積層化する技術や[3-8]、細胞が多数寄り集まって塊となったスフェロイドを培養することにより、厚みを持たせる技術[9]が検討されているが、いずれにしても内部に血管系が無ければ中心壊死を起こしてしまうため、組織内部から栄養を供給するための血管網を構築する必要がある。

免疫学的な問題については、自己の人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS 細胞）[10]をもとにして臓器再生を行うことができれば、今後解決されることが期待されており[11,12]、例えばサルでは、iPS 細胞由来の自己の神経細胞を脳内に移植し、免疫反応がほとんど起きなかったことが報告されている[13]。少量の移植で十分な効果が期待できる網膜色素上皮細胞では、ラットやサルでの移植実験を経て、免疫抑制剤投与下ではあるものの、本人の iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞シート移植がヒトでも臨床試験として実施される時代になってきた[14]。このことから、大型再生臓器の移植に対する期待が広がっており、栄養供給源として血管網構築の技術が待たれているところである。

血管系を含んだ再生組織を組織工学的に作成する試みでは、血管系をいかに構築するかが課題となっており、工学的に血管網を構築する手法が検討されているが、実用化には至っていない[15]。また、臓器の脱細胞化により血管網を残す手法もあるが[16]、受動拡散可能なレベルまで微小な血管を残すことは困難で

あり、まだ実現には至っていない。別の方法として、ホストの移植母床より血管新生を誘導することにより、再生組織に栄養血管を引き込む手法が考えられている[17-27]。(図1)

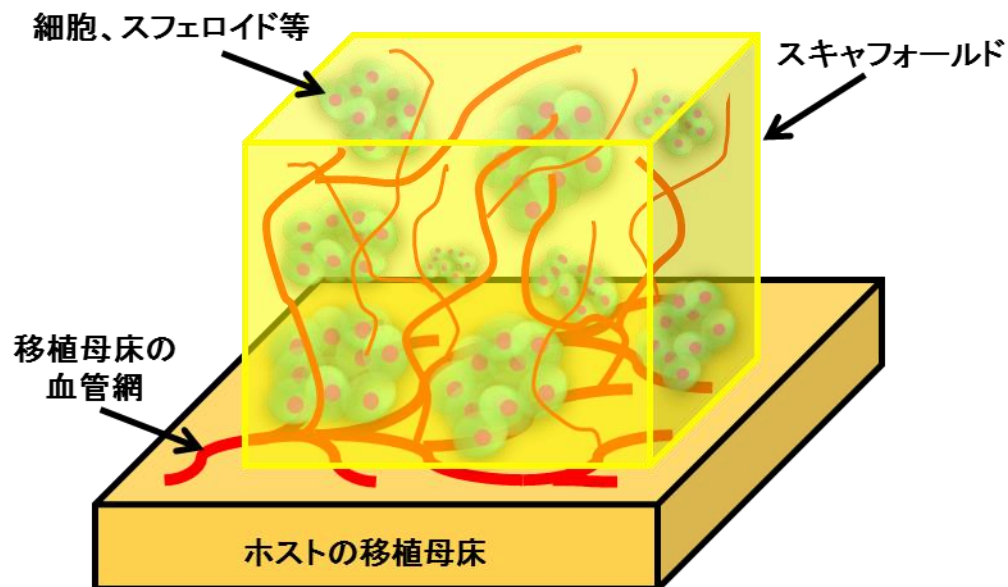


図1：移植母床からの血管誘導を促すスキャフォールドのイメージ

2. 栄養血管誘導を目的とした足場材料（スキャフォールド）の開発

栄養血管を内部に誘導するスキャフォールドに求められる条件としては、三次元で適度な隙間のあるマイクロネットワーク構造であること[17,18]、血管壁構成細胞との接着性がよいこと[19]、生体内で安定した構造であること[16,17,19,20]、十分な強度がありつつ血管新生を促すマトリックスメタプロテアーゼ等のプロテアーゼによって適切に分解されること[17,19,21]、臨床現場でのハンドリングが良いことが求められる。また、生体に対する毒性が低いことは最低限の条件と

して必要である。さらに、血管新生を促す増殖因子を内部に搭載することができれば、内部への血管誘導に有利に働くことが期待される[28-30]。

三次元マイクロネットワーク構造を満たすものとしてハイドロゲルが良く知られている[25]。マトリゲルのような商品もあるが、マウス肉腫由来の組織を利用していることから生体への移植には適さず、生体への毒性が低いとされる物質の中では、細胞接着性や、生体内での分解能、スキャフォールドとしての強度の観点から、コラーゲンを主成分としたゲルが良いと考えられた[22,23]。コラーゲンの中でも、コラーゲン分子両端のテロペプチドを酵素処理により取り除いたアテロコラーゲンは、コラーゲンの抗原性を低減したものであり、安全性が高いと考えられている[31]。また、水溶性であるため生体との親和性が高く、スキャフォールドとして望ましい。しかしながら、アテロコラーゲンは生理条件下で時間経過とともに自然に凝集、線維化してしまうため、三次元での密度を一定に保つことが難しく、凝集を起こしにくい低濃度では柔らかすぎて足場としては不向きである[31]。したがって、生体内で足場として十分な密度を実現させるためには、架橋剤を使用してアテロコラーゲンを安定させる必要がある。

これまで、申請者の所属する研究室では、アテロコラーゲンを三次元スキャフォールドとして機能させるために必要な架橋剤を研究してきた（図2）。当初は細胞毒性の観点から疎水性相互作用を含む物理架橋を行うのが良いと考え、静

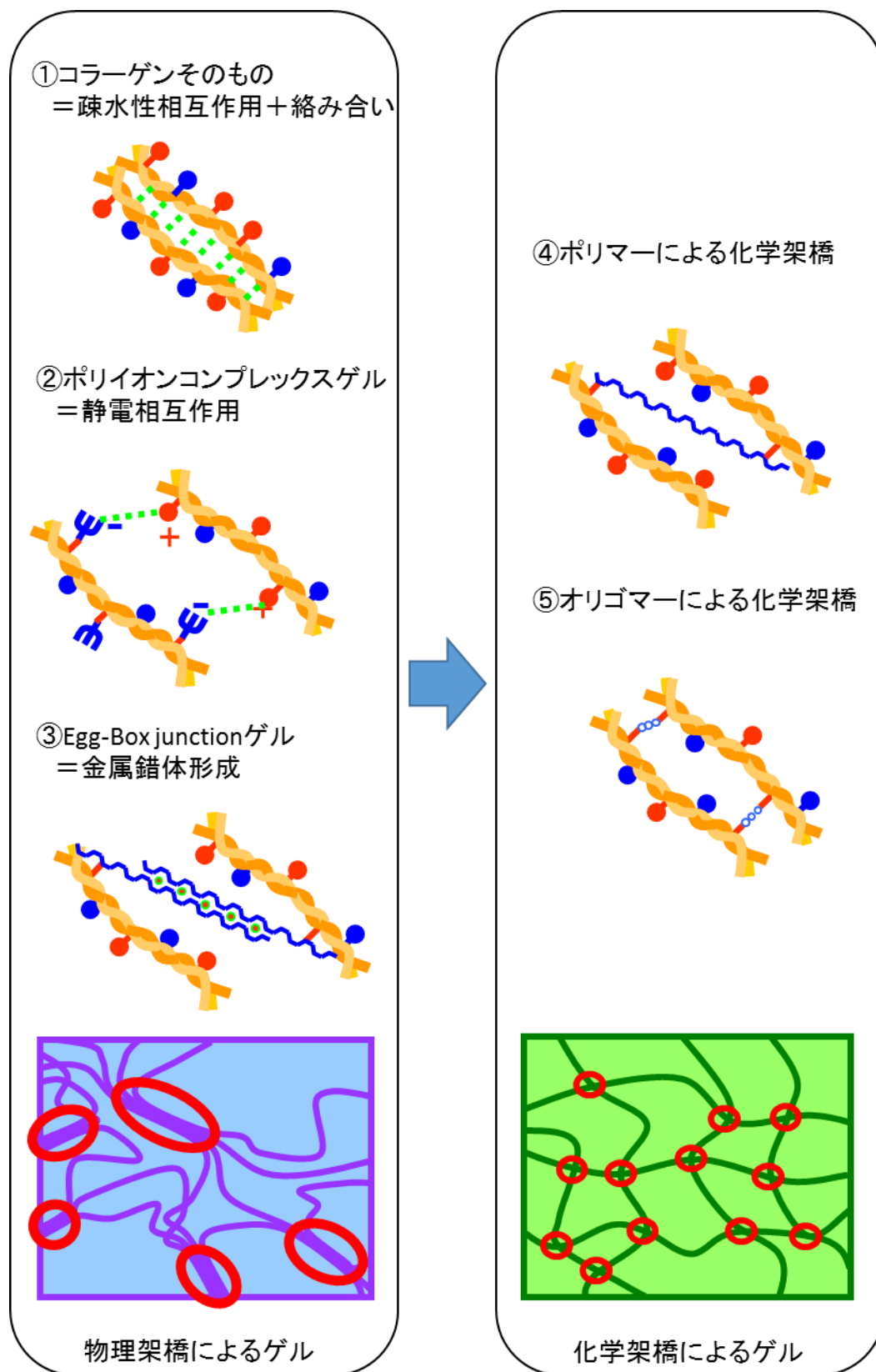


図 2：当研究室で開発したゲルの変遷

電相互作用を利用したポリイオンコンプレックスゲルにより、肝細胞スフェロイドを移植する実験や[32]、金属錯体の形成によるエッグボックスジャンクションゲルを用いた実験を行ってきたが、このような物理架橋によるゲルはイオンバランスや塩濃度の影響を受けやすく、凝集体を形成しやすいため不均一なゲルとなりやすい。また、ひとたび不均一な状態になってしまうと、不可逆的な反応であるため、細胞の存在する部位が偏ってしまい、三次元組織としては不適切となる。

こうした欠点を補うためには、物理架橋ではなく、化学架橋（共有結合）により、アテロコラーゲンをゲル化させるのが良いと考えた。アテロコラーゲンを、アルギン酸誘導体を架橋剤として使用することで化学架橋し、均一で安定なゲルを作成したが、アルギン酸誘導体の分子量が大きいために拡散速度が遅く、反応性が低い、および細胞接着性が低いという問題点があった。

アテロコラーゲンを化学架橋させる架橋剤としては他にアルデヒドやアジリジン、イソシアネート、ハロゲン化合物等が知られているが、いずれも生体への毒性が強いと考えられることから、再生医療における三次元スキャフォールドとしては適さないと考えられてきた[33]。そのため、アテロコラーゲンを主成分としたより良いゲル状スキャフォールド作成のためには、新たな架橋剤の開発が必要となった。

アテロコラーゲンを化学架橋によりゲル化し、スキャフォールドとして機能させるために必要な架橋剤の条件としては、細胞毒性が低く、細胞が生存できる条件下で架橋できる必要があり、さらに、細胞接着性が良く、架橋の程度を調節できることが望ましい。また、アルギン酸では分子量が大きいため条件の良いゲルの作成ができなかったと考えられたことから、相対的に低分子であることも求められた。

アルデヒドは先述の通り架橋剤として一般的であるが、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドに代表されるように、生体への毒性が強いと考えられている。しかしながら、アルデヒド基は水溶性溶媒にも有機溶媒にも溶解可能であり、アテロコラーゲンのアミノ基との反応性に優れ、酸化によりカルボニル基ができれば血管新生を促す増殖因子と静電相互作用が期待できることから、毒性さえコントロールできれば最適な架橋剤である。実際、生体内ではコラーゲンやエラスチンの結合はリシン残基からリシルオキシダーゼにより産生したアルデヒド基が反応の主体となっている[34]。そこで、食物として用いられるオリゴ糖のアルデヒド基を使用すれば、生体への毒性を抑えつつゲル化させることができるのではないかと考え、開発されたものが、当研究室で特許を申請しているオリゴ糖を過ヨウ素酸酸化によりアルデヒド基を作成した架橋剤である。(特願 2012-118380、PCT/JP2013/064433)

オリゴ糖のビシナルジオール基が解離して酸化されることでできたアルデヒド基は、アテロコラーゲン側鎖のアミノ基と化学架橋し、凝集を抑制するため、透明で安定なゲルが作成可能となった。また、アルデヒドの酸化によってできるカルボン酸は、血管新生を促す増殖因子を静電相互作用によって担持できるため、ゲル内での血管構築に優位に働くと考えられた。

申請者の所属する研究室の先行論文[35]において、オリゴ糖の一種であるラフィノースの酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルについて、ゲル化反応の進行指標としてゲルのヤング率を VENUSTRON 触覚センサー（振動数 60Hz、侵入深さ 0.5mm、Axiom）を用いて測定した結果、図 3 のようなカーブを描いてゲル化反応が進行することが示されている。また、ゲル化反応の進行過程でアミノ酸、タンパク質等を含んだ培養液（DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium、Lonza）を投与すると、その直後にゲルのヤング率の上昇が停止し、ほぼ一定を保つことも判明している。これは、培養液の添加によりゲル化反応を制御できるということであり、適度な三次元マトリックスの作成に有効な架橋剤である可能性が示唆された。

本研究では、肝臓、心臓等の大型再生臓器構築への足掛かりとして、オリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンのゲル化技術を最適化するとともに、その有用性について検討する。

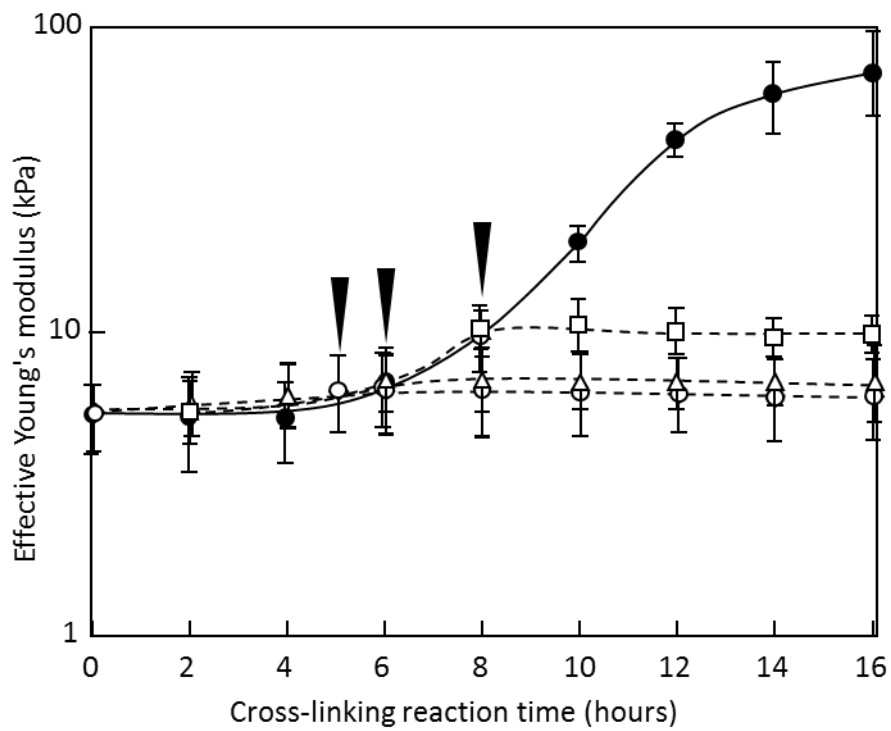


図 3 : ヤング率の推移

● : DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)非添加群、○ : 5 時間後に DMEM 添加した群、△ : 6 時間後に DMEM 添加した群、□ : 8 時間後に DMEM 添加した群、▼ : DMEM 投与のタイミング [文献 35 より引用]

Ⅲ．オリゴ糖酸化物で架橋したゲルの生成と機能に関する検討

1．目的

オリゴ糖とは、単糖類がグリコシド結合によって複数個結合してできた化合物であり、二糖類から多糖類まで多くの種類がある。オリゴ糖酸化物を架橋剤としてアテロコラーゲンゲルを作成するにあたって、各オリゴ糖によるゲル化時間から、大型再生臓器の構築に適したオリゴ糖を探すことを目的とする。

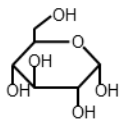
2．方法

・オリゴ糖の選択

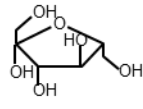
一般に、オリゴ糖は様々なオリゴ糖が混合された状態で販売されていることが多いが、本実験ではそれぞれのオリゴ糖を比較するために高純度の単一オリゴ糖で実験する必要があった。そのため、天然に存在する化合物として、高純度のものが容易に入手できるオリゴ糖を中心として実験を行った。

具体的には、単糖類であるグルコース、フルクトース、ガラクトース、二糖類であるマルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、三糖類であるマルトトリオース、ラフィノース、メレジトース、環状オリゴ糖のうち、六糖の α -シクロデキストリン、七糖の β -シクロデキストリン、八糖の γ -シクロデキストリン（以上、和光純薬）を使用した。（図4）

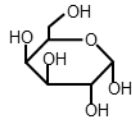
単糖



Glucose
(Glc)

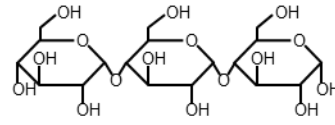


Fructose
(Fru)

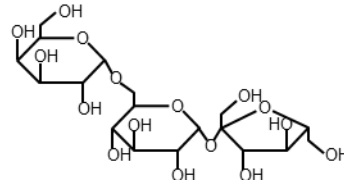


Galactose
(Gal)

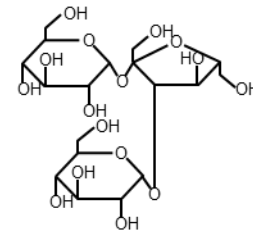
三糖



Maltotriose
(Mtt)

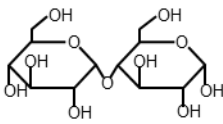


Raffinose
(Raf)

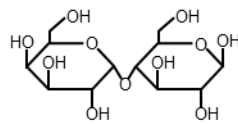


Melezitose
(Mez)

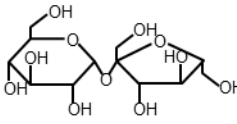
二糖



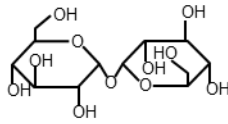
Maltose
(Mal)



Lactose
(Lac)

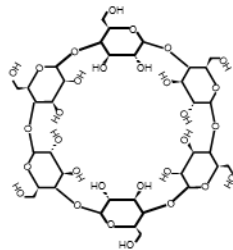


Sucrose
(Suc)

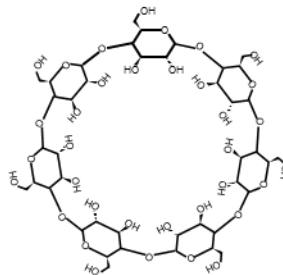


Trehalose
(Tre)

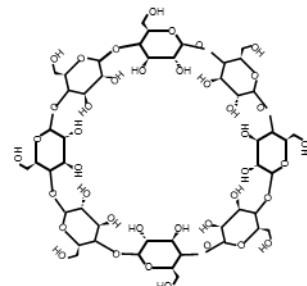
環状オリゴ糖



α-cyclodextrin
(α-CD)



β-cyclodextrin
(β-CD)



γ-cyclodextrin
(γ-CD)

図4：今回検討した糖類

糖類のうち、下線を引いたものは非還元糖、引いていないものは還元糖

・オリゴ糖酸化物の作成

各種糖を 20mmol/l (mM)の水酸化ナトリウム溶液 (NaOH、和光純薬) に溶解し、氷冷下で過ヨウ素酸ナトリウム 3mmol (和光純薬) を添加した。この際、各種糖の糖ユニット (ex. 二糖類なら 2) に対して過ヨウ素酸ナトリウムを 1 : 1 のモル比で混合した。1mM の NaOH で pH を 6 に調節し、暗室で 4℃に保った状態で一晚過ヨウ素酸酸化反応を行った。この過程でオリゴ糖のビシナルジオール基が酸化されて解裂することで、アルデヒド基が形成される。

酸化反応の進行度については吸光度の変化によって確認した。それぞれの糖と過ヨウ素酸ナトリウムを混合したサンプルを 0.04ml ずつ用意し、それぞれ 5ml の蒸留水で希釈して UV-vis spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc.)を用いて 223nm で吸光度を測定し、過ヨウ素酸の残留濃度を調べることで、酸化反応の進行を確認した[36]。

反応終了後の反応溶液に 40ml のエタノール (和光純薬) を添加してヨウ素化合物を析出させ、除去した。除去後の溶液を微量用遠心濃縮器 (MV-100、トミー精工) で濃縮した後、減圧乾燥することで、オリゴ糖酸化物を得た。

・オリゴ糖酸化物の生成過程におけるアルデヒドの含有量測定

上記の過程において、過ヨウ素酸酸化が行われた時点でのアルデヒド含有

量と、減圧乾燥後のアルデヒド含有量について測定した。一晚過ヨウ素酸酸化を行った反応液から 1ml を採取し、4ml のエタノールを添加した。沈殿物をろ過後の溶液から 0.1ml ずつ 2 サンプル採取し、1 サンプルはそのまま 0.4ml 蒸留水で希釈した（乾燥前サンプル）。もう 1 サンプルは、微量用遠心濃縮器 MV-100 で濃縮した後、減圧乾燥したものを 0.5ml の蒸留水に溶解した（乾燥後サンプル）。これらのアルデヒド含有量は、Que ら[37]の報告に従って、アセチルアセトン法を用いて測定した。具体的には、0.2ml アセチルアセトン（和光純薬）、0.3ml の氷酢酸（和光純薬）、15.4g の酢酸アンモニウム（和光純薬）を 100ml の蒸留水に溶解してアセチルアセトン溶液を作成し、アセチルアセトン溶液 0.25ml とそれぞれの糖と過ヨウ素酸ナトリウムを混合したサンプル 0.05ml、蒸留水 0.2ml、を混合した後、415nm の吸光度を UV-vis spectrophotometer を用いて測定した。また、乾燥後サンプルの吸光度を乾燥前サンプルの吸光度で除することにより、乾燥前後でのアルデヒドの残存割合を計算した。

・オリゴ糖酸化物によるアテロコラーゲンの混合

架橋剤を蒸留水で溶解し 5%の架橋剤溶液を作成した。そのうち 60 μ l を pH 7.6 に調整した 0.7%アテロコラーゲン／リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline: PBS）溶液 1ml に溶解し、よく混合した後、20℃で湿潤箱に入

れて反応を進行させた。各種糖を使用して作成した架橋剤ごとに、アテロコラーゲンのゲル化に必要な時間を測定した。それぞれの反応溶液に定期的にガラス棒を接触させ、離した際に試料が糸を引かなくなる時間をゲル化時間と定義した。

・オリゴ糖酸化物の毒性評価

オリゴ糖酸化物のアルデヒド基が有する毒性について、ラフィノース酸化物をモデルサンプルとして用いることにより、架橋剤として一般的に知られている、グルタルアルデヒド、および 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (WSC: Water soluble carbodiimido) との比較で検討した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell、Lonza) を 6 代継代培養したものを、96 穴マイクロプレートの各ウェルに 5200 個ずつ播種した後、培養液 (EBM-2: Endothelial Cell Basal Medium、Lonza) 100 μ l を添加し 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。グルタルアルデヒド (0.001、0.01、0.1、1%)、ラフィノース酸化物 (0.001、0.01、0.1、1%)、もしくは WSC (ペプチド研究所) と N-ヒドロキシスクシンイミド (ペプチド研究所) の等モル比混合液 (WSC 換算で 0.001、0.01、0.1、1%) を各ウェルに 10 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した。各ウェルの培養液を交換してインキュベーターで 1 時間静置した後、30 分ごとに 4

回各ウェルの培養液を交換した。Cell counting kit-8 溶液（同仁化学）を 10 μ l 添加し 2 時間呈色反応を行った後、450nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、Cell Counting Kit 法に基づいて以下のように計算した。

$$\text{細胞生存率(\%)} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$$

As = 検体の吸光度（架橋剤、細胞、Cell Counting Kit 溶液の入った well）

Ac = 陰性対象の吸光度（細胞、Cell Counting Kit 溶液の入った well）

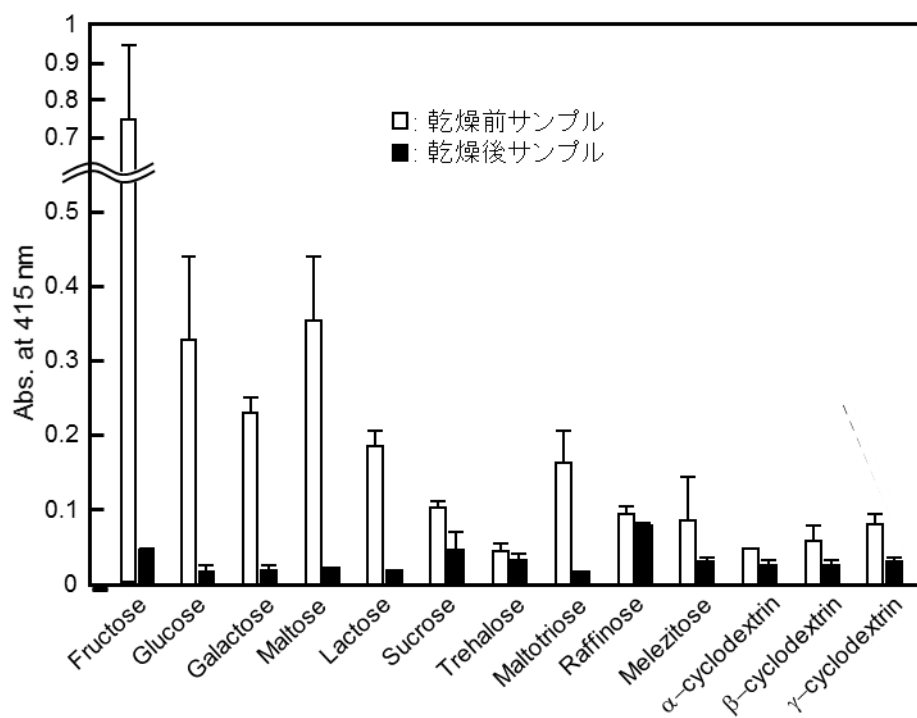
Ab = ブランク吸光度（培地、Cell Counting Kit 溶液のみの well）

3. 結果

・ 各種オリゴ糖酸化物におけるアルデヒド含有量

各種オリゴ糖酸化物における減圧乾燥前後での 415nm における吸光度を図 5 (A)に、減圧乾燥前後でのアルデヒドの残存割合を図 5 (B)に示す。乾燥前のアルデヒド含有量は、単糖類であるフルクトースが最も多く、マルトース、グルコース、ガラクトース、ラクトース、マルトトリオース、スクロースと続き、ここまでは 415nm における吸光度が 0.1 を超えた。一方、乾燥後のアルデヒド量は、ラフィノースが最も多く、スクロース、フルクトース、トレハロースと続くが、それ以外の糖ではほとんど差が見られなかった。一方、乾燥前後のアルデヒドの残存割合は、ラフィノースが最も高く、トレハロース、メレジトース、スクロー

(A)



(B)

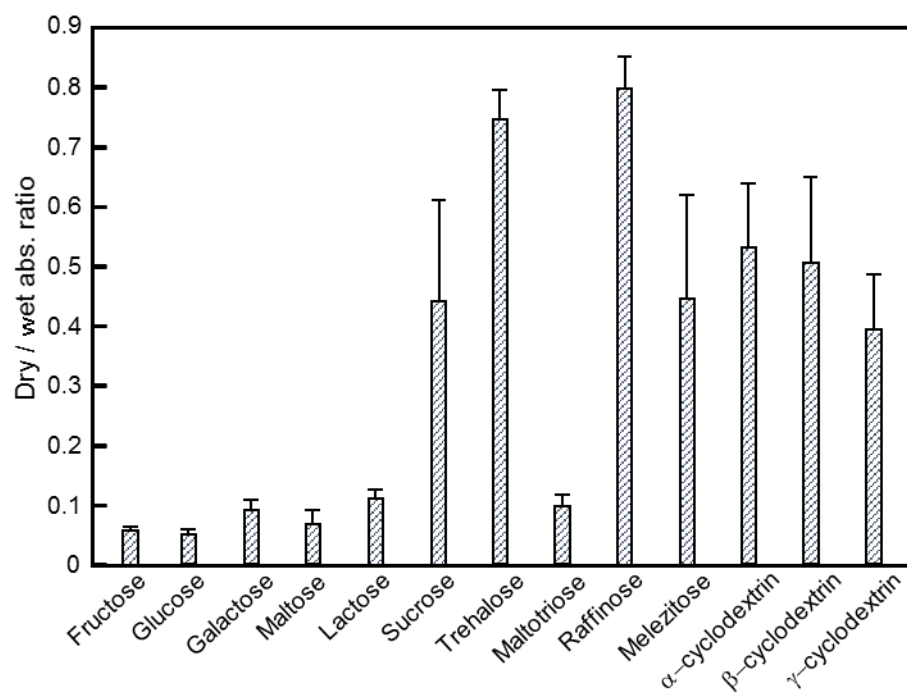


図 5 (A) : 各種糖酸化物の減圧乾燥前後における 415nm での吸光度、
図 5 (B) : 減圧乾燥前後におけるアルデヒドの残存割合

スおよびシクロデキストリンでは 40%以上残存しているのに対して、フルクトース、グルコース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、マルトトリオースでは 10%以下しか残存していなかった。実際に架橋剤として使用するアルデヒドは乾燥後のサンプルであるが、今回検討した糖類の中ではラフィノースが最も乾燥後のアルデヒド含有量が多く、アルデヒドの残存割合も高いことが分かった。

・各種オリゴ糖酸化物によるゲル化時間の差

図 6 に示す通り、単糖類酸化物を架橋剤として用いたものでは、ゲル化に 1-2 週間という長い時間が必要となるのに対して、直鎖のオリゴ糖では糖ユニットが大きくなるにしたがってゲル化時間が短くなり、三糖類のラフィノースではおよそ 5 時間と、直鎖の糖類で最もゲル化時間が短かった。また、環状オリゴ糖はおよそ 1-1.5 時間とさらにゲル化が早いことが分かった。

・オリゴ糖酸化物の毒性

各種架橋剤のそれぞれの濃度における細胞毒性を図 7 に示す。ラフィノース酸化物も大量投与では毒性が出るが、他の一般的な架橋剤と比較して高濃度域での細胞毒性が低かった。同一濃度での毒性は概ねグルタルアルデヒドが最も

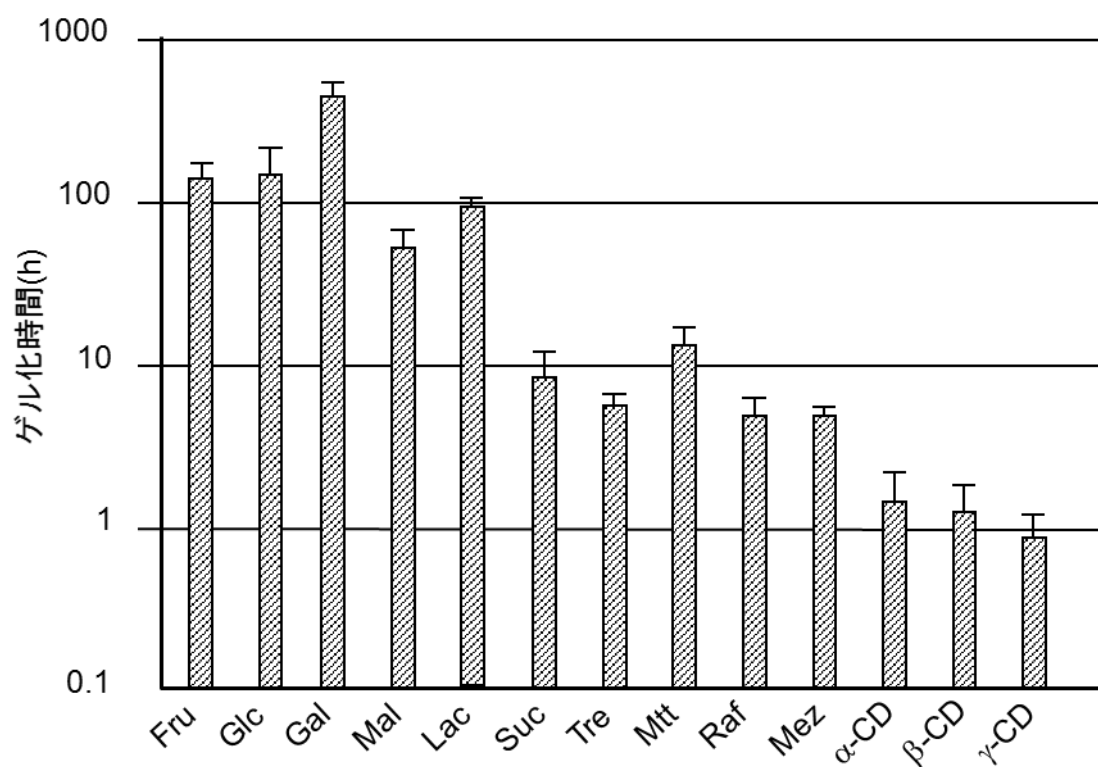


図6：各種糖酸化物によるゲル化時間

Fru: フルクトース、Glc: グルコース、Gal: ガラクトース、
 Mal: マルトース、Lac: ラクトース、Suc: スクロース、
 Tre: トレハロース、Mtt: マルトトリオース、Raf: ラフィノース、
 Mel: メレジットース、α-CD: α-シクロデキストリン、
 β-CD: β-シクロデキストリン、γ-CD: γ-シクロデキストリン

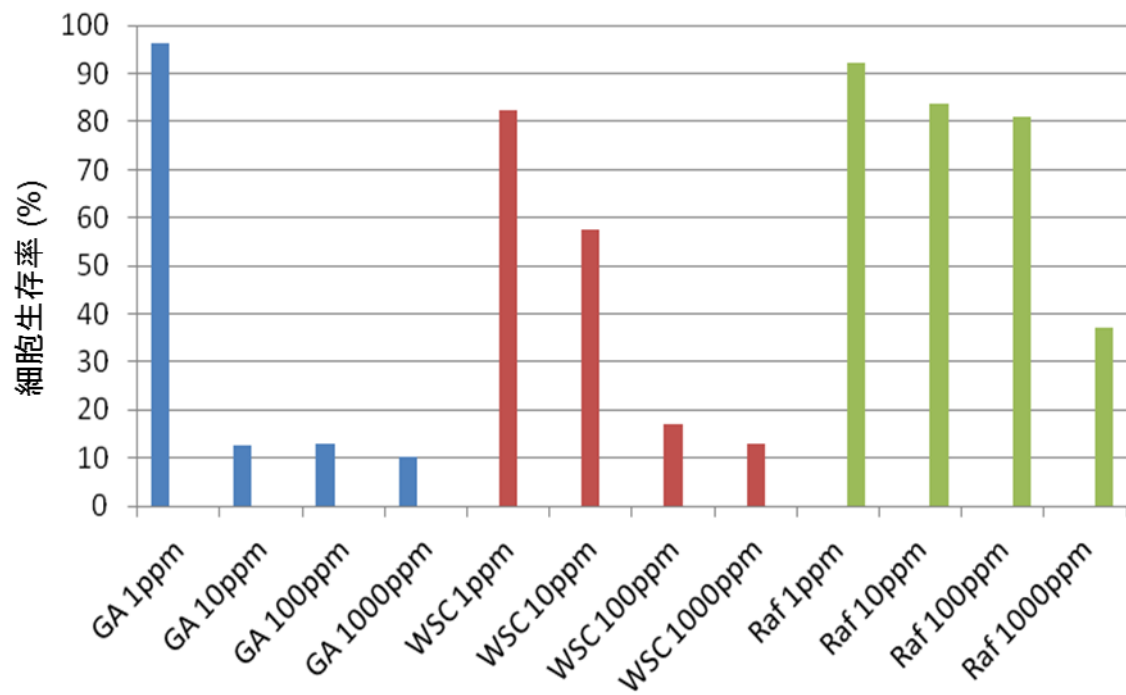


図 7 : オリゴ糖酸化物の細胞毒性

GA: グルタルアルデヒド、WSC: 水溶性カルボジイミド、
Raf: ラフィノース酸化物、ppm: parts per million

毒性が強く、WSC、ラフィノース酸化物の順で毒性が低くなる結果となった。

4. 小括

オリゴ糖酸化物の減圧乾燥後のアルデヒド含有量は、ラフィノースが最も多かった。ゲル化時間は、直鎖の糖類ではラフィノースが最も短く、環状オリゴ糖はさらに短かった。ラフィノース酸化物は他の架橋剤よりも高濃度で投与しても細胞毒性が低く、ゲル化に有利と考えられた。

先行研究においてアルギン酸を架橋剤として使用した際には、アルギン酸が高分子のため、拡散速度が遅く、反応性が低く、細胞接着性が低いという結果を得ていたため、本研究では、低分子の架橋剤の方が効率よくアテロコラーゲンを架橋できるとの仮説を立てた。そのため、反応に必要なアルデヒドの含有量が最も多く、直鎖の糖類で最もゲル化時間が短く、毒性試験でも良好な結果が得られたラフィノース酸化物を使用してIV章の検討を行った。また、直鎖の糖類よりも分子量が大きくなるが、ゲル化時間が短かった環状オリゴ糖については、検討した三種のシクロデキストリンともほぼ同様の結果であったため、最も入手の容易な β -シクロデキストリン酸化物を用いてV章の検討を行った。

IV. ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したゲルの機能に関する検討

1. 目的

前章では、直鎖の糖類で最も架橋剤として良好な成績を示したものがラフィノース酸化物であることが明らかになった。また、ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルは、コラーゲン濃度 0.7%、pH 7.6、ラフィノース酸化物濃度 0.2%、20℃の条件下では、およそ 5 時間でゲル化することも示された。本章では、ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルにつき、細胞増殖や、生体内での血管誘導に最適な架橋度について検討することとした。以後、ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルを「Raf ゲル」と表記する。

2. ゲル内における HUVEC の形態変化

In vitro において HUVEC を Raf ゲルと混和し、HUVEC の形態変化を観察することで、Raf ゲル内で HUVEC がネットワーク形成するにあたって最適な条件を探ることとした。

a. 方法

・Raf ゲルと HUVEC の混和のタイミング

アテロコラーゲンとラフィノース酸化物を混合し、20℃で架橋反応を開始さ

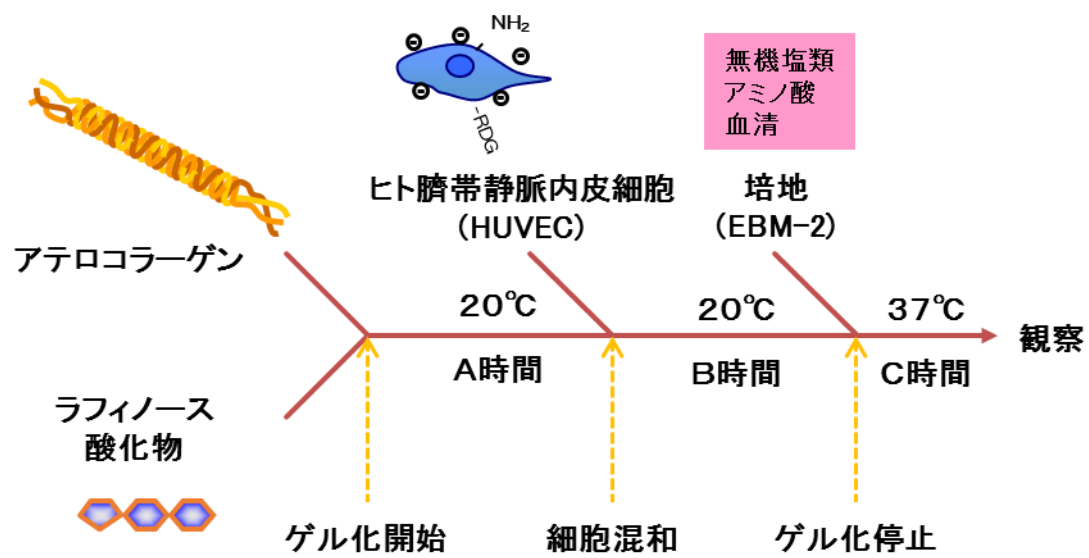


図 8 : Raf ゲルの作成と細胞の混和

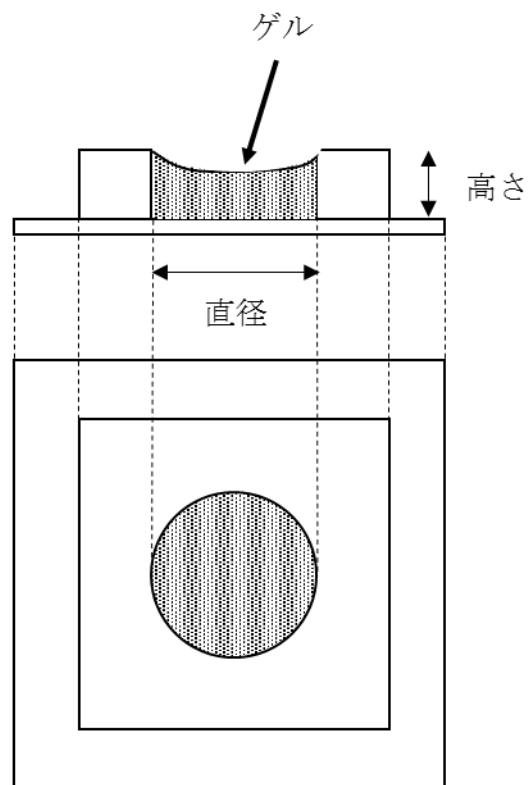


図 9 : in vitro 試験における型枠

せてから、ゲル化が完了する以前に HUVEC を混和した。HUVEC を加えるタイミングを表記するため、架橋反応開始から HUVEC を混和させるまでの時間を A 時間、HUVEC を混和させてから培養液 (EBM-2: Endothelial Cell Basal Medium) でゲル化を停止させるまでの時間を B 時間と定義した。また、ゲル化停止後、37℃の CO₂ インキュベーターで培養し、形態を観察するまでの時間を C 時間とした。(図 8)

・細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定と観察時期の決定

上記の B に相当する時間は、細胞が培養液の存在しない条件で生存する必要がある時間であることから、まずこの時間を決定することから検討を始めた。そのため、A を 4 時間に固定し、 7.0×10^4 個の HUVEC を 45 μ l のゲル反応液に混和の後、B を 0.5、1.0、2.0 時間と 3 点を割り付けた。本実験においては、GFP (Green Fluorescent Protein) 発現 HUVEC (GFP-HUVEC、Angio-Proteomie) を使用し、図 9 のように直径 5mm、高さ 2mm の塩化ビニール製型枠内にゲルを流し込んだ。この際、同一サンプルについて C=0、8、16、24、48、72、120 時間の 7 ポイントで蛍光顕微鏡 (BioZero BZ-8000、キーエンス) を用いて観察を行った。ここで、HUVEC の増殖状態を十分に確認できる Z を決定した。(n=4)

・ *Raf* ゲルと血管新生因子の親和性の評価

理論上は架橋剤のアルデヒド基が酸化されてカルボン酸ができると、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF）等の血管新生因子を静電相互作用により担持できると考えられている。実際に bFGF を様々な濃度で投与した際のゲルの挙動について確認することとした。図 8 の過程において、B を 1 時間に固定した以外は上記実験と同様の条件で、GFP-HUVEC をゲルと混和する際に同時に bFGF を 10、100、1000、10000ng/ml の濃度となるように添加した後、直径 5mm、高さ 2mm の塩化ビニール製型枠内にゲルを流し込んだ。同一サンプルについて C=0、8、16、24、48、72、120 時間の 7 ポイントで蛍光顕微鏡 BioZero BZ-8000 を用いて観察を行った。bFGF を添加していないものは上記試験（細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定と観察時期の決定）の B=1.0 を代用した。（n=4）

・ *Raf* ゲル作成開始後、細胞を混和するまでの至適時間の決定

上記の試験（細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定と観察時期の決定）にて決定した B、C を用いて（B=1 時間、C=48 時間）、次は HUVEC が形態変化するうえで適した A を決定することとした。ゲルの中心付近を観察することを目的として、図 9 のように直径 6mm、高さ 2mm のビニール製型枠を使用し、

120 μ l のゲル反応液を作成後、A=3.5、5.0、6.5 の 3 ポイントで HUVEC (7.0 \times 10⁴ 個) を混和し、決定されたタイミングでゲル化停止および観察を行った。なお、本実験からは次項にのべるように HUVEC の形態変化の数値化を行った、数値化に際しての画像処理が円滑に進むように、HUVEC の細胞密度を低く設定した。本実験以降は、死細胞によるノイズを防ぐため GFP を発現していない通常の HUVEC を使用した。(n=6)

・HUVEC 形態変化の数値化による評価

HUVEC の形態変化の評価を、より客観的に実施するため、ネットワーク形成の数値化を行う方法を確立した。なお、予備実験により、Raf ゲルの上面は型枠の無い部分であることから、培養環境への移動等による培養液の振動によりわずかながら削られる傾向があること、Raf ゲル底面はビニールの平面であり、シャーレと同様に細胞が増殖しやすいことが判明していた。そのため、細胞増殖能の評価にあたっては、同部位の情報を取り除いて評価することが望ましいと考えた。ゲル全体をカルセイン染色 (Calcein AM solution、同仁化学) 後、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5 II、Leica Microsystems) を使用し、ゲルの底部 (型枠) から 100 μ m 上方を最下面とし、そこから上方へ 100 μ m の範囲を 2 μ m おきに 51 スライス撮影することとした。そのようにして得られた画像を重ね合わせるこ

とで得られた画像（Z-stack 画像）を評価の対象とした。この画像を、画像解析ソフト Adobe Photoshop Elements version 3.0（アドビシステムズ）を使用しカラー情報を破棄して白黒変換を行った後、血管新生定量ソフト Version 2.0（クラボウ）を用いてレベル補正、線形化を全ての画像について同一条件で行った。この過程で、全体に占める細胞の面積の割合、細胞からの分岐数を算出した。

・統計解析

以後全ての実験において、統計処理は JMP pro 11.0.0（SAS institute Inc.）を使用した。2 群間の比較では t 検定を、多群間の比較では Tukey-Kramer の HSD 検定を行い、両側 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

b. 結果

・細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定と観察時期

それぞれの B、C における GFP-HUVEC の撮影像を図 10 に示す。C=72 時間までは培養中のため型枠内での撮影だが、培養により型枠の透明性が低下し観察しづらくなったため、C=120 時間では型枠から外して撮影した。B=2.0 時間は時間経過にかかわらず細胞間のネットワーク形成に乏しく、B=0.5、1.0 時間はともに細胞間のネットワークが形成される様子が観察された。B=0.5 時間と

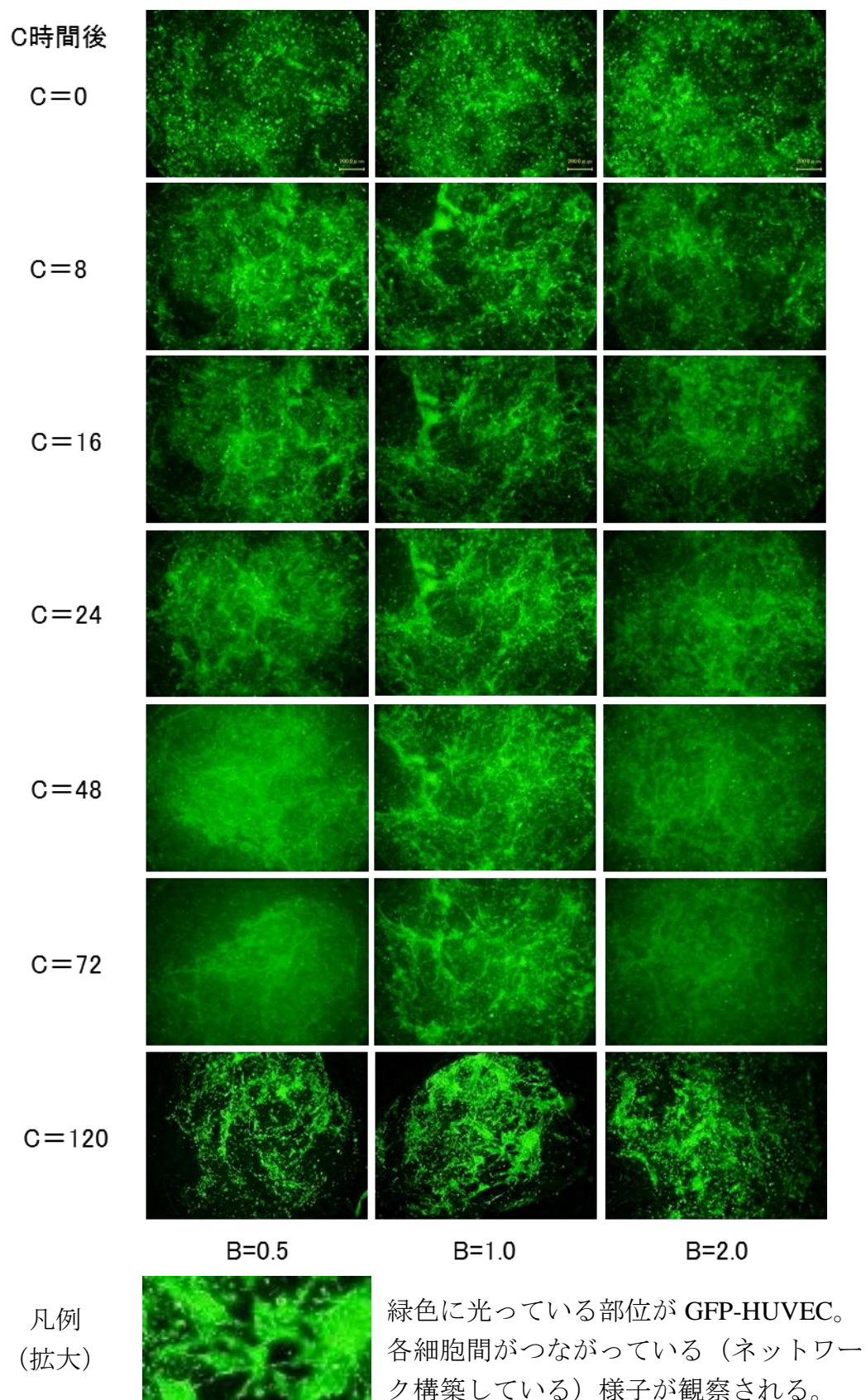


図 1 0 : ゲル化停止までの時間による GFP-HUVEC の増殖
 C=120 については型枠から外して撮影した

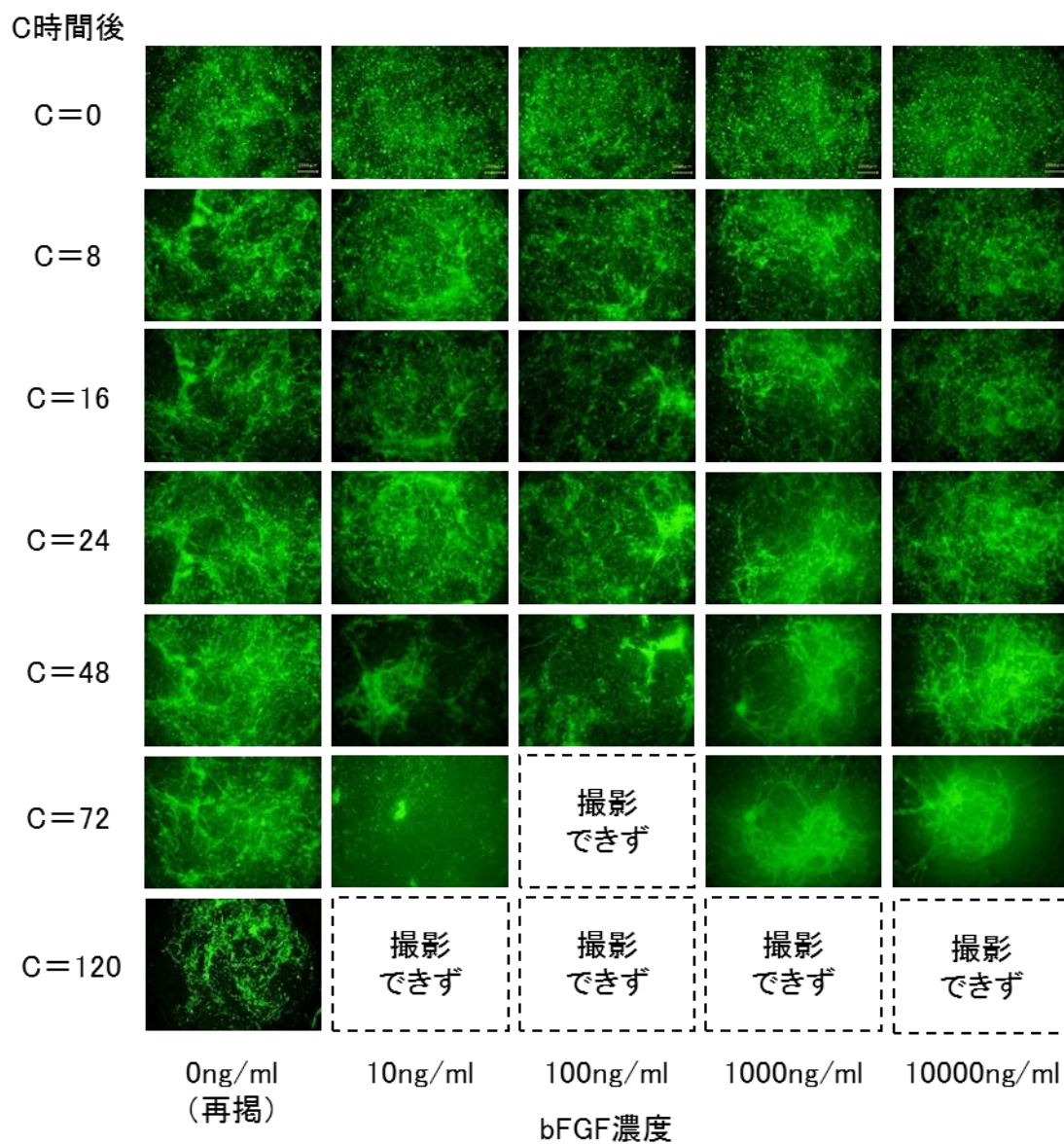
1.0 時間では、明らかな差異は見られなかったが、 $B=1.0$ 時間の方が徐々に成長していく様子をはっきりと確認できた。また、 $C=48$ 時間まではネットワークが増加しているが、それ以降ではゲルが小さく退縮していく様子が観察された。

・ *Raf* ゲルと血管新生因子の親和性

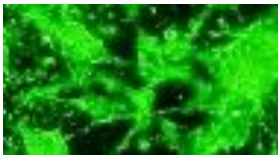
それぞれの bFGF 濃度における経時的な変化を図 1 1 に示す。bFGF の濃度にかかわらず、bFGF 添加群では非添加群に対してゲルが早期から小さく収縮していく様子が観察され、bFGF 濃度 10ng/ml における $C=72$ 時間に示すように、強く収縮して型枠から自然と外れ、 $C=120$ 時間では観察できなかった。

・ *Raf* ゲル作成開始後、細胞を混和するまでの至適時間

上記実験（細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定と観察時期の決定）より $B=1.0$ 時間、 $C=48$ 時間の条件で行うこととした結果、図 1 2 のような Z-stack 画像が得られた。 $A=3.5$ 、 5.0 時間では HUVEC によるネットワーク形成が観察できたが、 $A=6.5$ 時間では HUVEC が *Raf* ゲル内にできた亀裂に沿って平面的な増殖を示しており、期待していた三次元の形態変化を示していないため、解析対象外とした。図 1 2 に示す解析経過において、レベル補正後の画像を用いて面積の割合を算出し、線形化の画像を用いて細胞からの分岐数を算出した。 A



凡例
(拡大)



緑色に光っている部位が GFP-HUVEC。
各細胞間がつながっている（ネットワーク構築している）様子が観察される。

図 1 1 : それぞれの bFGF 濃度における GFP-HUVEC の増殖

ブランクの部分はゲルが型枠から外れてしまい、さらに収縮したため、撮影できなかった

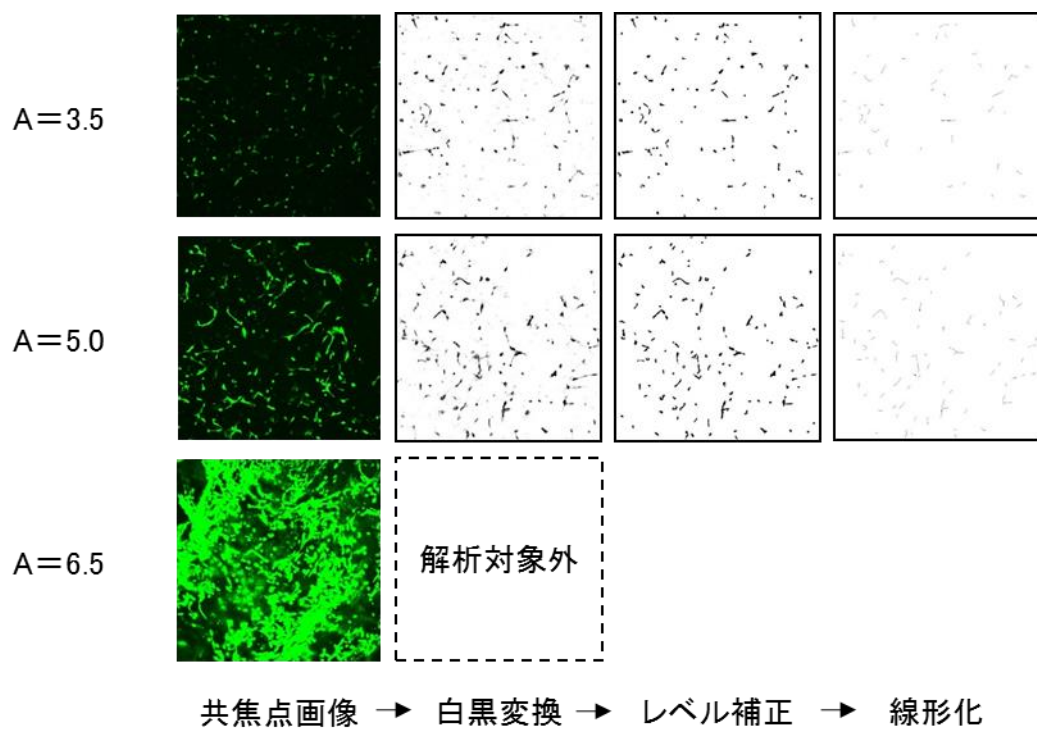


図 1 2 : HUVEC 混和までの時間による違いと解析経過

A=6.5 は HUVEC の増殖形態が異なるため解析対象外とした
共焦点画像において緑色の部位、白黒変換後は黒色の部位が HUVEC

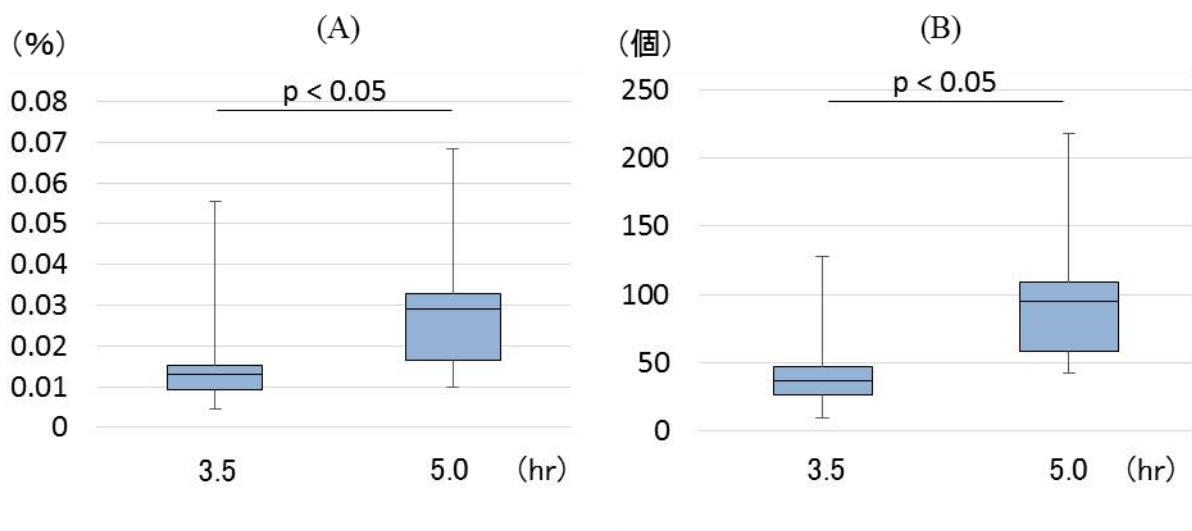


図 1 3 (A) : 全体に占める細胞の面積の割合、(B) : 細胞からの分岐数

=5.0 時間が A=3.5 時間に対して面積の割合、細胞からの分岐数のいずれも有意に高値であった。(図 1 3)

3. In vivo での血管誘導能の観察

a. 方法

以下、すべての動物実験は、動物実験委員会の承認を得たうえで「東京大学動物実験実施マニュアル」を順守して行った。

・Raf ゲルによる移植マテリアルの作成とラットへの移植

アテロコラーゲンとラフィノース酸化物を十分に混和し、架橋反応を開始させてから 20℃で 5 時間経過後に、厚さ 2mm にスライスした直径 4mm の ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 製人工血管 (Gore-Tex Stretch Vascular Graft、日本ゴア) 内に流し込んだ。その後 20℃でさらにゲル化を進め、培養液 (DMEM) をかけてゲル化反応を停止させた。ePTFE 人工血管に反応液を入れてから、ゲル化反応を停止させるまでの時間を D 時間と定義した。その後、37℃のインキュベーターで over night 置いた後、ラットへ移植した。(図 1 4)

血管誘導に適した Raf ゲルのゲル化時間を検討するため、D=0.5、1.0、1.5 時間の 3 ポイントでゲルを作成した。(n=4)

ラットは Jcl:Wistar ラット (8-9 週齢、オス、約 300g、日本クレア) を使用し

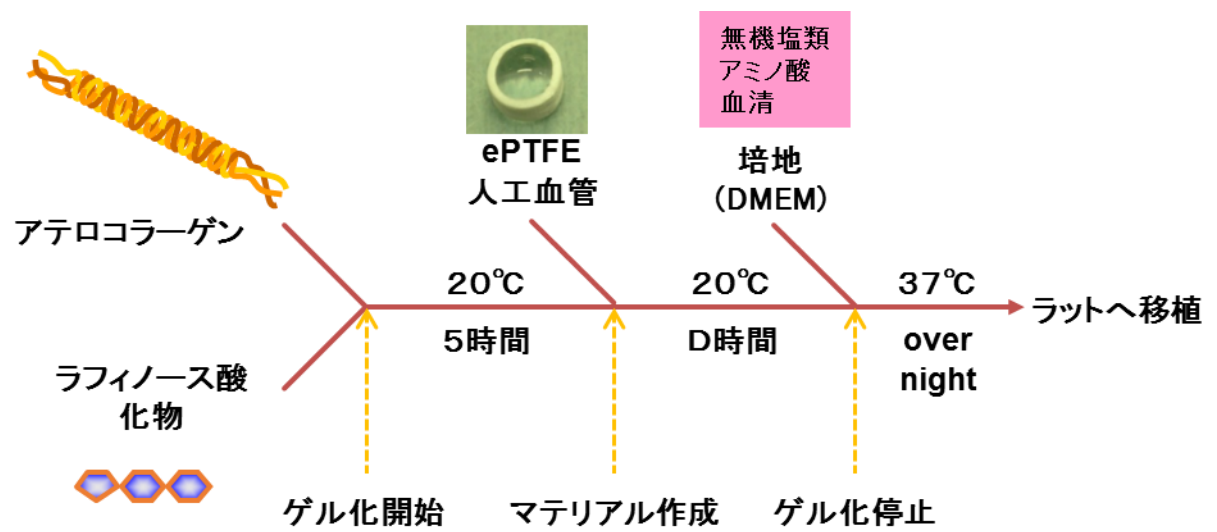


図 1 4 : Raf ゲルでの移植マテリアルの作成

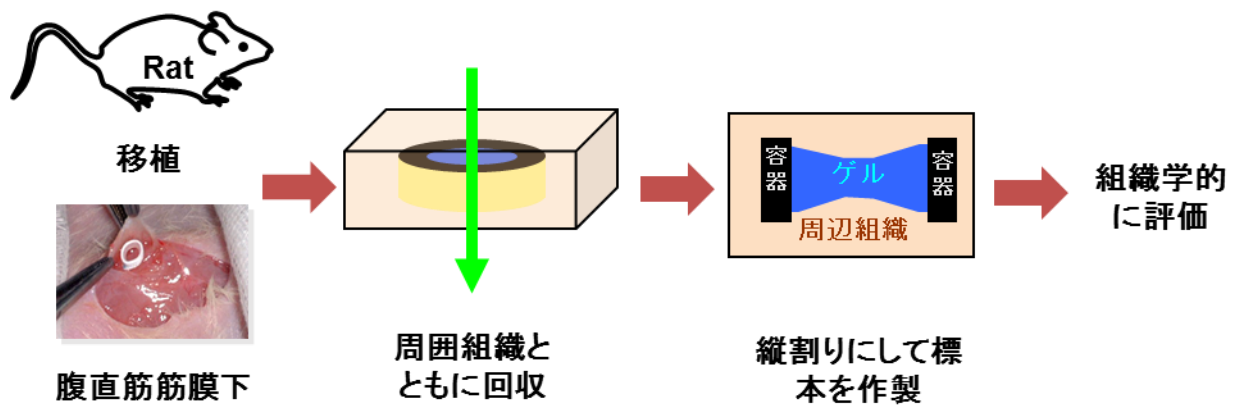


図 1 5 : ラットへの移植と回収

た。ケタミン塩酸塩(約 7 μ g/gBW、第一三共)、キシラジン塩酸塩(約 700 μ g/gBW、バイエル薬品) 混合液の腹腔内投与による全身麻酔下に、傍正中で腹直筋前鞘を切開し、腹直筋と前鞘の間に移植マテリアルを埋植した。埋植後 5 日目にケタミン塩酸塩、キシラジン塩酸塩混合液の過剰投与により安楽死を確認直後に、5%パラホルムアルデヒド心臓注入による還流固定を行い、周囲組織と一塊にしてマテリアルを回収した。ePTFE 製人工血管のリング中央で二分割した後パラフィン包埋し、5 μ m の厚さにスライスして、組織切片を作成した。(図 1 5)

・ *Raf* ゲルと血管新生因子の *in vivo* における至適濃度の決定

生体内での血管誘導に血管新生因子の添加が有効であるかどうかを検証するため、D=1.0 時間の条件で、人工血管内に流し込む際に bFGF をそれぞれ 10、100、1000、10000ng/ml の濃度となるように添加してゲルを作成し、上記と同様の方法でラット筋膜下に埋植した。なお、bFGF 非添加のものについては上記試験における同条件のものと比較した。(n=4)

・ 血管誘導能の評価方法

作成した組織切片に対して Hematoxylin-Eosin (H.E.) 染色を行い、移植マテリアルの状態を観察した。続いて、抗 CD31 抗体を用いた免疫染色を行った。免疫

染色は、パラフィン除去、再水和の後 Target Retrieval Solution (Dako) でオートクレーブをかけて抗原性の不活化を行い、Peroxidase-Blocking Solution (Dako) 常温 10 分にて内因性ペルオキシダーゼを除去。Carbo-Free Blocking Solution (Vector) 常温 30 分にて非特異的反応をブロックし、一次抗体として抗 CD31 モノクローナル抗体×100 (Fitzgerald) を 4℃ over night で反応させた。二次抗体として Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG Antibody, rat adsorbed (Vector) 常温 60 分処理し、ABC Elite ABC kit (Vector) 常温 30 分にて二次複合体を形成し、DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector) にて発色した後、ヘマトキシリンで後染色を行った。デジタル顕微鏡 (PROVIS AX80、オリンパス) で撮影した後、血管新生の定量的評価のため、Win ROOF (Version 5.7、三谷商事) を使用して移植マテリアル内のゲルの面積 (以下総面積)、抗 CD31 抗体染色陽性の血管数 (以下血管数)、および抗 CD31 抗体染色陽性血管の内腔の面積 (以下新生血管面積) を測定し、

$$\text{血管密度 (個/mm}^2\text{)} = \text{血管数} / \text{総面積}$$

$$\text{血管占有率 (\%)} = (\text{新生血管面積} / \text{総面積}) \times 100$$

を算出した。

b. 結果

- ・ *Raf* ゲルにおける血管誘導に適したゲル化時間の決定

それぞれの D における H.E.染色像、抗 CD31 抗体染色像、およびその解析結果を図 1 6 に示す。いずれのサンプルも、ゲルの辺縁に移植母床より新生血管が入り込んでおり、血管密度、血管占有率のいずれについても有意差が見られなかった。

・ *Raf* ゲルと血管新生因子の *in vivo* における至適濃度の決定

それぞれの bFGF 濃度における H.E.染色像、抗 CD31 抗体染色像、およびその解析結果を図 1 7 に示す。いずれもゲルの辺縁より内部に向かって移植母床より新生血管が入り込んでいる。血管密度については、いずれの群にも有意差を認めなかった。血管占有率については、bFGF 非添加群と 100ng/ml 添加群の間に $p=0.036$ と有意差を認めたが、その他には有意差を認めなかった。

4. 小括

ゲル内に HUVEC を混和し形態変化を観察する実験では、ゲル化開始後 5 時間で有意に良好な HUVEC のネットワーク形成を認めた。*Raf* ゲルのゲル化時間である 5 時間を過ぎて、ゲル化開始後 6.5 時間経過してから HUVEC を混和すると、三次元での増殖は見られず、ゲル内で平面上に増殖していた。これは、ゲル化が進行してある程度硬くなった後、細胞が混和されたために、ゲルが一度破砕

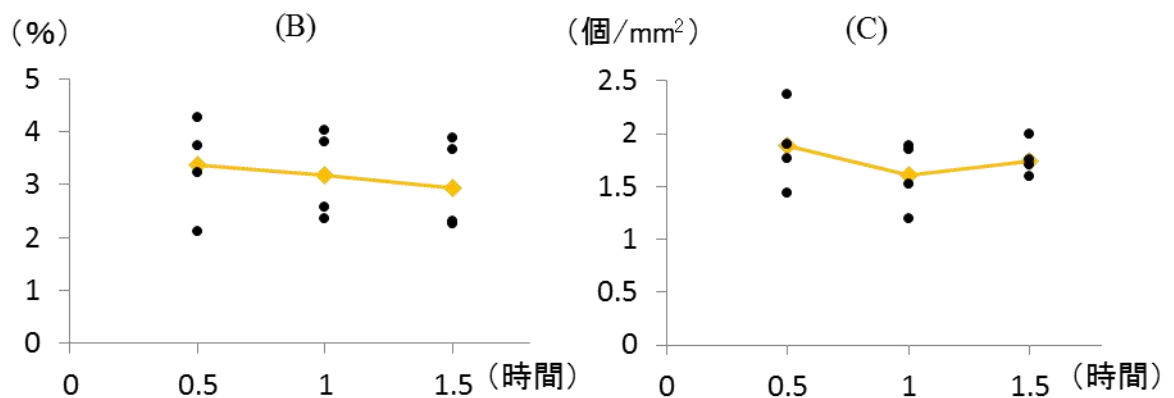
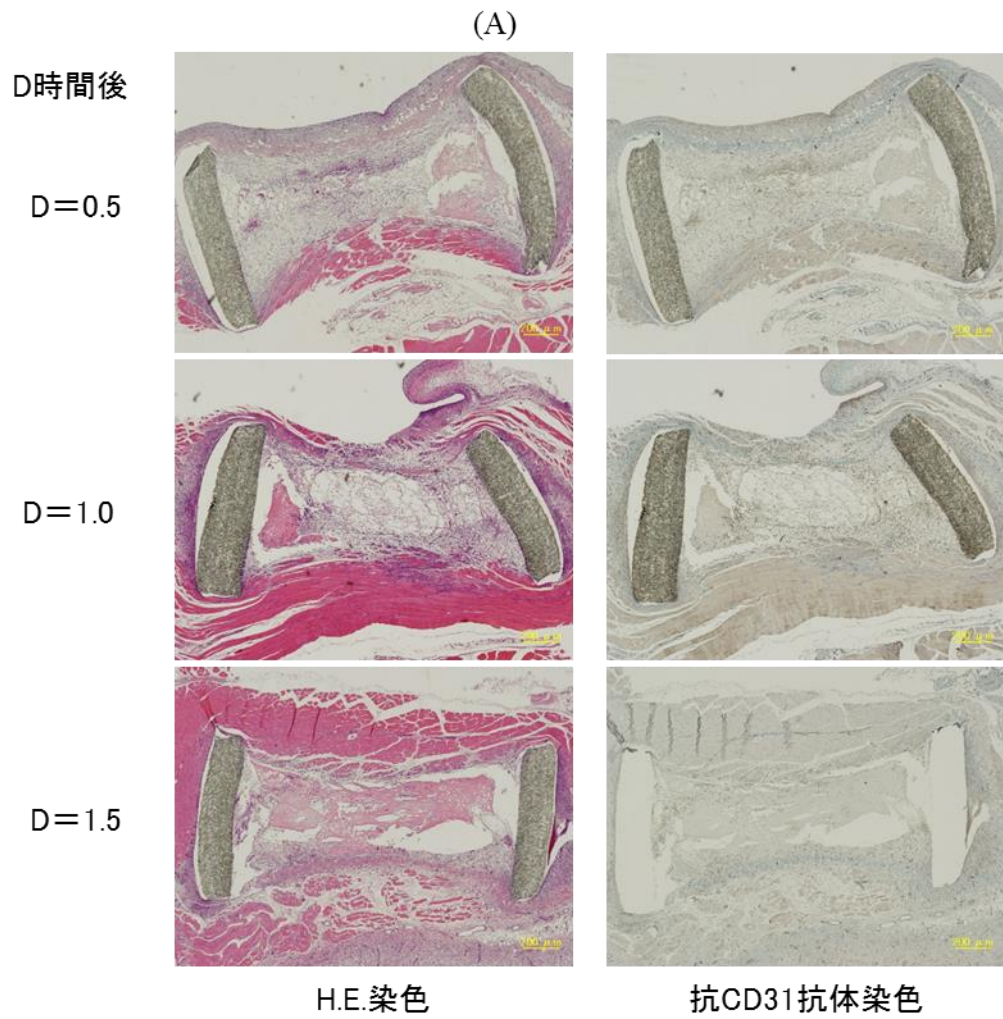


図 1 6 (A) : 架橋反応停止までの各時間における移植マテリアルのH.E.染色像および抗CD31抗体染色像、(B) : 血管占有率、(C) : 血管密度

(A) のH.E.染色における黄色点線 () の内側がゲルの領域
染色の過程で人工血管が外れたものあり

(B), (C) において—黄色線は4要素の平均を示す

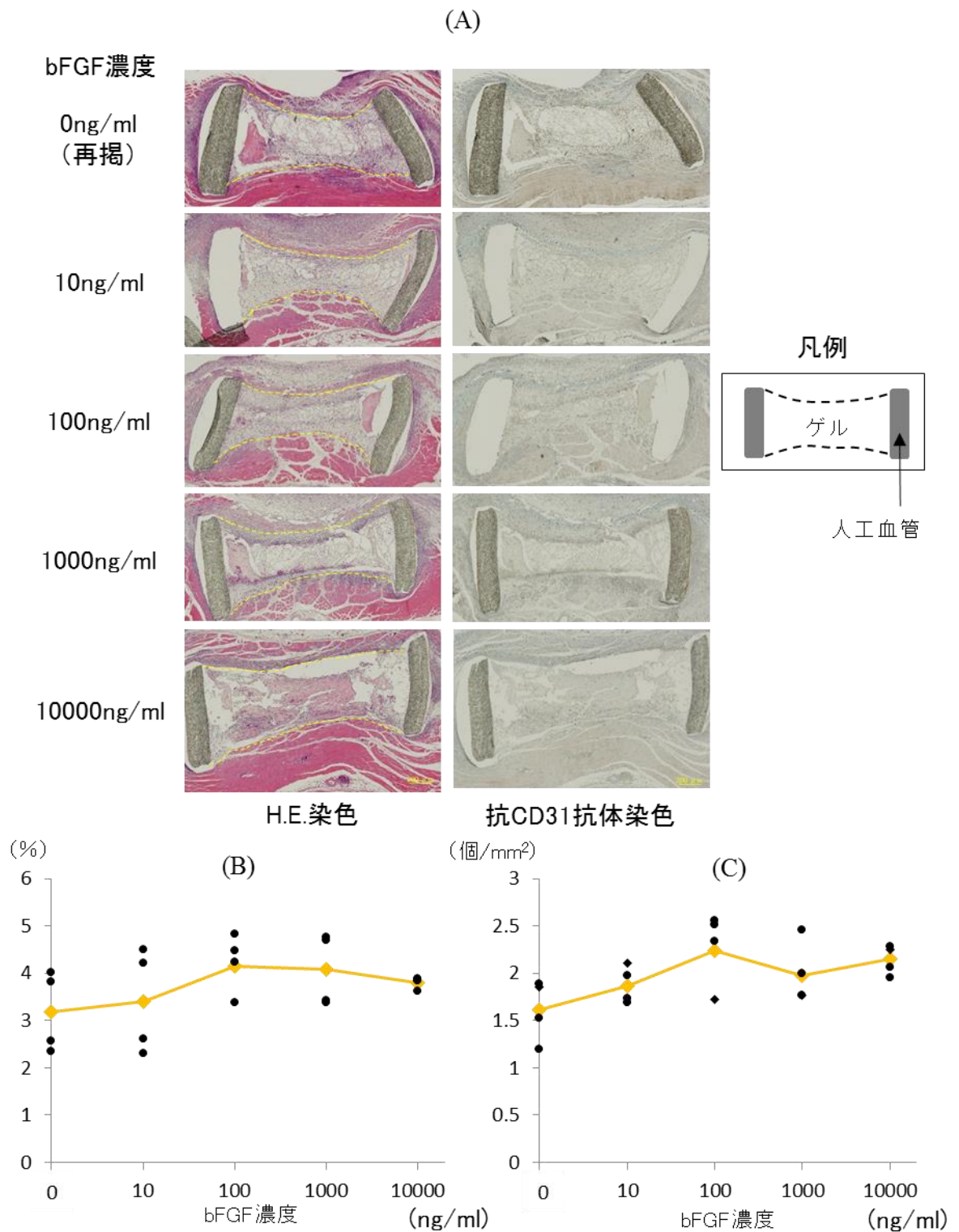


図 1 7 (A) : 各bFGF濃度における移植マテリアルのH.E.染色像および抗CD31抗体染色像、(B) : 血管占有率、(C) : 血管密度

(A)のH.E.染色における黄色点線 (---) の内側がゲルの領域
 染色の過程で人工血管が外れたものあり
 (B) , (C) において—黄色線は4要素の平均を示す

された後に再度ゲル化が進むことにより、ゲル内の硬度に「ムラ」が発生し、HUVEC がすでに硬くなった部分を避けて破砕された間隙を縫うように増殖した結果と考えられた。ゲルのラット筋膜下への移植実験ではいずれの時間においてもゲル内に移植母床から新生血管が入り込む様子が観察されたが、ゲル化時間の違いによる差は見られなかった。血管新生因子を添加する実験では、HUVEC の形態変化によりゲルが収縮する様子が観察され、ラット筋膜下への移植実験では bFGF 100ng/ml の濃度で添加すると、bFGF 非添加のものと比較して血管占有率が有意に良いことが示された。

V. β -シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したゲルの機能に関する検討

1. 目的

第Ⅲ章に示す通り、環状オリゴ糖酸化物は、直鎖オリゴ糖酸化物と比較して分子量は大きくなるが、架橋剤として使用した際のアテロコラーゲンのゲル化時間は短かった。環状オリゴ糖のうち、入手の容易な β -シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲル（以下「 β CD ゲル」）は、コラーゲン濃度 0.7%、pH 7.6、 β -シクロデキストリン酸化物濃度 0.2%、20℃の条件下では、およそ 1 時間でゲル化することも示された。本章では、 β CD ゲルを使用して、細胞増殖や、生体内での血管誘導に最適な架橋度について検討することとした。

2. ゲル内における HUVEC の形態変化

In vitro において HUVEC を β CD ゲルと混和し、HUVEC の形態変化を観察することで、 β CD ゲル内で HUVEC がネットワーク形成するにあたって最適な条件を探ることとした。

a. 方法

- ・ β CD ゲルと HUVEC の混和のタイミング

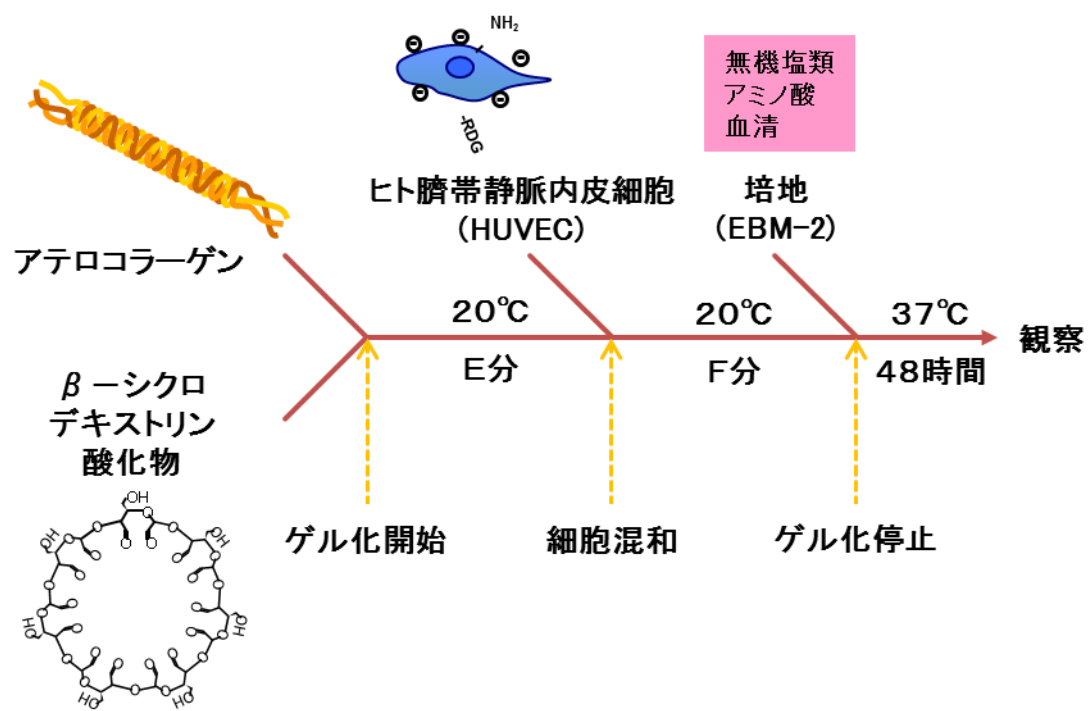


図 1 8 : β CD ゲルと細胞の混和

Raf ゲルでの実験と同様に、アテロコラーゲンと β -シクロデキストリン酸化物を混合し、20℃で架橋反応を開始させてから、HUVEC を混和して塩化ビニール製の型枠に流し込むまでの時間を E 分と定義した。その後 20℃で培養し、培養液 (EBM-2) を添加することでゲル化を停止させるまでの時間を F 分と定義した。これを 37℃の CO₂ インキュベーターで培養し、48 時間後の形態を観察した。Raf ゲルの実験と異なり、反応時間が短いため、時間の単位を分に変更した。

(図 18)

・ β CD ゲル作成開始後、細胞を混和するまでの至適時間の決定

前章の Raf ゲルの実験において、HUVEC を培養液の存在しない環境下で 1 時間においても、以後の HUVEC の発育には影響が出ないことが示されたうえ、 β CD ゲルはゲル化時間が 1 時間程度であるため、まず E 分から決定することとした。Raf ゲルに HUVEC を混和する実験では、細胞を混和するまでの時間が長いと、ゲルがある程度硬くなった後に細胞が混和されることにより、ゲルが一度破碎されることとなり、HUVEC が平面状に増殖するという現象が観察されたため、ゲルが柔らかいうち HUVEC と混和する必要があると考えた。しかしながら、反応液の粘性が上がらない段階で細胞を混和すると、ゲル化が進む前に細胞が沈んでしまうため、細胞が沈まない程度に粘性が増しているタイミングを求める

こととした。E を 10、20、30 分の 3 ポイントとし、F=60 分とした。Raf ゲルの実験と同様に、直径 6mm、厚さ 2mm の塩化ビニール製型枠（図 9）を使用し、120 μ l のゲル反応液に 1.5×10^5 個の HUVEC を包埋した。評価方法は、Raf ゲルで行った Z-stack 画像を応用することとした。カルセイン染色後、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 II を使用し、ゲルの底部（型枠）を最下面とし、そこから上方へ 500 μ m の範囲を 10 μ m おきに 51 スライス撮影した後、側面からの view を再構成して観察した。（n=2）

・細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定

上記実験（ β CD ゲル作成開始後、細胞を混和するまでの至適時間の決定）で最適と考えられた E を用いて以後の実験を行った（E=20 分）。直径 5mm、高さ 2mm の塩化ビニール製型枠を使用し、 1.3×10^5 個の HUVEC を 45 μ l のゲル反応液に混和し、F=10、20、30、40、50、60、80、90 分の 8 ポイントでゲル化反応を停止させた。評価方法としては、カルセイン染色後、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 II を使用し、ゲルの底部（型枠）から 100 μ m 上方を最下面とし、そこから上方へ 100 μ m の範囲を 2 μ m おきに 51 スライス撮影して得られた Z-stack 画像を使用した。この画像を、画像解析ソフト Adobe Photoshop Elements version 3.0 を使用しカラー情報を破棄して白黒変換を行った後、血管新生定量ソフト

Version 2.0 を用いてレベル補正、線形化を全ての画像について同一条件で行った。この過程で、全体に占める細胞の面積の割合、細胞の長さの合計、細胞の分岐数、一定の長さ（10 μ m）以上の枝の数を算出し、統計解析を行った。（n=8）

b. 結果

・ β CD ゲル作成開始後、細胞を混和するまでの至適時間の決定

側面からの再構成画像を図 19 に示す。E=10 分では、底面近くの方が、上方に比較して細胞の濃度が高い様子が観察され、沈殿していることが示唆されるが、E=20、30 分では底面からの距離にかかわらず濃度が同様である様子が観察された。柔らかいほどゲルを破砕するリスクが減ることから、最短の E が望ましいと考えられたため、以後の実験は E=20 分で行うこととした。

・ 細胞混和後ゲル化停止までの至適時間の決定

それぞれの F に対する Z-stack 画像を図 20 に示した。F=10 分ではゲルが固まらず、画像が得られなかったため、解析対象外とした。図 21 に全体に占める細胞の面積の割合、細胞の長さの合計、細胞の分岐数、一定の長さ（10 μ m）以上の枝の数についての解析結果を示した。全ての解析結果において、細胞混和後からゲル化停止までの時間が短い方が、ネットワーク形成は良好であり、細胞混

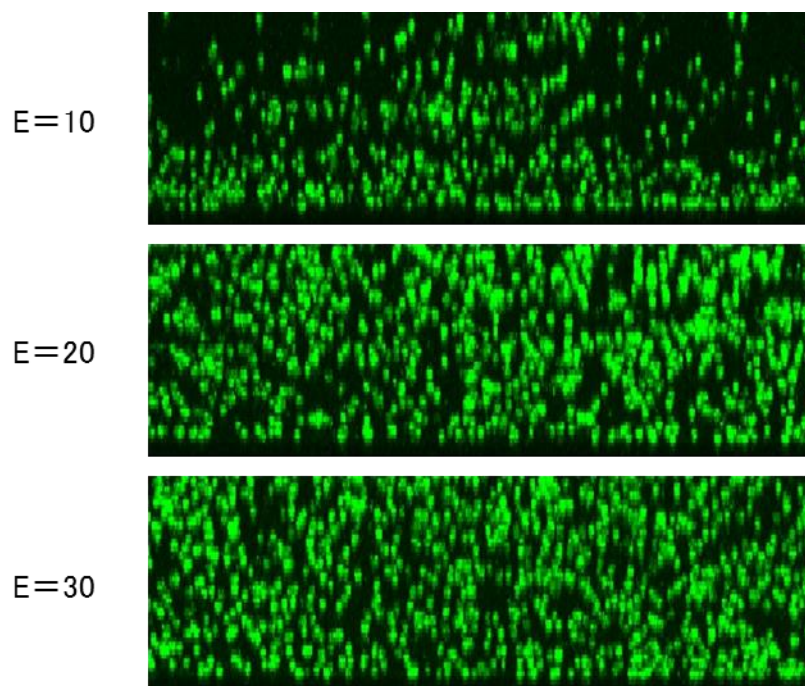


図 1 9 : ゲル作成後細胞混和までの時間による違い
側面からの再構成像。緑色の点が HUVEC。

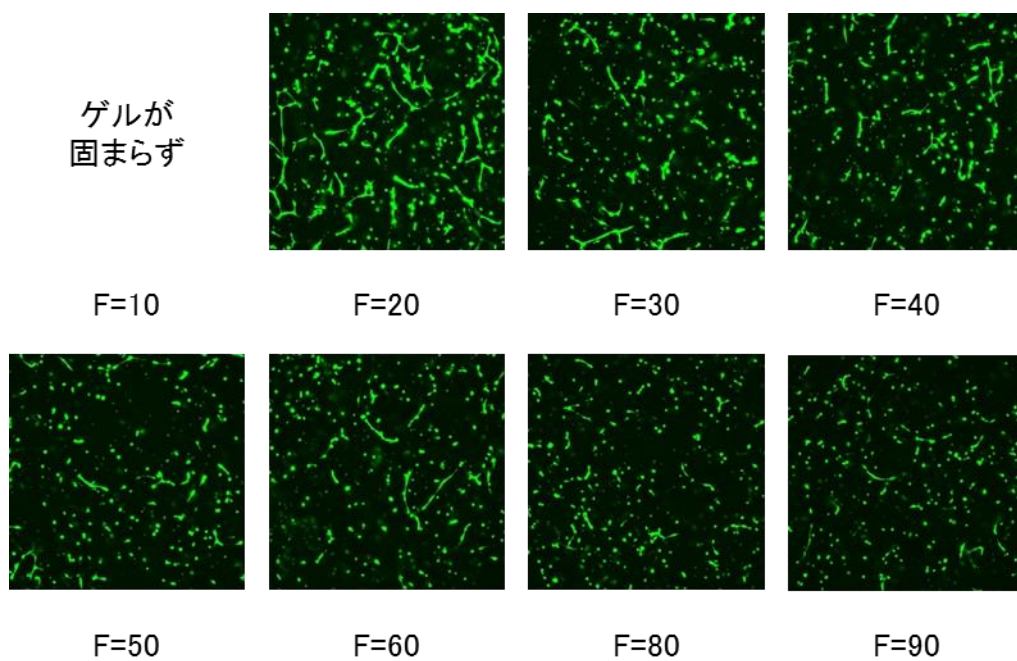


図 2 0 : 細胞混和後ゲル化停止までの時間による違い
緑色の部位が HUVEC。

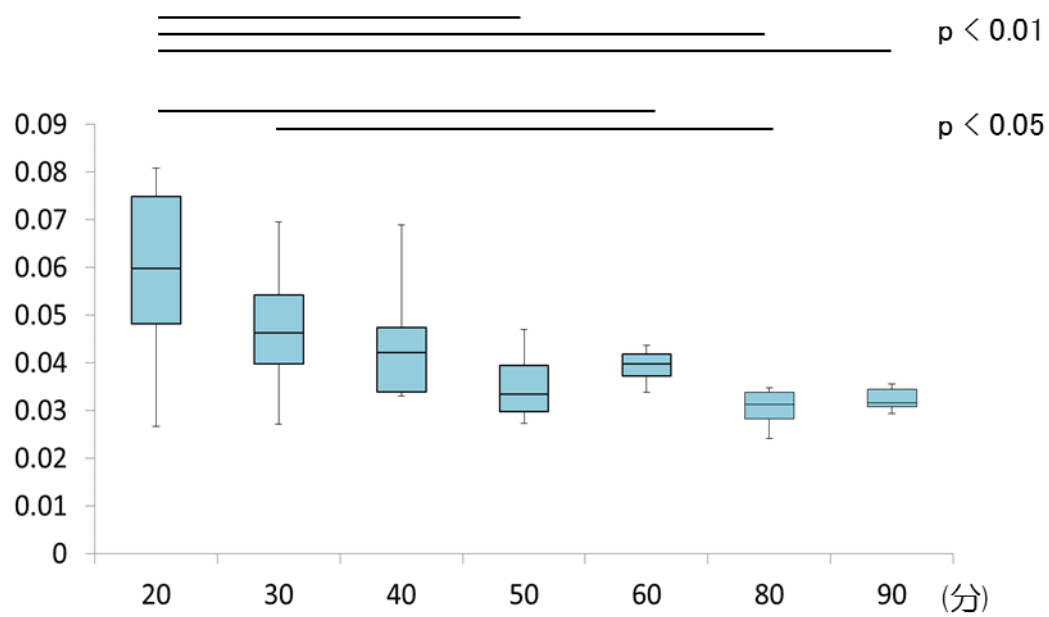


図 2 1 (A) : 全体に占める細胞の面積の割合

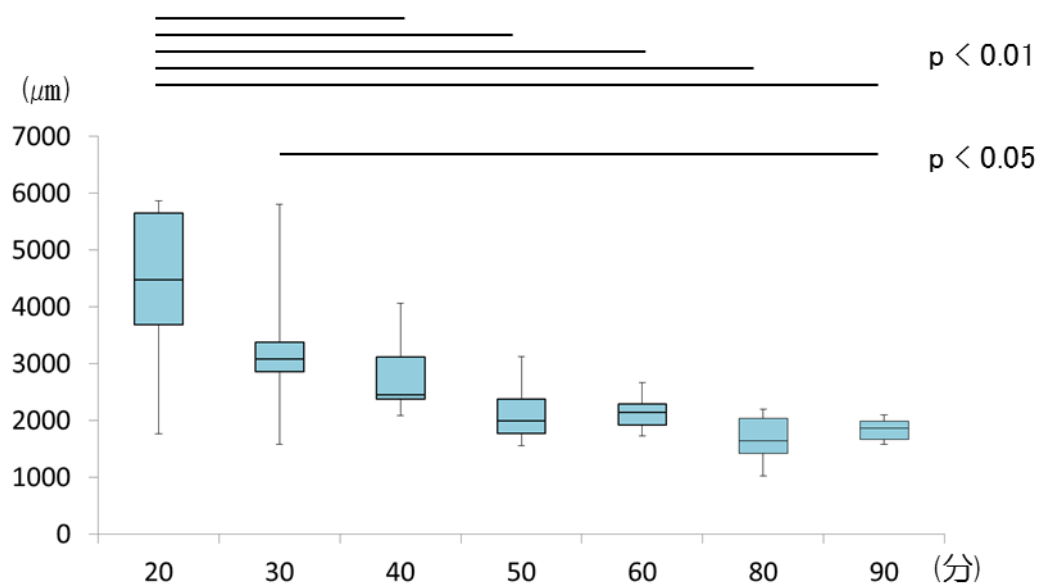


図 2 1 (B) : 細胞の長さの合計

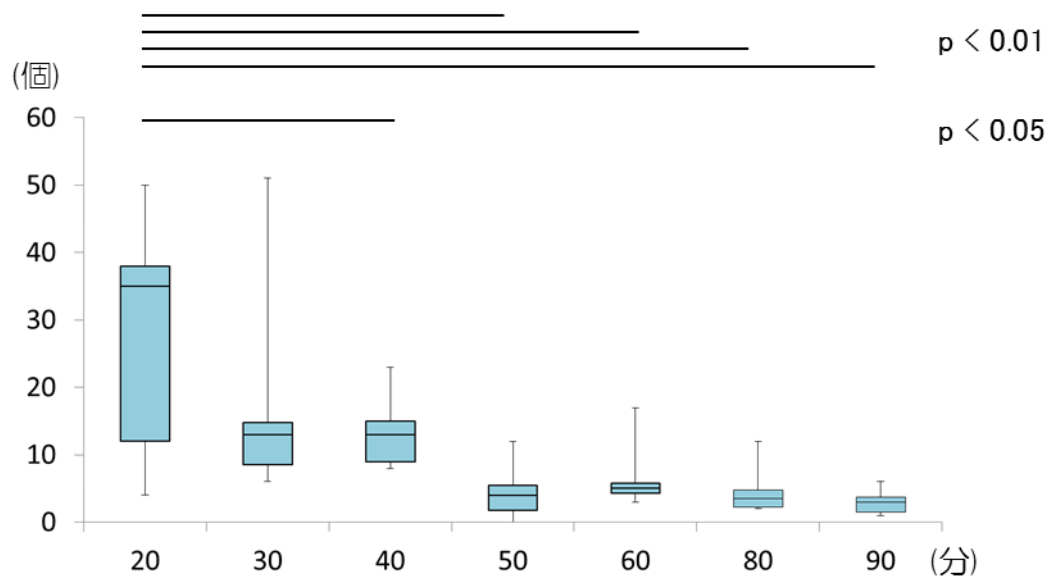


図 2 1 (C) : 細胞の分岐数

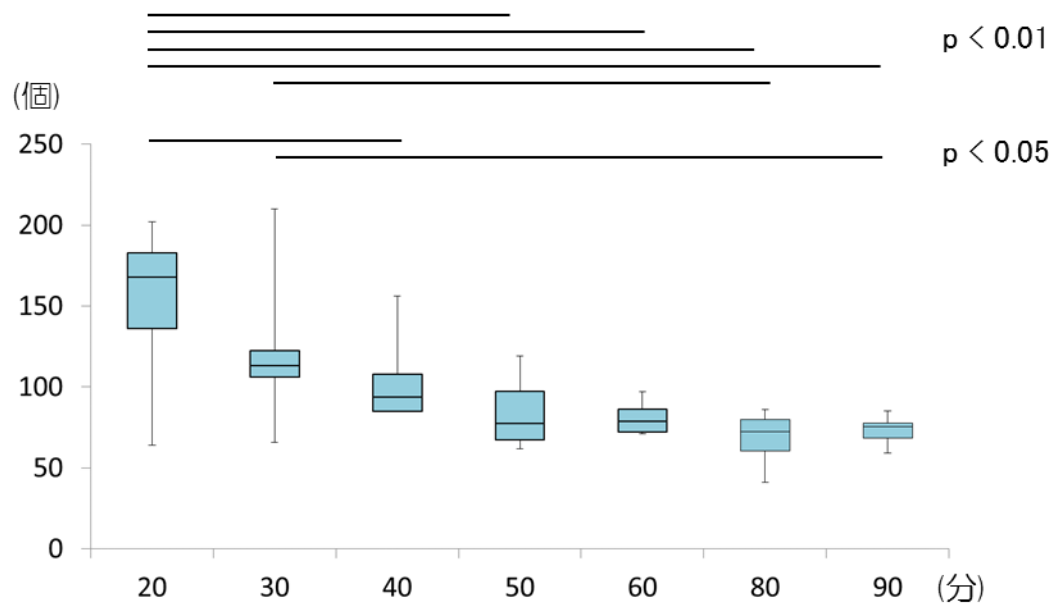


図 2 1 (D) : 一定の長さ以上の枝の数

和後からゲル化停止までの時間が長い方が、ばらつきは小さかった。F=20 分では面積の割合を除いて F=40 分以上と比較し有意に良好であった。また、面積の割合についても F=20 分は F=50 分以上と比較し有意に良好であった。

3. In vivo での血管誘導能の観察

a. 方法

・ β CD ゲルによる移植マテリアルの作成とラットへの移植

アテロコラーゲンと β シクロデキストリン酸化物を十分に混和し、架橋反応を開始させてから 20℃で 20 分経過後に、厚さ 2mm にスライスした直径 4mm の ePTFE 製人工血管内に流し込み、さらに 20℃でインキュベーションして、培養液 EBM-2 を添加してゲル化を停止するまでの時間を、G 分と定義した。G=20、30、40、50、60 の 5 ポイントで β CD ゲルを作成し、37℃の CO₂ インキュベーターで over night 置いた後、ラットへ移植した。(図 2 2)

ラットは Jcl:Wistar ラット (8-9 週齢、オス、約 300g、日本クレア) を使用した。ケタミン塩酸塩、キシラジン塩酸塩混合液の腹腔内投与による全身麻酔下に、傍正中で腹直筋前鞘を切開し、腹直筋と前鞘の間に移植マテリアルを埋植した。埋植後 5 日目に安楽死させ、5%パラホルムアルデヒド心臓注入による還流固定を行い、周囲組織と一塊にしてマテリアルを回収した。ePTFE 製人工血管のリン

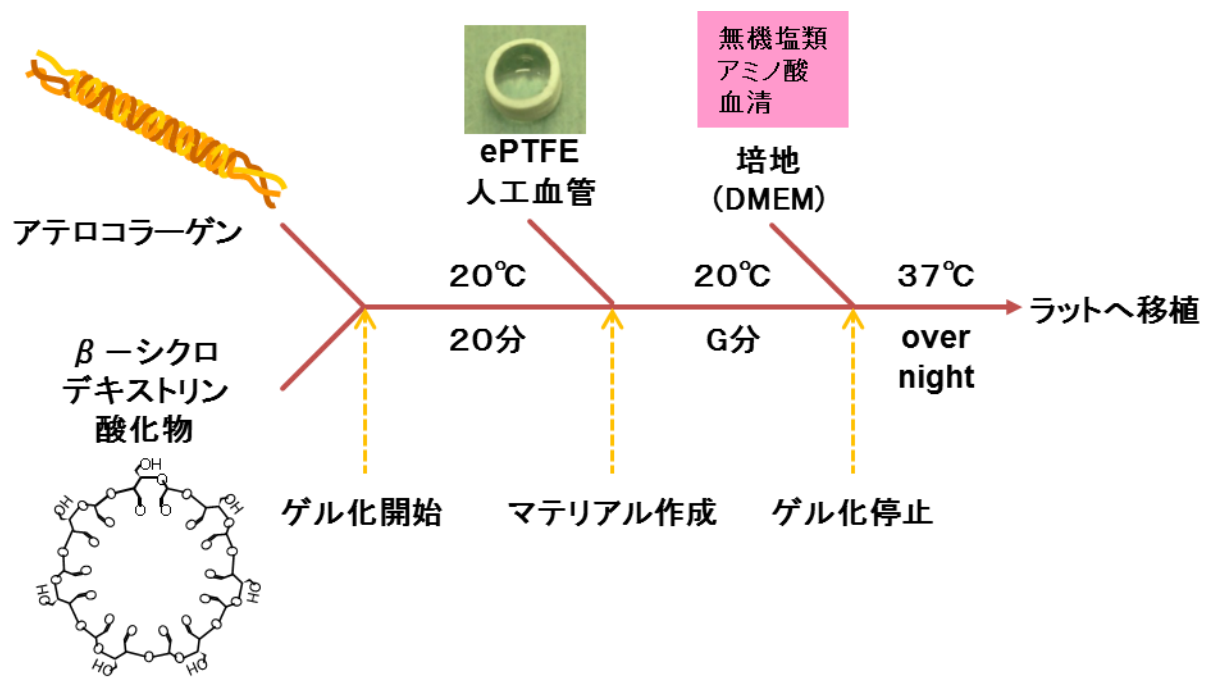


図 2 2 : β CD ゲルによる移植マテリアルの作成

グ中央で二分割した後パラフィン包埋し、5 μ m の厚さにスライスして、組織切片を作成した。

作成した組織切片に対して H.E.染色を行い、移植マテリアルの状態を観察した。続いて、抗 CD31 抗体 (Fitzgerald) を用いた免疫染色を行い、デジタル顕微鏡 PROVIS AX80 で撮影した後、血管新生の定量的評価のため、Win ROOF を使用して移植マテリアル内のゲルの面積 (以下総面積)、抗 CD31 抗体染色陽性の血管数 (以下血管数)、および抗 CD31 抗体染色陽性血管の内腔の面積 (以下新生血管面積) を測定し、

$$\text{血管密度 (個/mm}^2\text{)} = \text{血管数} / \text{総面積}$$

$$\text{血管占有率 (\%)} = (\text{新生血管面積} / \text{総面積}) \times 100$$

を算出した。(n=4)

b. 結果

・マテリアル作成後架橋反応停止までの至適時間の決定

組織切片の H.E.染色および抗 CD31 抗体染色を図 2 3 に示す。G=20 分では 4 サンプルのうち 1 サンプルでゲルが十分に固まらなかったため、n=3 となった。

G の時間にかかわらず、 β CD ゲルの辺縁から内部に向かって移植母床からの新生血管が入り込んでいる様子が見られた。これらを解析したものを図 2 4 に示

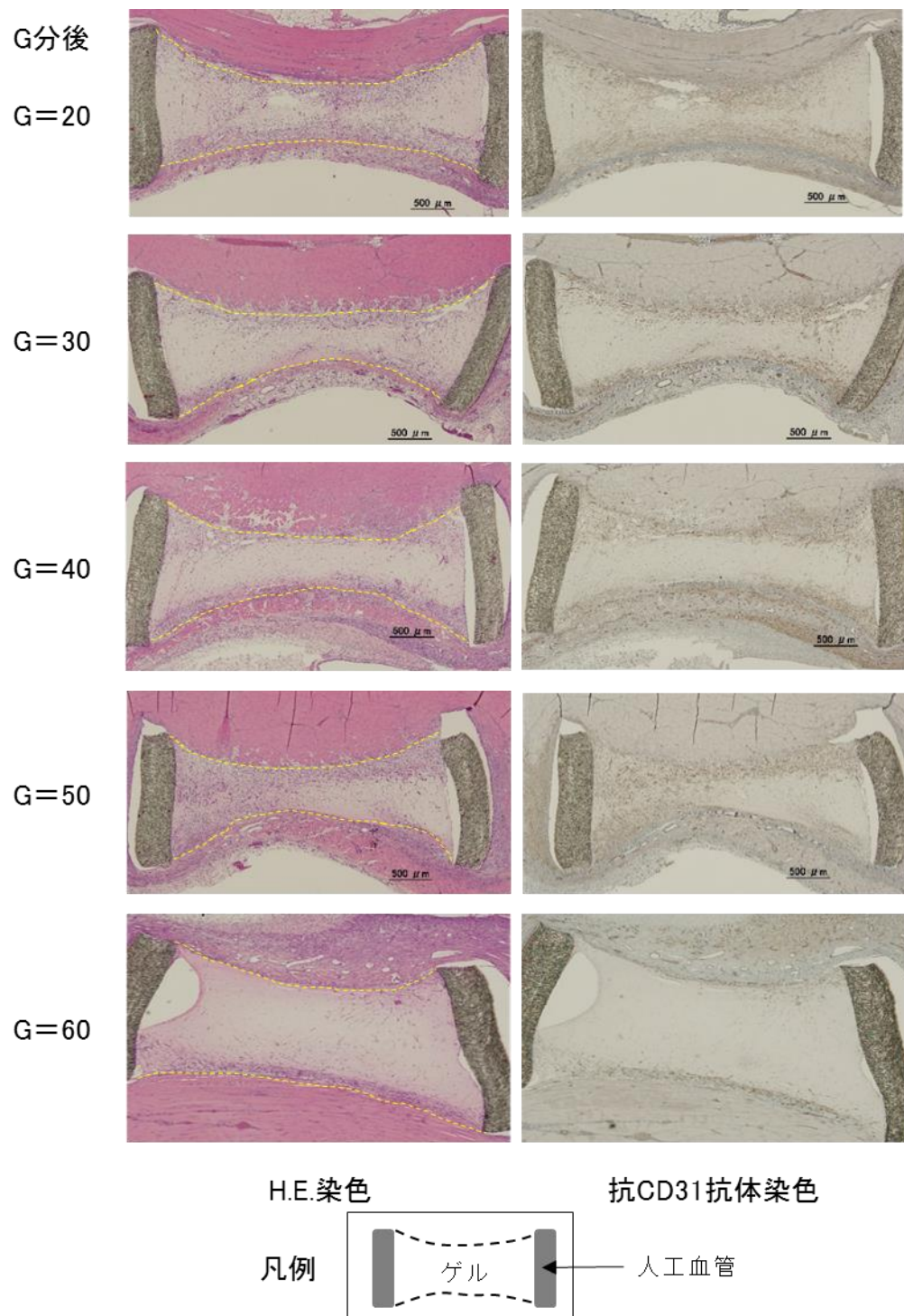


図 2 3 : 架橋反応停止までの時間による違い

(A) の H.E. 染色における黄色点線 (---) の内側がゲルの領域
 (B) , (C) において — 黄色線は 4 要素の平均を示す

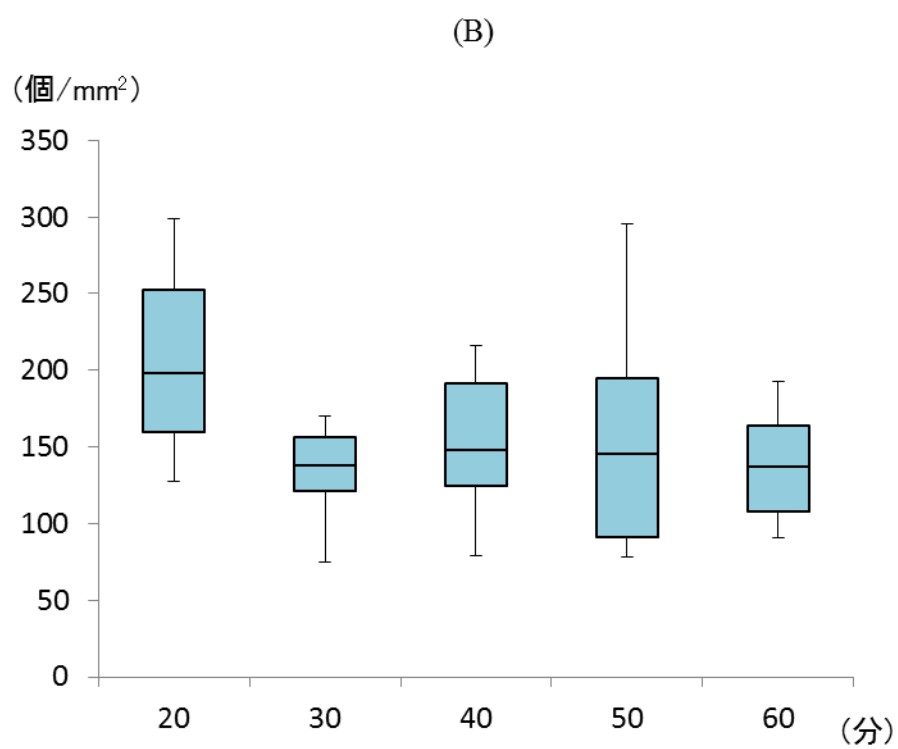
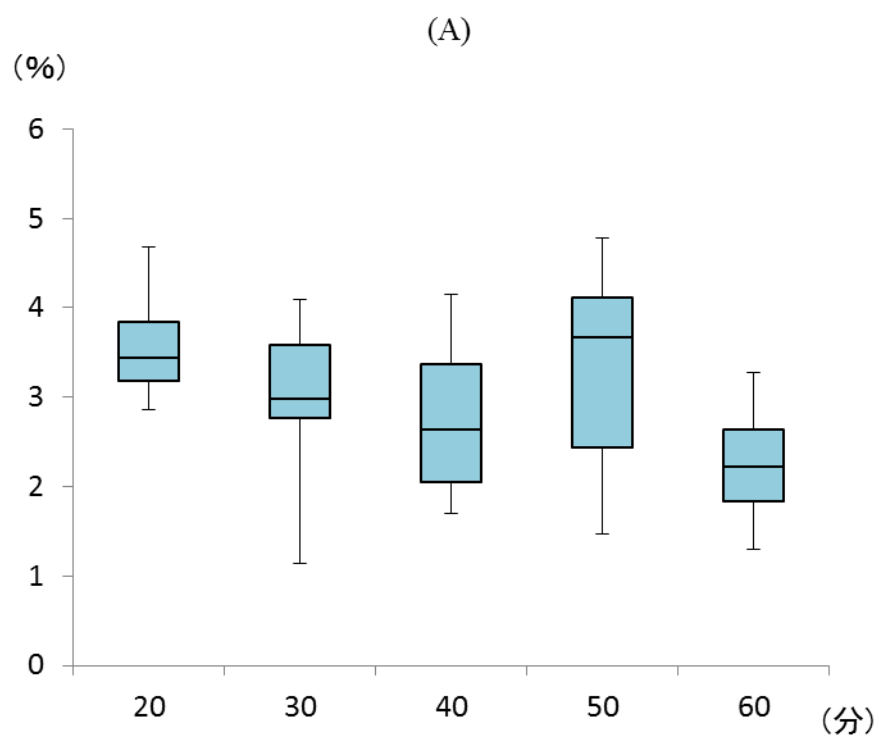


図 2 4 : β CD ゲルの(A)血管占有率、(B)血管密度

す。血管密度、血管占有率ともに G の値の違いによる有意差は見られなかった。

また、全体にばらつきがあり、ほぼ同様の結果と考えられ、 G の値によらず、 β CD ゲルに血管誘導能があると考えられた。

4. 生体外で細胞増殖後の埋込実験

将来的に再生臓器を作成するためのスキャフォールドとしてこのゲルを使用することを考えた際、移植母床からの新生血管の発達を待つのみでは、十分に発達するまでの間に中心壊死を起こしてしまう可能性がある。なぜなら、新生血管の発達速度が 1 日に数十 μm ほどであるためである[38]。そのため、中心壊死を惹起することなく大型再生組織を生着させるためには、あらかじめゲル内に早期に血管網を構築するための仕組みを組み込んでおく必要があると考えた。 β CD ゲル内で HUVEC を培養すると、血管網を模したネットワークを形成することが上記実験（2. ゲル内における HUVEC の形態変化）で示されたことを受け、HUVEC によりあらかじめ血管網様ネットワーク構造を作った後にラットへ移植した際、移植母床からの血管網と連結することができるかどうかを検証することとした。

a. 方法

アテロコラーゲンと β -シクロデキストリン酸化物を混合し架橋反応を開始

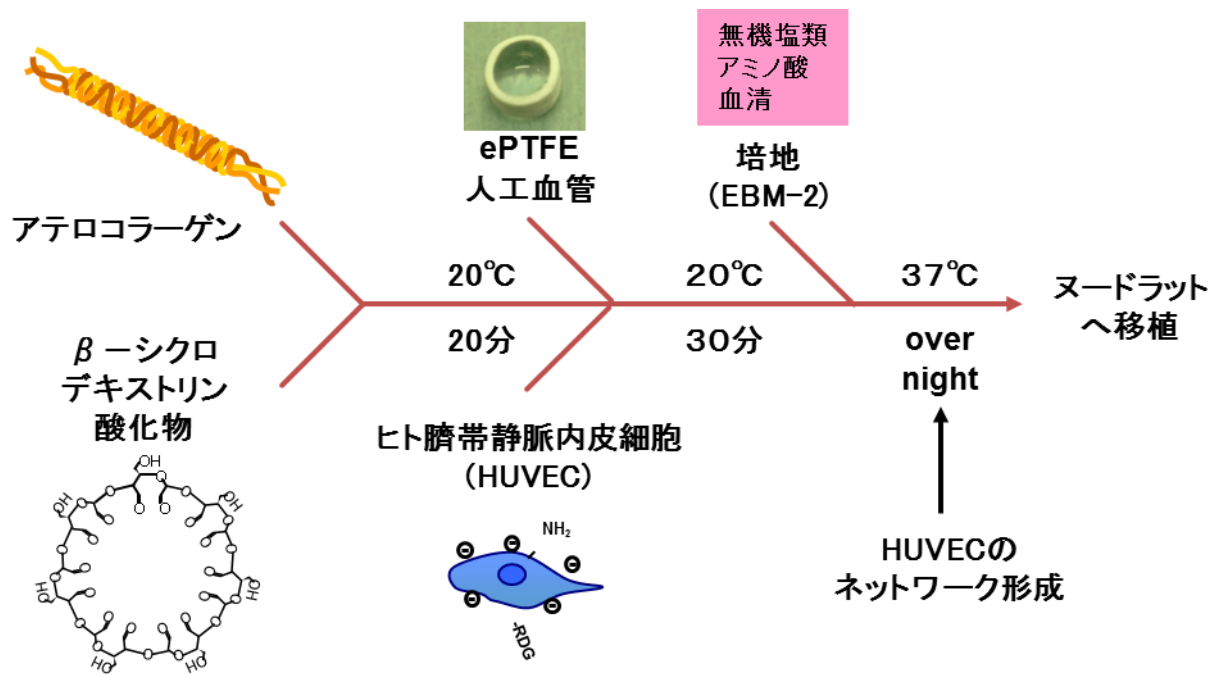


図 2 5 : βCD ゲル内で HUVEC 増殖後にラットへ移植

させてから、20 分経過後に 0.8×10^5 個の HUVEC を 35 μ l のゲル内に均一に行きわたるように良く混和し、厚さ 2mm にスライスした直径 4mm の ePTFE 製人工血管内に流し込んだ。30 分経過後に培養液 EBM-2 を十分に添加することでゲル化反応を停止させ、37°C で over night 置いた後、ラットへ移植した。(図 2 5)

ラットは F344/NJcl-rnu/rnu ラット (8-9 週齢、150-200g、日本クレア) を使用し、ケタミン塩酸塩、キシラジン塩酸塩混合液の腹腔内投与による全身麻酔下に、腹直筋筋膜下にマテリアルを埋植した。埋植後 5 日目に安楽死させ、5%パラホルムアルデヒド心臓注入による還流固定を行い、周囲組織と一塊にしてマテリアルを回収した。ePTFE 製人工血管のリング中央で二分割した後パラフィン包埋し、5 μ m の厚さにスライスして、組織切片を作成した。

作成した組織切片に対して、H.E.染色およびヒト抗 CD31 抗体染色を行い、デジタル顕微鏡 PROVIS AX80 で観察した。

ヒト抗 CD31 抗体染色は、先述の抗 CD31 染色と同様の方法で行ったが、一次抗体は、ヒトと交差するもののラットと交差のない Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell Clone JC70A (Dako) を使用し、後染色をエオジンにて行った。

b. 結果

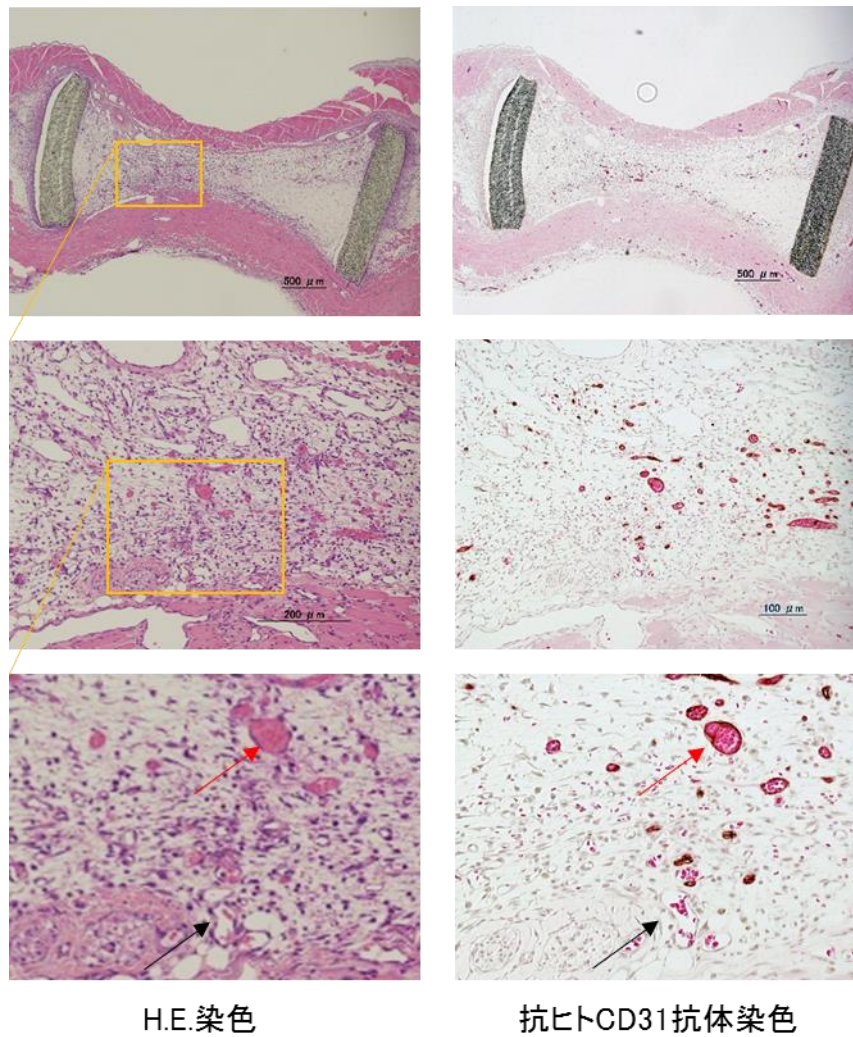


図 2 6 : HUVEC をゲル内で増殖後にラットへ移植した結果

拡大すると黒矢印 (→) 部分では抗ヒト CD31 抗体に染色されない血管内に赤血球が見られ、赤矢印 (→) 部分では抗ヒト CD31 抗体で染色された血管内に赤血球が見られる。

H.E.染色および抗ヒト CD31 抗体染色像を図 2 6 に示す。強拡大で同じ部位を見ると、ゲルの中心付近でヒト抗 CD31 抗体では染色されないラット移植母床からの血管と、ヒト抗 CD31 抗体で染色される HUVEC 由来の血管が共存しており、いずれの血管内部にも赤血球が認められた。

5. 小括

β CD ゲルは、ゲル化開始から 20 分ほどで細胞が沈まない固さになり、細胞混和後 20 分でゲル化を停止させた場合、ゲル内の培養により HUVEC が最も良好なネットワーク形成を示した。そして、細胞混和後、ゲル化停止までの時間が長くなるほど、ゲル内培養による HUVEC のネットワーク形成は悪くなることが示された。また、*in vivo* の実験ではマテリアル作成から架橋反応停止まで 20 分では一部のゲルが固まらなかったが、固まったゲルに関しては、ゲル化時間を変化させてもゲルへの血管誘導能は変わらないことが分かったため、マテリアル作成後から架橋反応停止まで、30 分以上あけるのが良いと考えられた。

HUVEC を β CD ゲル内で培養して、ネットワークを形成させた後に移植した実験では、移植母床からゲル内に発達した血管網に混じって、HUVEC により構築された血管構造が認められた。そして、この両者の血管構造の内部には、血流の存在を示す赤血球が存在したことから、ラット移植母床からの血管と HUVEC 由

来の血管が連結した可能性が示唆された。

VI. 考察

オリゴ糖酸化物のアルデヒド含有量を求めた実験では、減圧乾燥前後でのアルデヒド含有量を比較すると、乾燥によりアルデヒド含有量が 10%以下に激減したグループと、40%以上残存しているグループに分かれた。前者はフルクトース、グルコース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、マルトトリオースであり、還元糖に分類され、後者はラフィノース、トレハロース、メレジトース、スクロース、シクロデキストリンであり、非還元糖に分類される。これは、還元糖においては分子構造が環状体と鎖状体で平衡状態にあるため、ビシナルジオールの酸化による開裂によりフラグメンテーションが惹起され、ホルムアルデヒド等の分子量の小さいアルデヒドが多量に形成されたためと考えられた。実際、還元糖を減圧乾燥する際に、ホルマリン様の臭気を感じることができた。このことから、還元糖は期待した酸化反応の効率が悪いことがうかがわれ、非還元糖の酸化物と比較してゲル化時間が長い理由の 1 つとなった可能性がある。

各種オリゴ糖酸化物におけるゲル化時間の差を見た実験では、上述のように還元糖と非還元糖で差が見られるほか、糖ユニットが増えるほど、ゲル化時間が短くなる傾向が見られた。各オリゴ糖酸化物における糖ユニットの割合は同様となるように調整したが、オリゴ糖酸化物の糖ユニットが増加することにより、オリゴ糖酸化物一つあたりのアルデヒド基が増加することとなり、二つ以上の

アテロコラーゲンが一つのオリゴ糖酸化物と結合する確率が増加したためと考えられる。また、糖ユニットが増加することによって、各種オリゴ糖酸化物において架橋点となるアルデヒド基同士の最大距離が大きくなり、複数のアテロコラーゲンが立体障害なく結合できるようになったこともゲル化時間の短縮に寄与していると考えられる。特にシクロデキストリンでは、疎水性部位が内側に、親水性部位が外側に向く傾向があることが知られており、アルデヒド基が環状構造の外側を向いたことで、さらに立体障害を減らす効果があった可能性がある。今回は、高純度の単一オリゴ糖が容易に入手できる糖類のみを調べたため、ラフィノース以外の直鎖オリゴ糖の酸化物を用いることにより、さらにゲル化時間の短い架橋剤が作れた可能性もあるが、環状オリゴ糖である β -シクロデキストリンのゲル化時間は1～1.5時間と実用レベルに達していることに加え、スキャフォールドとしての機能も良好であったことから、追加実験の必要はないと判断した。

ラフィノース酸化物の細胞毒性を調べた実験では、他の一般的な架橋剤として知られる薬剤のアルデヒド基よりも高濃度で投与しても細胞毒性が低く、ゲル化に有利と考えられた。理論的には炭素数が増えれば毒性が減るとされており[33]、 β -シクロデキストリン酸化物は、ラフィノース酸化物よりも炭素数が多いため、さらに毒性は低いと考えられる。また、今回調べた細胞毒性は、培養

液中にラフィノース酸化物等の対象薬剤を直接投与し、48 時間培養した際の毒性である。そのため、架橋剤として使用する際には、ラフィノース酸化物のアルデヒド基がアテロコラーゲンとの共有結合に消費されていてフリーのアルデヒド基が投与濃度よりも少なくなることから、今回の実験と同じ濃度であっても使用時の毒性は低くなる。残存しているアルデヒド基もゲル化反応停止の際に投与する培養液中のタンパク質、アミノ酸により不活化されることから、実際に細胞がアルデヒド基に曝露する時間は、細胞混和後、ゲル化停止までの時間のみであり、ゲル化時間が短ければ、それだけ細胞にとって優しいゲルと考えられる。今回、ゲル化後の混合物の毒性については、ラフィノース酸化物、 β シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したゲルを最適化した時点で、HUVEC の viability が保たれていたため不要と判断したが、他のハイドロゲルとの比較においては今後の課題と考えられる。

ゲル内に HUVEC を埋め込む実験における、三次元ネットワーク形成の定量的評価は、本研究において新規に開発した手法である。これまでは、ゲルの体積の収縮をもって細胞同士が引っ張り合っている証拠としているものや[39]、ネットワーク形成における各細胞からの分岐数を 4 パターンに分けて 1 から 4 で数値化する方法[40]が報告されているが、十分に評価できているとはいえない状況であった。一平面のみの観察では、三次元の評価に適さないが、平面像を縦に重

ね合わせた Z-stack 像を評価の対象とすることで、平面に完全に垂直なものを除けば評価が可能となった。また、底面からの高さをそろえることで、恣意的なばらつきが出るのを避けることができた。実際、本研究での検討では、レーザー共焦点顕微鏡で見た画像と、算出した数値が十分に対応しており、今後の三次元ネットワークの評価方法として有用と考えられる。

また、ラット筋膜下へのゲルの埋込に対する血管網誘導の評価は、申請者の所属する研究室で、以前に確立された手法を用いたが、マイナーな変更を加えた。原法では von Willebrand factor (vWF) 染色を行っていた[32]。しかしながら、vWF 染色はこのゲルと相性が悪く、ゲル内の血管が染まらないため、血管内皮細胞に対する免疫染色として一般的に知られている抗 CD31 抗体染色にて計測を行った。

さて、序文でも述べたが、本研究は架橋剤が高分子であれば、反応性が低く、細胞接着性が低いために、低分子の架橋剤である方が望ましいという仮説のもとに実験を進めた。そのため、まず第IV章において直鎖の糖で最もゲル化時間が短く、アルデヒドの形成状態も良好なラフィノース酸化物によるアテロコラーゲンゲルの機能評価を行った。HUVEC をゲルに混和する実験では、最適化された条件下では HUVEC のネットワーク形成が良好に見られた。また、ゲルをラット筋膜下に移植する実験では、ゲル内に移植母床から新生血管が入り込む様子

が観察された。

これに加えて、第V章では分子量はやや大きく環状であるが、ゲル化時間が1から1.5時間と短かった β -シクロデキストリンによるゲルの評価も実施した。 β -シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用した場合、ゲル化時間が短い
ため、細胞が沈殿しない最短の時間でゲルと細胞を混和しても、ゲル化終了までの時間を1時間以内に抑えることが可能であり、細胞に対して良い環境を提供できていると考えられる。

栄養血管を内部に誘導するスキファールドの要件としては、生体に対する毒性が低いこと、三次元で適度な隙間のあるマイクロネットワーク構造であること、血管壁構成細胞との接着性がよいこと、生体内で安定した構造であること、十分な強度がありつつ血管新生を促すマトリックスメタプロテアーゼ等のプロテアーゼによって適切に分解されること、臨床現場でのハンドリングが良いことが求められる。また、血管新生因子を担持することができれば、血管誘導に有利となる。第IV、V章で評価したRafゲル、 β CDゲルが、これらの要件を満たしているか、以下に考察したい。

生体毒性については先述のとおり、ラフィノース酸化物の細胞毒性が高くないことが確認されており、アルデヒドは炭素数が多くなれば毒性が低くなることが理論的に想定されていることから[33]、 β -シクロデキストリン酸化物の毒性

については、ラフィノース酸化物よりもさらに毒性が低いと考えられる。実際、HUVEC の埋込実験においては、埋め込まれた細胞の viability は高度に保たれていたことから、少なくとも本研究を用いたコンディション下では、両酸化物とも毒性の心配はないことが示唆される。

三次元でのマイクロネットワーク構造については、マイクロネットワークの隙間が細胞のサイズに対して大きければ細胞が進展する過程で適切な足場となれず、小さければ細胞が増殖、遊走できない構造となるため、適度な隙間が必要である。この点、本研究で用いた架橋剤によるゲルは、培養液の投与によりゲル化反応を停止することができるため、ゲルの架橋度を調節することが容易であり、適度な隙間を実現することができる。Raf ゲル作成開始後、HUVEC と混和するまでの時間が長かったものが、適切な血管網様ネットワーク構造を形成できなかったのは、ゲル化が進みすぎて、マイクロネットワークの隙間が HUVEC のサイズに対し小さくなり、細胞の増殖、遊走を阻害したためと考えられる。Raf ゲル、 β CD ゲルともに、適切な条件下では細胞の血管網様ネットワーク構造の形成が実現できていることから、適度な隙間ができていることが分かる。

血管壁構成細胞との接着性については、Raf ゲル、 β CD ゲルともに、包埋した HUVEC が三次元の血管網様ネットワーク構造を形成できたことから十分に証明されるが、本研究では、HUVEC との接着性に関連した興味深い所見も得る

ことができた。それは、 β CD ゲル内への HUVEC の植え込み実験において、HUVEC 混和からゲル化停止まで 20 分のものが、30 分以上のものと比較して有意に良好な結果が得られたが、HUVEC を混和していない移植マテリアルをラットに移植する実験では、ゲル化反応液を人工血管に入れてからゲル化停止までの時間を 20 分とした群で、4 サンプルのうち 1 サンプルのゲルが固まっていなかったという所見である。HUVEC を混和した際にはゲル化が十分に見られた条件であっても、HUVEC を混和せずにゲル化した際には十分な強度が得られなかったことから、HUVEC が架橋の肩代わりをしてゲルの強度が上がった可能性が考えられた。このことから、ゲルと HUVEC の接着性が良好であることが示唆されるのではないだろうか。

ゲル内で HUVEC が三次元のネットワーク構造を形成することや、ラット筋膜下で移植母床から新生血管が誘導されることは、ゲルが HUVEC および宿主の血管が成長するのに適した微小環境を提供できている証拠であり、血管が形態変化するときに放出されるプロテアーゼにより適切に分解されながら、過剰に分解されることなく、そこに血管を保持する強度を持っていることを示している。また、ラットへの移植実験で、血管網の誘導がまだ起きていない領域のゲルが分解されることなく存在していることから、生体内での安定性も満たしていると考えられる。

ハンドリングについては、Raf ゲルと、 β CD ゲルは、機能において大きな差は見られなかったが、ゲル化時間が前者は 5 時間ほどかかるのに対して、後者は 1 時間ほどで済む。したがって、 β CD ゲルは細胞の包埋時に生じる培養液を用いられない時間が短縮されるという利点に加えて、臨床現場での使用についても待ち時間が少なく、使いやすい（ハンドリングが良い）ゲルといえる。

血管新生を誘導する血管新生因子として bFGF が知られているが、bFGF は血管内皮細胞に発現する繊維芽細胞増殖因子受容体 1（fibroblast growth factor receptor 1: FGFR1）に作用し、血管内皮細胞の増殖（angiogenesis）を促進するほか、FGFR1 が発現する繊維芽細胞や血管平滑筋細胞にも作用し、その増殖（arteriogenesis）を促すことが知られている[41,42]。今回使用したオリゴ糖酸化物は、アルデヒド基が酸化されてカルボン酸ができれば、bFGF 等の血管新生を促す増殖因子と静電相互作用が期待できることから、Raf ゲルに bFGF を添加する実験を行った。その結果、in vitro では bFGF の添加により HUVEC の増殖が早くなり、ゲル全体が速やかに収縮していくことが観察された。細胞同士が成長して互いに引き合うことによりゲル全体が小さくなったと考えられ、HUVEC の増殖が良好であることを示す結果であった。また、in vivo の実験では、bFGF が 100ng/ml の濃度で添加すると、非添加の群と比較して有意に血管新生が良好であった。このことから、オリゴ糖酸化物には、bFGF を担持する能力があると考

えられる。今回は、ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したゲルでのみ bFGF を投与する実験を行ったが、 β シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したゲルで最適な bFGF 濃度を決定していくことが今後の課題となっている。

以上のように、今回使用したオリゴ糖酸化物を架橋剤とし使用したアテロコラーゲンゲルは、三次元のスキヤフォールドとして求められる条件を十分に満たしていることが分かるが、移植母床からの血管誘導が良好であったとしても、血管新生の進行速度が遅いため、大型再生臓器を構築した際には、中心壊死を起こさないように中心部まで栄養供給するための構造が必要である。本研究では、良好な結果が得られた β CD ゲルを用いて、ゲル内で HUVEC を培養し、三次元の血管網様ネットワークを構築した後に、ラット筋膜下へ移植する実験を行った。その結果、移植母床由来の血管内だけでなく、HUVEC 由来の血管内にも赤血球が確認できた。これは、HUVEC で構築された血管網様ネットワークの中に、移植母床からの血流が入り込んだことを示しており、幼弱な段階で移植母床由来の血管と HUVEC 由来の血管が連結したことを示唆するものである。今回の実験では他の HUVEC を埋めない実験と同様に 5 日間の埋植後に取り出している。これまで、HUVEC を混和せずに筋膜下に植えた実験では、多くの場合、辺縁に血管形成が見られ、血管新生が良好なものでは、内部に向かって伸びていく

様子が観察できたのに対して、本実験における HUVEC 由来の血管はゲルの中心付近で内腔に赤血球が詰まっている。このことから、HUVEC のネットワークを先に作成して移植することで、辺縁だけでなく、内部まで栄養が到達することが期待され、HUVEC とともに構築したい臓器の細胞を埋めることで、これまでよりも大きな三次元組織が形成できる可能性がある。

最近、アテロコラーゲンが異種動物由来であるために、狂牛病等の疾患や未知のウイルスに対する不安からカイコ由来の遺伝子組み換えコラーゲンや[43]、タンパク質の化学合成による人工コラーゲン[44]、ポリエチレングリコール等による人工ハイドロゲルを開発しているグループ[45]もあるが、いずれも開発目標としている対象は異種動物由来の天然コラーゲンであり、三次元スキャフォールドに求められる生体内での安定性や適度な分解性については、コラーゲンを上回るものはできていない。また、コラーゲンは人工血管表面の被覆材としても使用されており、これまで長く生体に対して使用されてきた実績があることから、安全性も担保されていると考えられる。

本研究の最終的な目標は、オリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルを、肝細胞や心筋細胞等と共に培養することで三次元構築していくことであり、得られた結果から、中心壊死を起こすことなく大きな三次元組織を形成するための基盤を作ることができたと考えている。今回は埋植後 5 日で

取り出したが、ネットワークを構築した HUVEC は培養液を投与しない環境下で生存していた。しかしながら、他の臓器由来の細胞が培養液非投与下で 5 日間生存している保証はなく、今後実験を重ねることで、ネットワーク形成した HUVEC と移植母床由来の血管が移植後どの程度の時間で結合するかを明らかにしていく必要があると考えられる。Takebe ら[46,47]は iPS 由来の肝臓内胚葉細胞とヒト間充織幹細胞を HUVEC とともに培養することで、自然と三次元で肝臓が形成されることを報告しており、この肝臓を用いた移植実験を目指しているが、こうした研究に、移植母床からの血管誘導が良好であり、HUVEC との連結が得られる今回のゲルを用いることができれば、三次元的な拡がりを容易に作成できる可能性があるだけでなく、臓器の生着に近づくことが期待される。

VII. 結語

本研究により、オリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルは、ゲルの架橋度を調節することにより、血管網誘導能に加えて、大型再生組織の構築に必要な三次元のスキュフォールドとして求められる条件を十分に満たしていることが分かった。

また、ゲル内に HUVEC で構築された血管網様ネットワークを構築してから移植することにより、中心壊死を起こすことなく三次元組織を形成するための基盤を作ることができたと考えている。

VIII. 謝辞

本研究を遂行する機会およびご指導ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科・血管外科 渡邊聡明教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を開始する機会を与えて下さり、研究内容に関して懇切丁寧なご指導を賜りました国立医療福祉大学教授・山王メディカルセンター血管病センター長 宮田哲郎先生、東京大学医学部附属病院トランスレーショナル・リサーチセンター 小山博之特任准教授、国際医療福祉大学教授・国際医療福祉大学三田病院心臓血管センター 重松邦広先生、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科 保科克行講師に深謝いたします。

また、本研究の基礎的手法や材料工学に関する理論、考察方法などに関して随時的確なご助言を賜りました、東京大学大学院医学系研究科血管外科学 上村渉先生に深謝いたします。実際の実験遂行に際してご協力いただきました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科の研究助手である清水照美様、青木祐子様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するうえでご助言をいただきました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科学教室の諸先生方におかれましても、厚く御礼申し上げます。

IX. 引用文献

1. Keane TJ, Badylak SF. Biomaterials for tissue engineering applications. *Semin Pediatr Surg.* 23(3): 112-8. 2014.
2. Davis BH, Schroeder T, Yarmolenko PS, Guilak F, Dewhirst MW, Taylor DA. An in vitro system to evaluate the effects of ischemia on survival of cell used for cell therapy. *Ann Biomed Eng.* 35(8): 1414-24. 2007.
3. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, Amanuma T, Iwata H, Yang J, Okano T, Nakajima Y. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med.* 13(7): 880-5. 2007.
4. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Electorical interaction between cardiomyocyte sheets separated by non-cardiomyocyte sheets in heterogeneous tissues. *J Tissue Eng Regen Med.* 4(4): 291-9. 2010.
5. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Regenerative therapies using cell sheet-based tissue engineering for cardiac disease. *Cardiol Res Pract.* 2011:845170. doi: 10.4061/2011/845170. 2011.
6. Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. “Deep-media culture condition” promoted lumen formation of endothelial cells within engineered three-dimensional tissues in vitro. *J Artif Organs.* 14(1): 43-51. 2011.

7. Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, Dobashi I, Wada M, Yamato M, Kobayashi E, Umezu M, Okano T. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun.* 4: 1399. doi: 10. 1038/ncomms2406. 2013.
8. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnol J.* 9(7): 904-14. 2014.
9. Lazar A, Mann HJ, Remmel RP, Shatford RA, Cerra FB, Hu WS. Extended liver-specific function of porcine hepatocyte spheroids entrapped in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31(5): 340-6. 1995.
10. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131(5): 861-72. 2007.
11. Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature.* 494(7435): 100-4. 2013.
12. Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 12(4): 407-12. 2013.

13. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J. Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate. *Stem Cell Reports*. 1(4): 283-92. 2013.
14. Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports*. 2(2): 205-18. 2014.
15. Shin M, Matsuda K, Ishii O, Terai H, Kaazempur-Mofrad M, Borenstein J, Detmar M, Vecanti JP. Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly (dimethyl siloxane). *Biomed Microdevices*. 6(4): 269-78. 2004.
16. Chen G, Okamura A, Sugiyama K, Wozniak MJ, Kawazoe N, Sato S, Tateishi T. Surface modification of porous scaffolds with nanothick collagen layer by centrifugation and freeze-drying. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 90(2): 864-72. 2009.
17. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*. 38(2): 211-8. 2000.
18. Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 17(5):

524-32. 2005.

19. Brandl F, Sommer F, Goepferich A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*. 28(2): 134-46. 2006.

20. Gentleman E, Lay AN, Dickerson DA, Nauman EA, Livesay GA, Dee KC. Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 24(21): 3805-13. 2003.

21. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 103(4): 655-63. 2009.

22. Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 273(6): 3604-10. 1998.

23. Vernon RB, Sage EH. A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices. *Microvasc Res*. 57(2): 118-33. 1999.

24. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol*. 13(5): 377-83. 2002

25. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold

material: Structure and function. *Acta Biomater.* 5(1): 1-13. 2009.

26. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev.* 14(1): 61-86. 2008.

27. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater.* 21(32-33): 3307-29. 2009.

28. Patel ZS, Mikos AG. Angiogenesis with biomaterial-based drug- and cell-delivery systems. *J Biomater Sci Polym Ed.* 15(6): 701-26. 2004.

29. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng.* 9 suppl 1: S5-15. 2003.

30. Guan J, Stankus JJ, Wagner WR. Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. *J Control Release.* 120(1-2): 70-8. 2007

31. Helseth DL Jr, Veis A. Collagen self-assembly in vitro. Differentiating specific telopeptide-dependent interactions using selective enzyme modification and the addition of free amino telopeptide. *J Biol Chem.* 256(14): 7118-28. 1981.

32. Takayama T, Taguchi T, Koyama H, Sakari M, Kamimura W, Takato T, Miyata T, Nagawa H. The growth of a vascular network inside a collagen-citric acid derivative hydrogel in rats. *Biomaterials.* 30(21): 3580-7. 2009.

33. Patnaik P. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances.

John Wiley & Sons, Inc. pp 160-92. 2007.

34. Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5(3): 206-10. 1991.

35. Kamimura W, Koyama H, Miyata T, Takato T. Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture. *J Biomed Mater Res A.* 102(12): 4309-16. 2014.

36. Dixon JS, Lipkin D. Spectrophotometric determination of vicinal glycols. *Anal Chem.* 26(6): 1092-3. 1954.

37. Que Z, Furuno T, Katoh S, Nishino Y. Evaluation of three test methods in determination of formaldehyde emission from particleboard bonded with different mole ration in the urea-formaldehyde rein. *Build Environ.* 42(3): 1242-49. 2007.

38. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26(8): 434-41. 2008.

39. Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature.* 428(6979): 138-9. 2004.

40. Lesman A, Koffler J, Atlas R, Blinder YJ, Levenberg S. Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs. *Biomaterials.* 32(31): 7856-69. 2011.

41. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res.* 49(3): 543-53. 2001.
42. Van Royen N, Hoefer I, Buschmann I, Heil M, Kostin S, Deindl E, Vogel S, Korff T, Augustin H, Bode C, Piek JJ, Schaper W. Exogeneous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J.* 16(3): 432-4. 2002.
43. Olsen D, Yang C, Bodo M, Chang R, Leigh S, Baez J, Carmichael D, Perala M, Hamalainen ER, Jarvinen M, Polarek J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(12): 1547-67. 2003.
44. Shibasaki Y, Hirohara S, Terada K, Ando T, Tanihara M. Collagen-like polypeptide poly(Pro-Hyp-Gly) conjugated with Gly-Arg-Gly-Asp-Ser and Pro-His-Ser-Arg-Asn peptides enhances cell adhesion, migration, and stratification. *Biopolymers.* 96(3): 302-15. 2011.
45. Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J Biomed Mater Res A.* 68(4): 704-16. 2004.
46. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y,

Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 499(7459): 481-4. 2013.

47. Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa HY, Taniguchi H. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*. 16(5): 556-65. 2015.