

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13779

研究課題名(和文) 生体反応を用いた新規自律高分子材料の創製

研究課題名(英文) Preparation of novel autonomous polymer materials using bio-reaction

研究代表者

吉田 亮 (Yoshida, Ryo)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：80256495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光により二量化できるクマリン基を導入した温度応答性ABAトリブロックコポリマーを合成し、光照射によって動的に粘弾性的性質を大きく変化させることのできるハイドロゲルを創製した。このABAトリブロックコポリマーは温度応答性Aブロックの凝集に駆動されたミセルネットワークの形成によるゾル-ゲル転移により、生理条件下で物理ゲルを形成する。更に、紫外光照射によるクマリン基の二量化によってミセルコアが化学架橋され、物理ゲルから化学ゲルへの変化が起こることによって粘弾性が大きく変化する。このゲルに三次元的に細胞を内包し、UV照射により弾性率を変化させることで、細胞増殖性を動的に制御できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Cells sense and respond not only biochemical signals, but also biophysical signals. Recent studies revealed that not only matrix elasticity but also viscoelasticity like stress relaxation significantly affected cellular functions. Herein, we fabricate a cytocompatible dynamic hydrogel formed by a well-defined ABA triblock copolymer. The A block contains N-isopropylacrylamide and acrylate monomer having coumarin side chain, whereas the B block is poly(ethylene oxide). The triblock copolymer forms a physical hydrogel at a physiological condition. Under UV light irradiation, viscoelasticity of the hydrogel are dynamically modulated resulting from photo-dimerization of coumarin moieties. Finally, we demonstrate that the dynamic viscoelastic changes of the hydrogel have significant influence on the behaviors of encapsulated cells.

研究分野：高分子ゲル

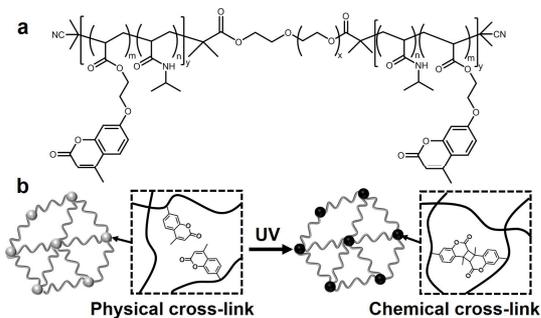
キーワード：高分子ゲル ブロック共重合体 生体材料 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

細胞は化学的なシグナルのみならず、弾性率などの物理的なシグナルにตอบสนองしてその挙動を変化させることが知られている。^[1,2] 近年では、刺激により弾性率を制御できるハイドロゲルを用いて、細胞を内包した状態で刺激を加えることにより、動的な弾性率変化の細胞挙動に与える影響が盛んに研究されている。^[3] これらの研究では、光などの刺激にตอบสนองして形成もしくは開裂する化学架橋点を共有結合により形成された化学ゲルに導入することで、動的な弾性率変化を実現している。一方、多くの生体組織は非共有結合により形成された粘弾性体であり、弾性率のみならず応力緩和や損失弾性率などの粘弾性的性質も増殖や分化、伸展などの細胞挙動に大きな影響を与えることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

本研究では、光により二量化できるクマリン基を導入した温度応答性 ABA トリブロックコポリマーを合成し、光照射によって動的に粘弾性的性質を大きく変化させることのできるハイドロゲルを創製した。この ABA トリブロックコポリマーは温度応答性 A ブロックの凝集に駆動されたミセルネットワークの形成によるゾル-ゲル転移により、生理条件下で物理ゲルを形成する。更に、紫外光照射によるクマリン基の二量化によってミセルコアが化学架橋され、物理ゲルから化学ゲルへの変化が起こることで粘弾性が大きく変化する。このゲルに三次元的に細胞を内包し、UV 照射により弾性率を変化させることで、細胞増殖性を動的に制御できることが分かった。



3. 研究の方法

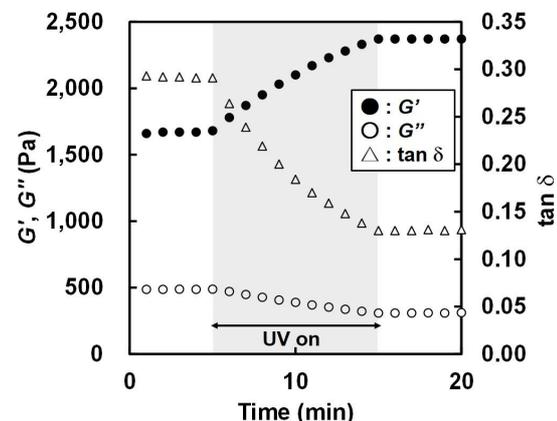
両末端に連鎖移動剤を修飾した Poly(ethylene oxide) (PEO) をマクロ連鎖移動剤とした可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、クマリン基含有アクリレートモノマー (coumarin acrylate, CA) 及び *N*-isopropyl acrylamide (NIPAAm) を両末端セグメントに有する ABA 型温度応答性トリブロックコポリマー P(NIPAAm-*r*-CA)-*b*-PEO-*b*-P(NIPAAm-*r*-CA) を合成した。希薄系における光二量化の定量には UV-vis 測定を用い、動的光散乱(DLS)測

定により粒径変化を観察した。また濃厚系での物性評価にはレオメータによる粘弾性測定を用いた。ゲル中での三次元細胞培養のため、HeLa 細胞の懸濁培養液と ABA トリブロックポリマーを溶解させた培養液をアイスバス内で混合して 96 ウェルプレートに流し込み、37 °C のインキュベータ中でゲル化させた(細胞密度: 2×10^4 /mL, ポリマー濃度: 10 wt%)。細胞の生死判定には Live/dead アッセイ、増殖率測定には Alamar Blue アッセイを用いた。

4. 研究成果

得られた ABA トリブロックコポリマーの希薄溶液(0.1 wt%)において、UV-vis スペクトル測定により UV 照射によるクマリン基の光二量化の定量を行った。UV 照射に従いクマリン基に特徴的な 320 nm 近傍のピークが単調的に消失していることが分かった。また DLS 測定により、UV 照射前には下限臨界ミセル形成温度(LCMT)型のユニマー-ミセル転移が観察されたのに対して、LCMT 以上の温度(37 °C)で UV 照射した後に DLS 測定を行った結果、LCMT 以下の低温でもミセル状態を維持することが分かった。これはクマリン基の光二量化によりミセルコアが化学的に架橋されたためと考えられる。

次に細胞培養液にトリブロックコポリマーを溶解させた濃厚溶液(10 wt%)の粘弾性測定を行った。温度分散測定の結果、約 31 °C でゾル-ゲル転移を示し、低温でゾル状態、高温ではゲル状態となることが確認された。これは濃厚系では親水性ブロックが疎水性相互作用により凝集したミセルコア間を繋ぐことで 3 次元的なネットワークを形成するためである。次に生理温度(37 °C)において UV 照射下で粘弾性測定を行った結果、貯蔵弾性率(G')の上昇、損失弾性率(G'')の減少が見られた。光二量化によるミセルコア内の化学架橋に起因して、ゲルがより弾性的になったためと考えられる。更に UV 照射前後に応力緩和測定を実施したところ、照射前は時間経過に従い応力がゼロに漸近するのに対し、照射後は有限の応力値に漸近した。この結果より、UV 照射によりゲルの粘弾性挙動が物理ゲルから化学ゲルに変化したことが推察される。このように穏和条件で物理ゲルを形成し、光照射のような単純かつ非侵襲的な外部刺激で動的に化学ゲルへ変化させることで



粘弾性を制御できるゲルはこれまでに例がなく、内包した細胞に動的な粘弾性変化を与えることの出来る新規三次元細胞培養材料として期待できる。

そこで、モデル細胞として HeLa 細胞をゲルに内包し、UV 照射による動的な粘弾性変化が細胞の増殖挙動に及ぼす影響を検討した。まず Live/dead アッセイにより、48 時間ゲルに内包した状態で HeLa 細胞を培養した場合、ほぼ全ての細胞が生存していることを確認した。次に Alamar Blue アッセイによる増殖率測定を行った。この時、 光照射なし (Without UV)、 細胞内包直後に光照射 (UV-0day)、 1 日培養後に光照射 (UV-1day) の 3 種類の培養条件で細胞の増殖挙動を観察した。光照射しない場合に比べて光照射した場合増殖率が抑制されていることが分かった。また、1 日後に光照射した場合、2 日後の増殖率は照射しない場合と内包直後に照射した場合の中間となり、培養中の任意の時間に光照射により粘弾性を変化させることで細胞の増殖挙動を動的に制御できることが示唆された。

今回創製したゲルを用い、幹細胞の分化挙動など様々な細胞挙動に対する動的な粘弾性変化の影響を検討することで、メカノバイオロジーに対するより深い理解が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

玉手亮多, 上木岳士, 北沢侑造, 葛貫森信, 渡邊正義, 秋元文, 吉田亮, 光二量
化により粘弾性を変化できる ABA トリブ
ロックコポリマーを基盤とした動的ハイド
ロゲルの創製と三次元細胞培養への応
用, ネットワークポリマー, 査読有, 38
巻, 2017, 103-109
R. Tamate, T. Ueki, Y. Kitazawa, M.
Kuzunuki, M. Watanabe, R. Yoshida,
Photo-dimerization induced dynamic
viscoelastic changes in ABA triblock
copolymer-based hydrogels for 3D cell
culture, Chem. Mater., 査読有, Vol.28,
2016, 1852-1867 DOI:
10.1021/acs.chemmater.6b02839

[学会発表](計4件)

玉手亮多, 上木岳士, 北沢侑造, 葛貫森
信, 渡邊正義, 秋元文, 吉田亮, 光二量
化により粘弾性を変化できる ABA トリブ
ロックコポリマーを基盤とした動的ハイド
ロゲルの創製と三次元細胞培養への応
用, 第 28 回高分子ゲル研究討論会,
2017.1.16-17, 東京大学(東京都文京区)
玉手亮多, 上木岳士, 北沢侑造, 葛貫森
信, 渡邊正義, 秋元文, 吉田亮, 光二量
化により動的に粘弾性を変化できる ABA
トリブロックコポリマーを基盤としたハ

イドロゲルの創製と三次元細胞培養への
応用, 第 26 回インテリジェント材料・シ
ステムシンポジウム, 2017.1.11, 東京
女子医科大学(東京都新宿区)

玉手亮多, 上木岳士, 北沢侑造, 葛貫森
信, 渡邊正義, 秋元文, 吉田亮, 光二量
化により粘弾性を変化できる ABA トリブ
ロックコポリマーを基盤とした動的ハイド
ロゲルの創製と三次元細胞培養への応
用, 第 66 回ネットワークポリマー講演
討論会, 2016.10.19-21, 千葉大学(千葉
県千葉市)

玉手亮多, 上木岳士, 北沢侑造, 葛貫森
信, 渡邊正義, 秋元文, 吉田亮, 光二量
化により動的に粘弾性を変化できる ABA
トリブロックコポリマーを基盤としたハ
イドロゲルの創製と三次元細胞培養への
応用, 第 65 回高分子討論会,
2016.9.14-16, 神奈川大学(神奈川県横
浜市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://cross.t.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 亮 (YOSHIDA, Ryo)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 80256495

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()