

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16399

研究課題名(和文)細胞機能を成熟化する超分子介在型成長因子導入表面の開発

研究課題名(英文) Supermolecule-mediated growth factor-immobilized surfaces for regulating cellular functions

研究代表者

有坂 慶紀 (ARISAKA, Yoshinori)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：70590115

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)：成長因子を導入したポリロタキサン(PRX)表面を作製し、成長因子シグナルの亢進と表面分子可動性によるメカノシグナルの調節による細胞機能制御を試みた。これまでに硫酸化PRXと骨形成因子(BMP-2)との複合体形成を報告しており、これを利用してBMP-2固定硫酸化PRX表面を設計した。BMP-2の固定と低い分子可動性の組み合わせが骨芽前駆細胞の骨芽分化を顕著に促進することを明らかにした。これはPRXの分子可動性調節とBMP-2の表面導入が相乗的に骨芽分化を亢進したことを示唆している。同様に間葉系幹細胞や肝臓由来細胞、血管内皮細胞の機能発現制御においてもPRX表面が有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環状分子と線状高分子とからなるポリロタキサンを被膜した表面(ポリロタキサン表面)において、ポリロタキサン骨格に由来する表面分子可動性によって接着細胞の機能が調節できることを報告している。本研究課題では、このようなポリロタキサン表面と成長因子をインテグレーションすることによって、さらに高度な細胞機能操作が可能となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We prepared growth factor-immobilized polyrotaxane (PRX) surfaces and tried to regulate cellular functions by surface-immobilizing growth factor and modulating surface molecular mobility. Previously, it has been reported that sulfated PRXs form complexes with bone morphogenetic proteins (BMP-2). In the present study, sulfated PRX surfaces with immobilized BMP-2 were designed. It was revealed that the combination of surface-immobilization of BMP-2 and low molecular mobility of PRXs significantly promotes osteoblast differentiation of preosteoblasts. This suggests that regulation of molecular mobility and surface-immobilization of BMP-2 synergistically enhanced osteoblast differentiation. Similarly, it was revealed that the PRX surface is also useful in controlling the cellular functions of mesenchymal stem cells, liver-derived cells, vascular endothelial cells.

研究分野：バイオマテリアル科学

キーワード：ポリロタキサン 成長因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

In vitro 系において接着した細胞は、基材表面の剛性や微細構造を焦点接着斑から細胞骨格タンパク質線維を介したメカノシグナルとして細胞核へ伝播し、接着・分化・タンパク質産生などの生理機能を調節している。そこで近年、培養基材の表面特性によって細胞の形態や分化系統を調節する研究が注目されている。これまでに当分野では、このメカノシグナルを調節しうる新たなバイオ界面としてポリロタキサン(PRX)を基盤とした細胞育成環境の構築を推進してきた。PRX は、環状分子(e.g. α -シクロデキストリン(α -CD))の空洞部を貫通した線状高分子(e.g. ポリエチレングリコール(PEG))鎖の両末端に嵩高い置換基を有した超分子構造体である。この PRX の環状分子と線状高分子は非共有結合的に共存しているため、環状分子が線状分子鎖に沿って自由自在に摺動運動する分子可動性を有していることが期待されている。例えば分子可動性の異なる PRX 被膜表面を用いて間葉系幹細胞の培養を行った場合、高い分子可動性表面は脂肪細胞分化に有利であり、低い分子可動性表面は骨芽細胞分化に有利であることを報告している。

2. 研究の目的

本研究ではこのような PRX の分子可動性によるメカノシグナル制御に加え、成長因子シグナルを増強する細胞培養表面の構築を目的とする。これまでに PRX の CD 部位に硫酸基を修飾した硫酸化 PRX がヘパリン結合性成長因子である骨形成因子(BMP-2)と静電的なコンプレックスを形成し、その活性を亢進させることを報告している。そこで硫酸化 PRX の両末端に poly(benzyl methacrylate) (PBzMA) を配したトリブロック共重合体を被膜した細胞培養基材に、BMP-2 を表面導入した BMP-2/硫酸化 PRX 基板を作製した(Figure 1)。この表面を用いて分子可動性の調節と成長因子の表面導入が骨芽前駆細胞(MC3T3-E1)の分化に与える影響について評価を行った。

3. 研究の方法

PEG と α -CD からなる擬 PRX の両末端に 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate を修飾した PRX マクロ連鎖移動剤を用いて BzMA を可逆的付加開裂連鎖移動重合し、PBzMA-b-PRX-b-PBzMA (PRX-PBzMA)トリブロック共重合体を得た。PRX-PBzMA の CD 部位にある水酸基に 1,3-propane sultone を反応させ、硫酸化 PRX-PBzMA (SPE-PRX-PBzMA) を合成した。24 ウェルプレート (1.9 cm²) 上に 0.05w% SPE-PRX-PBzMA/DMSO 溶液(30 μ L)を展開し、溶媒除去することで SPE-PRX-PBzMA 被膜表面を作製した。SPE-PRX-PBzMA 被膜表面に BMP-2 溶液を加え、37 °C で 24 時間インキュベーションすることで BMP-2 固定化硫酸化 PRX 基板を作製した。この表面を用いてマウス頭蓋冠由来骨芽前駆細胞(MC3T3-E1 細胞)を通常培地(GM)および分化誘導培地(OIM)中で 10 日間培養した後、alizarin red S の染色性および骨分化マーカー遺伝子発現(runx2、alp、ocn)について解析をした。参照表面として BMP-2 非固定化 PRX 表面である SPE-PRX-PBzMA 被膜表面ならび非硫酸化 PRX 表面である PRX-PBzMA 被膜表面を用いた。

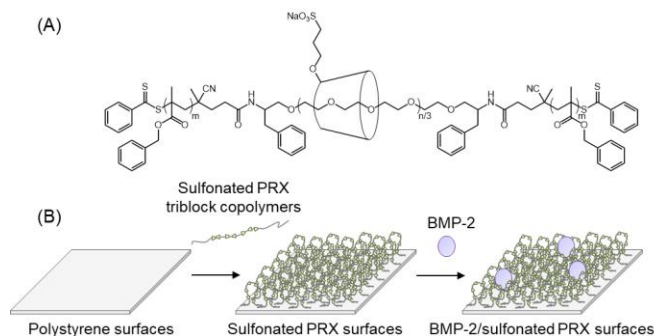


Figure 1. Molecular structure of SPE-PRX-PBzMA (A). Fabrication of sulfonated-polyrotaxane (PRX) surfaces with BMP-2 (B).

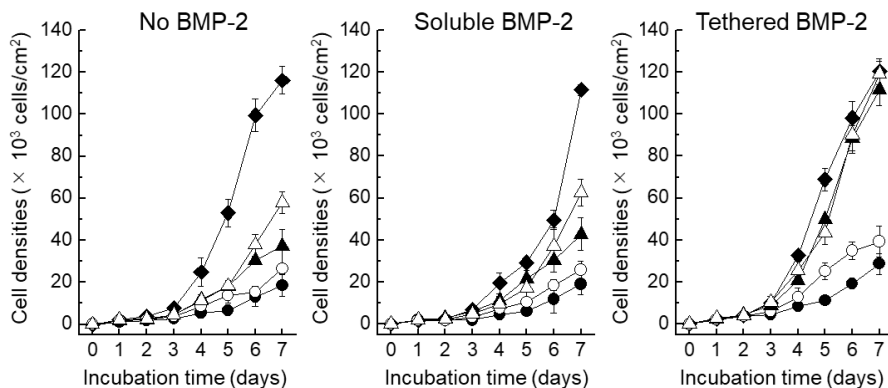


Figure 2. Time-courses of MC3T3-E1 densities on the surfaces of PRX₅-PBzMA (●), SPE-PRX₅-PBzMA (○), PRX₈₆-PBzMA (▲), and SPE-PRX₈₆-PBzMA (△) without additional BMP-2 and with soluble BMP-2 or tethered BMP-2 for 7 d.

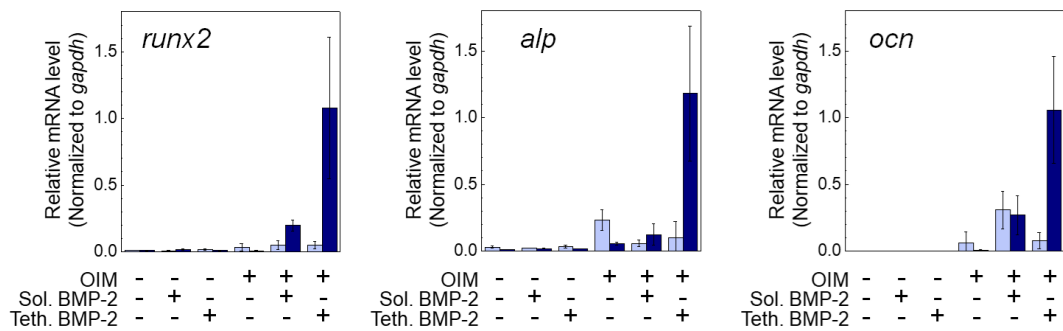


Figure 3. Gene expression levels in MC3T3-E1 cells on the surfaces of PRX86-PBzMA and sulfopropyl ether modified (SPE-) PRX86-PBzMA under various culture conditions after a 10-d cultivation. Gene expression levels of runt-related transcription factor 2 (runx2), alkaline phosphatase (alp), and osteocalcin (ocn) were determined by quantitative RT-PCR.

4. 研究成果

一般に MC3T3-E1 細胞の骨分化誘導は、細胞が密集した状態で行う。そこで分化誘導実験を行う前に、すべての基材における細胞の初期接着性および増殖性について評価した。CD 貫通数 5 および 86 の BMP-2/SPE-PRX-PBzMA (BMP-2/SPE-PRX5-PBzMA および BMP-2/SPE-PRX86-PBzMA)被膜表面ならびに参照基板を用いて MC3T3-E1 細胞を GM 中で培養し、接着細胞数を経時的に算出した(Figure 2)。また BMP-2 の表面固定化効果について評価するために、遊離の BMP-2 を GM 中に添加した系で細胞培養し、その接着細胞数を解析した。培養 1 日後の接着細胞数はすべての基板上においてほとんど同程度であり、PRX を基盤とした表面において CD 貫通数や硫酸基修飾、BMP-2 の表面固定は細胞の初期接着性には影響しないことが明らかになった。しかし細胞増殖性においては CD 貫通数の多い PRX 表面は CD 貫通数の少ない PRX 表面と比較して MC3T3-E1 の細胞増殖を促進した。培養 7 日後において CD 貫通数の少ない表面上の MC3T3-E1 はコンフルエント状態まで達することができず、PRX5-PBzMA および SPE-PRX5-PBzMA、BMP-2/SPE-PRX5-PBzMA 被膜表面は骨分化誘導実験に適さないことが明らかになった。また BMP-2 を表面固定した群は BMP-2 を添加した群と比べて細胞増殖を促進することが明らかとなった。この結果は、遊離 BMP-2 の添加と比較して BMP-2 を表面固定することによって持続的なシグナル伝達が可能になることを示している。つぎに、BMP-2 を添加もしくは表面固定した系において PRX86-PBzMA および SPE-PRX86-PBzMA 被膜表面を用いて OIM 中で MC3T3-E1 細胞の骨分化誘導実験を行った。OIM 中で 10 日間培養した結果、BMP-2/SPE- PRX86-PBzMA 被膜表面でのみ顕著に骨分化マーカーである runx2、alp、ocn 遺伝子発現の上昇と石灰化が確認された(Figure 3)。これらの結果は、PRX の分子可動性によるメカノシグナルと表面固定化した BMP-2 によるシグナル増強の相乗的な効果によって MC3T3-E1 細胞の骨分化が促進されたことを示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Polyrotaxane-based biointerfaces with dynamic biomaterial functions, *Journal of Materials Chemistry B* 7 (13), 2123-2129 (2019). DOI: 10.1039/C9TB00256A 査読あり
- (2) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Engineering molecularly mobile polyrotaxane surfaces with heparin-binding EGF-like growth factors for improving hepatocyte functions, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 107 (5), 1080-1085 (2019). DOI: 10.1002/jbm.a.36646 査読あり
- (3) Katsuya Hyodo, Yoshinori Arisaka, Satoshi Yamagichi, Tetsuya Yoda, Nobuhiko Yui, Stimulation of microvascular networks on sulfonated polyrotaxane surfaces with immobilized vascular endothelial growth factor, *Macromolecular Bioscience* 19 (4), 1800346 (2019). DOI: 10.1002/mabi.201800346 査読あり
- (4) Arun Kumar Rajendan, Yoshinori Arisaka, Sachiko Iseki, Nobuhiko Yui, Sulfonated polyrotaxane surfaces with basic fibroblast growth factor alters the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells in short-term culture, *ACS Biomaterials Science and Engineering* (2019). *in press* DOI: 10.1021/acsbomaterials.8b01343 査読あり
- (5) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Tethered bone morphogenetic protein-2 onto sulfonated-polyrotaxane based surfaces promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 28 (10-12), 974-985 (2017). DOI: 10.1080/09205063.2017.1319095 査読あり

〔学会発表〕（計 14 件）

- (1) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Combination of molecular mobility of sulfonated polyrotaxane and growth factors for improving hepatocyte functions, Society for Biomaterials 2019 Annual Meeting & Exposition(SFB2019), Seattle, USA, April 4th, 2019.
- (2) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Molecularly mobile surfaces with heparin-binding proteins for improving functions of hepatocyte-derived cells, The 2018 MRS Fall Meeting & Exhibit, Hynes Convention Center, Perugia, Boston, USA, November 27th, 2018.
- (3) 兵頭克弥, 有坂慶紀, 山口聰, 依田哲也, 由井伸彦, ポリロタキサンの分子可動性調節と成長因子導入による血管ネットワーク形成の促進, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 神戸国際会場, 神戸, 2018 年 11 月 13 日.
- (4) 有坂慶紀, 由井伸彦, 肝臓細胞機能を向上させるための硫酸化ポリロタキサン表面の設計, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 神戸国際会場, 神戸, 2018 年 11 月 13 日.
- (5) Katsuya Hyodo, Yoshinori Arisaka, Satoshi Yamaguchi, Nobuhiko Yui, Design of sulfonated polyrotaxane surfaces to activate vascular endothelial cells, 2018 TERMIS World Congress, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, September 5th, 2018.
- (6) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Supermolecule-based culture substrates with tethered BMP-2 enhance osteogenic differentiation, 2018 TERMIS World Congress, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, September 5th, 2018.
- (7) 有坂慶紀, 兵頭克弥, 山口聰, 由井伸彦, 硫酸化ポリロタキサン基材を用いた血管内皮細胞増殖因子の表面導入, 第 67 回高分子学会年次大会, 名古屋国際会議場, 名古屋, 2018 年 5 月 25 日.
- (8) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Dynamic biointerfaces based on sulfonated polyrotaxanes for enhancing osteogenic differentiation, The Society For Biomaterials 2018 Annual Meeting and Exposition(2018 SFB), Atlanta, USA, April 12th, 2018.
- (9) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Surface design of sulfonated-supramolecular substrates for tethering bone morphogenetic protein 2, 255th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, USA, March 22nd, 2018.
- (10) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Surface design of polyrotaxane-based materials with growth factors for enhancing cell differentiation, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀, 東京, 2017 年 11 月 20 日.
- (11) Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Surface-tethering of bone morphogenetic proteins onto sulfonated polyrotaxane substrates, 6th Asian Biomaterials Congress, Thiruvananthapuram, India, October 25th, 2017.
- (12) 有坂慶紀, 由井伸彦, 骨分化を促進するための骨形成因子固定化超分子表面の構築, 第 66 回高分子討論会, 愛媛大学, 松山, 2017 年 9 月 21 日.
- (13) Yoshinori Arisaka, Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui, Supramolecular surfaces with hydrated molecular mobility for constructing dynamic biointerfaces, 3rd International Conference on Biomaterials Science(ICBS2016), Tokyo, Japan, November 28th, 2016.
- (14) 有坂慶紀, 由井伸彦, 骨形成因子固定のための超分子培養基材の表面設計, 第 26 回日本 MRS 年次大会, 横浜市開港記念会館, 神奈川, 2016 年 12 月 20 日.

〔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：
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：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。