

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01223

研究課題名(和文) 弾性率制御ハニカム多孔膜とラマン計測による幹細胞のメカノトランスダクション解明

研究課題名(英文) Revealing mechanotransduction of stem cells by elastic modulus regulated honeycomb films and Raman measurements

研究代表者

藪 浩 (Yabu, Hiroshi)

東北大学・材料科学高等研究所・准教授

研究者番号：40396255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：弾性率制御されたハニカムスキャフォールドの作製法を確立し、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)やiPS細胞などの幹細胞および神経系細胞などについてその接着・増殖・分化をモニタリングすることに成功した。これらのデータベースを基に特徴的な分化制御能を与える材料変面条件を得ることに成功した。また、Coupled Cahn-Hilliard方程式を基にした高分子微粒子構造制御の理論モデル構築に成功し、本モデルを基に自己組織化による有機無機コンポジット微粒子の作製に成功した。磁性粒子と金ナノ粒子をコンポジットした高分子微粒子は液中で磁場によって任意の部位のラマン散乱測定が可能であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞の分化制御は再生医療において重要な技術であり、これまでサイトカインや遺伝子導入など、液性因子を用いた分化誘導が行われてきた。本研究は幹細胞の培養環境であるスキャフォールドの構造と力学物性が幹細胞の接着・増殖・分化に与える影響を明らかとするものであり、本研究により明らかにされた幹細胞分化とスキャフォールド等の培養条件の相関は、再生医療の発展に資するものである。さらに本研究で開発した微粒子による局所部位でのラマン散乱計測プローブは、細胞などの液体中でも特定の位置の化学物質の動態情報を3次元的に取得することを可能にするものであり、上記のスキャフォールドによる幹細胞分化機序の解明に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Fabrication of elastic modulus controlled honeycomb films was successfully realized and applied them to the substrates for cultivating hMSC, iPS, and neuron cells with controlling their adhesion, proliferation, and differentiation. By using those data, extraction of conditions for controlling differentiation of stem cells was achieved. Furthermore, theoretical simulation based on coupled Cahn-Hilliard equation revealed the nanoscale structural control of polymer particles, and inorganic-organic composite particles with nanostructures were successfully prepared. By using magnetic nanoparticles and gold nanoparticles as composite materials with polymers, nanostructured composite particles were successfully prepared by self-organization process and applied them to site selective Raman scattering measurement probes.

研究分野：高分子化学

キーワード：自己組織化 ハニカムスキャフォールド ラマン散乱 微粒子 幹細胞 原子間力顕微鏡 フェイズフ
ィールド バイオナノテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療研究において、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) や iPS 細胞などの幹細胞を望みの系譜に分化させる技術は必要不可欠である。現在、様々な培養方法によって幹細胞の増殖・分化を制御する研究が行われているが、分化効率や成功率の低い細胞が多いことが大きな課題である。細胞の増殖・分化を制御する因子には、液性因子と足場素材が挙げられ、培地については様々な生体由来成分が検証されている一方、スキャフォールドはポリスチレンに代表される硬い人工材料がほとんどであった。

近年、メカノバイオロジー研究の発展により、足場素材の物理的・構造的特性によっても培養細胞の機能性が飛躍的に変化することが知られつつある。申請者らは結露した水滴を鑄型としたポリマーハニカム状多孔質膜が得られること、ポリブタジエン (PB) から作製したハニカム状多孔質膜は、光架橋により化学的特性を変えずに弾性率を数十 MPa~数 GPa まで制御出来ることを報告している。ゲルなどに比べ 10~100 倍の弾性率を持つ様々な強度を持った生体材料を模倣することができるばかりか、表面をハニカム状多孔によって立体的に設計できるため、細胞外マトリクスタンパク質 (ECM) に見られるような表面の空隙度合いをも極めて正確かつ安易に設計ができる。また、この多孔質膜をスキャフォールドとして用いた場合、細胞の接着や幹細胞の分化がその表面トポロジーと弾性率により変化することをすでに見いだしている。さらに、ハニカムスキャフォールドの弾性率・孔径および培地条件に依存して、hMSC の神経・骨芽・脂肪細胞への分化が促進されることを明らかにした。しかしながら、幹細胞におけるメカノレスポンスの分子機序は未だ不明である。ハニカムスキャフォールドがもたらすメカノトランスダクションと幹細胞分化の影響を明らかとするためには、培養中の幹細胞中で起きるメカノレスポンスの動態を非侵襲的に計測する技術が必要不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は物性・力学を自在に調節できる独自の「ハニカムスキャフォールド」上で hMSC および iPS を培養し、磁場応答性を持つ近赤外励起表面増強ラマン散乱微粒子を可視化プローブとして、幹細胞のメカノレスポンスをリアルタイムで可視化・数値化することで、培養基材のメカノトランスダクションによる幹細胞分化の分子機序を明らかとすることである。申請期間中に①抗体結合磁場応答性ラマン散乱増強 (SERS) 粒子の作製と物性評価②弾性率・孔径を制御したハニカムスキャフォールド上での幹細胞培養、③抗体結合 SERS 粒子を磁場により幹細胞の特定位置への導入、④SERS イメージングによる In Situ 化学動態の可視化実現、および⑤生化学的データを含めた多変量解析を行う。

3. 研究の方法

本研究は以下の5つのマイルストーンを設定することにより、効率的に研究を遂行する。

①抗体結合磁場応答性ラマン散乱増強 (SERS) 粒子の作製と物性評価

SORP 法により、ポリスチレン (PS) 末端アミン基を持つポリブタジエン (PB-NH₂)、ポリマー被覆した酸化鉄ナノ粒子からコア-シェル型微粒子を作製し、クエン酸還元により作製した金ナノ粒子と混合することで、有機-無機コンポジット微粒子の作製を行う。粒径・コア-シェル比・金ナノ粒子濃度などの条件を変化させることにより、粒子表面に金ナノ粒子が高密度に充填され、磁場によって駆動可能な有機-無機コンポジット微粒子を作製する。得られた粒子のプラズモン吸収波長が 500 nm 程度から近赤外領域にレッドシフトしていることを現有の紫外-可視-近赤外分光光度計 (UV-Vis-NIR) により測定し、構造と吸収波長の相関を確認する。

②弾性率・孔径を制御したハニカムスキャフォールド上での幹細胞培養

光架橋により弾性率を制御可能なポリブタジエン (PB) から孔径がサブセルラーサイズ (数百 nm) ~ オーバーセルラーサイズ (数十 μm) に制御されたハニカムスキャフォールドを作製し、光架橋を行う。光架橋の進行は現有のフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を用いてモニタリングする。架橋の時間を変えたサンプルを AFM により表面弾性率を測定し、光架橋時間と弾性率、および孔径の3軸を変化させたスキャフォールドを用意する。

③抗体結合 SERS 粒子を磁場により幹細胞の特定位置への導入

SERS 粒子にシグナル伝達物質を吸着させ、近赤外励起でラマン散乱が増強されることを、現有のラマン散乱分光器により測定する。空間分布に関する時系列情報が得るために、SERS 粒子の表面に存在する金ナノ粒子の保護剤であるクエン酸等に抗体などを縮合させる方法を開発する。

④SERS イメージングによる In Situ 化学動態の可視化実現

磁場により抗体結合 SERS 粒子を時空間的に操作できることを確かめる。微小領域に磁場を制御するために、針状のネオジウム磁石を機械加工により作製し、マイクロマニピュレータで操作する事により、時空間的に磁場を制御し、抗体結合 SERS 粒子の空間位置が制御できることを確認する。

⑤生化学データを含めた多変量解析

自動観察装置内で hMSC および hiPSC の培養を行いながらその活性について画像データおよび生物学的評価の蓄積をさらに進める。hMSC の生物活性評価は、前年度構築のアルゴリズムによって非破壊評価（接着増殖率・細胞形態・移動度・接着率）について位相差顕微鏡から得られた画像情報解析を行うことで、1つ1つの細胞に対しての定量的高次元スコアを得て、 $P \cdot \varepsilon$ というスキャフォールドパラメータとの相関関係をマッピングする。

4. 研究成果

弾性率制御ハニカムスキャフォールド上で hMSC および iPSC 細胞の培養を行い、時系列での細胞数から接着・増殖率などの量的データ、サイズや細胞外周長などの形態データを取得した。さらに、各分化マーカーを用いて、骨細胞や脂肪細胞への分化を確認し、孔径が大きく、弾性率が高く硬いハニカムスキャフォールド上では分化が進むこと、特に骨細胞への分化が進んでいることが確認された。この結果は、ハニカムスキャフォールドの弾性率・孔径が細胞分化に影響を与えることを裏付けるデータである。これらのデータ取得が完了したことから、総合的なパラメータ相関に関する検討を続けており、まとめり次第論文として報告する予定である。

さらに柔軟なハニカムスキャフォールドを PET メッシュに直接作製することで延伸などの力学変形に対応可能な自己支持性多孔膜スキャフォールドの作製にも成功した (Soft Matter (2017))。細胞の培養中における化学動態を追跡するためには、免疫染色など細胞に対して侵襲性のある手法を用いることは困難である。そこで、培養細胞の化学動態をモニタリングする手法として、貴金属ナノ構造を持つ表面での化学物質のラマン散乱が著しく増強される表面増強ラマン散乱 (SERS) による In Situ 観察が有用な手法として知られている。既往の手法は基板上に作製した貴金属ナノ構造上で細胞培養を行い、基板と培養細胞界面の情報を取得する手法が用いられていた。しかしながらこの手法では、基板-界面近傍の情報しか得ることができないという欠点があった。

藪らは独自の微粒子作製法である「自己組織化析出 (SORP)」法を用いることで、ブロック共重合体やポリマーブレンドからナノ構造を持つ微粒子が作製できることを見出している。さらにその内部構造制御について、西浦らと共に理論モデルの構築を行い、Coupled Cahn-Hilliard 方程式に基づくシミュレーションにより、微粒子の構造を再現・予測できることを見出した (ACS Omega (2018),(2019))。さらにナノ構造を制御したポリマー微粒子と貴金属ナノ粒子や磁性粒子とのコンポジットを作製することにより、多様なナノ構造を持つ有機-無機コンポジット微粒子の作製に成功した (Particles and Particle Systems Characterization (2018), RSC Advances (2019))。

特定の抗原等を微粒子に認識させるためには、微粒子表面に抗体等を結合させる手法が必要不可欠である。藪らは Delaittre らと共同でクリック化学を用いた微粒子表面への部位選択的の化学修飾の手法を考案し、実際に様々な官能基をナノ構造を持つ微粒子の特定の部位に選択的に修飾することに成功した (Advanced Functional Materials (2018))。本手法は抗体等を微粒子表面に部位選択的に修飾する基礎となる。

さらに、金ナノ粒子のシェルを持ち、コア部に磁性酸化鉄ナノ粒子を導入したコンポジット微粒子の作製に成功した。さらに、金ナノ粒子のサイズや形態を変えることにより、吸収波長が近赤外領域まで拡張することに成功した。これらの粒子を用いて近赤外励起による吸着分子のラマン散乱を測定したところ、励起光とコンポジット微粒子の吸収波長が一致した場合に著しい SERS シグナルの増強が確認された (図 2)。本コンポジット微粒子は磁性酸化鉄ナノ粒子をコアに持つため、磁場で移動・集積が可能であり、液中の細胞などの観察において部位特異的に 3 次元 SERS 観察を可能とする。以上の結果から、マイルストーン①・③についても達成し、④についてはその基礎を確立できた。

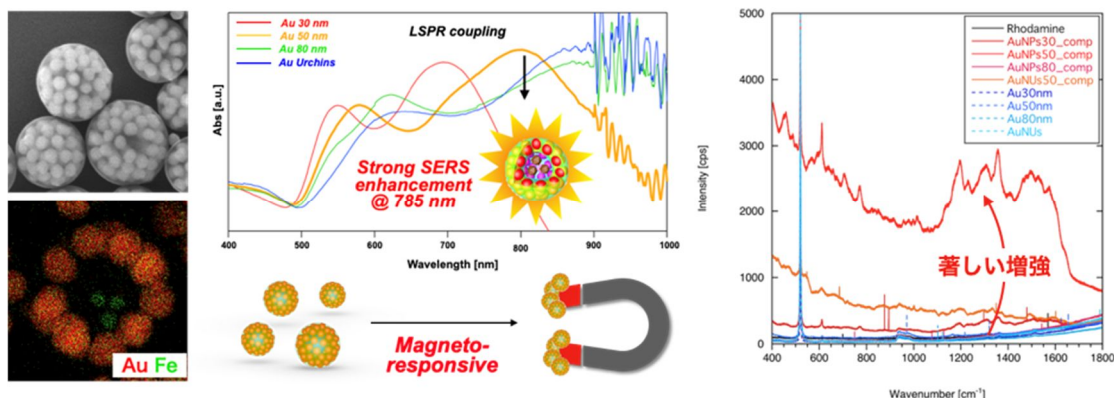


図 2. 磁性粒子・金ナノ粒子からなる SERS 増強メタマテリアル微粒子の SEM 像・EDX マッピング像(左)、金ナノ粒子の種類による吸収波長変化(中央)と吸着分子の SERS スペクトル(右)。(ACS Applied NanoMaterials (2018))

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 D.Varadharajan, H. Turgut, J. Lahann, H. Yabu, G. Delaittre	4. 巻 28
2. 論文標題 Surface-Reactive Patchy Nanoparticles and Nanodiscs Prepared by Tandem Nanoprecipitation and Phase Separation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 1800846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.201800846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Hirai, Y. Matsuo, H. Yabu	4. 巻 1
2. 論文標題 Near Infrared Excitable-SERS Measurement Using Magneto-Responsive Metafluids for In Situ Molecular Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 4980-4987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.8b01093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 N.Sakamoto, Y. Hirai, T. Onodera, T. Dezawa, Y. Shibata, H. Kasai, H. Oikawa, H. Yabu	4. 巻 36
2. 論文標題 Enhanced Fluorescence and Magnetic Alignment Control of Biphasic Functionalized Composite Janus Particles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Particles and Particle Systems Characterization	6. 最初と最後の頁 1800311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ppsc.201800311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Peter van Heijster, Chao-Nien Chen, Yasumasa Nishiura, Takashi Teramoto	4. 巻 31
2. 論文標題 Pinned Solutions in a Heterogeneous Three-Component FitzHugh-Nagumo Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dynamics and Differential Equations	6. 最初と最後の頁 153-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10884-018-9694-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroshi Yabu, Shusaku Nagano	4. 巻 7
2. 論文標題 Formation of unusual microphase-separated ultrathin films of poly(vinyl catechol-block-styrene) (PVCa-b-PSt) at the air-water interface by solution casting onto water	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 33086-33090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7RA06574D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jun Kamei, Hiroshi Yabu	4. 巻 13
2. 論文標題 One step fabrication of mesh-reinforced hierarchic perforated microporous honeycomb films with tunable filtering property	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 7834-7839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7SM01411B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Edgar Avalos, Takashi Teramoto, Hideaki Komiyama, Hiroshi Yabu, Yasumasa Nishiura	4. 巻 3
2. 論文標題 Transformation of Block Copolymer Nanoparticles from Ellipsoids with Striped Lamellae into Onionlike Spheres and Dynamical Control via Coupled Cahn-Hilliard Equations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 1304-1314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.7b01557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yasumasa Nishiura
2. 発表標題 Classification of amorphous materials and the dynamic toughness problem
3. 学会等名 Phase-Field Models of Fracture (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasumasa Nishiura
2. 発表標題 Frustrated Nanoparticles and their Metamorphosis
3. 学会等名 KSIAM 2018 Spring Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Yabu
2. 発表標題 Experimental and Theoretical Approaches for Controlling of Morphologies of Nanostructured Polymer Particles
3. 学会等名 E-MRS 2018 Spring Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 触媒の製造方法、電極の製造方法、燃料電池の製造方法、触媒、電極、燃料電池、炭素材料の製造方法、積層体の製造方法、炭素材料及び積層体	発明者 藪浩、他4名	権利者 国立大学法人東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-038034	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 触媒、塗工液、電極及び燃料電池	発明者 藪浩、他5名	権利者 国立大学法人東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-037521	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p> 藪研究室ウェブサイト https://www.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/yabu_lab/index/Welcome.html 簡単に化学修飾できるウイルス状ポリマー粒子の作製に成功 http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/08/press20180810-3web-AIMR.html メタマテリアル微粒子による超高感度な分析技術を開発 http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/08/press20180830-01-meta-material.html 藪研究室ホームページ http://www.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/yabu_lab/index/Welcome.html </p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西浦 廉政 (Nishiura Yasumasa) (00131277)	北海道大学・電子科学研究所・特任教授 (10101)	
研究分担者	加藤 竜司 (Kato Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	中嶋 健 (Nakajima Ken) (90301770)	東京工業大学・物質理工学院・教授 (12608)	
研究分担者	松尾 保孝 (Matsuo Yasutaka) (90374652)	北海道大学・電子科学研究所・教授 (10101)	