

令和 3 年 4 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01482

研究課題名(和文) ナノセルロースの界面物理化学に基づく細胞外マトリックスの生物機能模倣

研究課題名(英文) Biofunctional design of nanocellulose by physicochemical biomimetics of extracellular matrix

研究代表者

北岡 卓也 (KITAOKA, Takuya)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：90304766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体細胞を取り囲む細胞外マトリックスの化学構造とナノ形状を、天然多糖のセルロースとキチンを用いて機能模倣する新戦略で細胞培養基材を開発した。生理活性のないセルロースにTEMPO酸化を施してカルボキシ基を導入したナノセルロース薄膜では、マウス線維芽細胞の良好な初期接着性が見られ、酸性基量や結晶形に依存する特異な細胞増殖特性が発現した。さらに、“細胞接着性を示さない”キトサンナノファイバーと混合することで細胞増殖性が著しく向上した。生体抽出成分と異なり、樹木や甲殻類から大量に入手できる天然多糖を用いるバイオアダプティブ基材の開発コンセプトの実証に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療の発展が切り拓く健康・長寿社会への期待から、iPS細胞をはじめとする細胞側の制御研究に加えて、生体外で細胞・組織培養するための足場材料開発の重要性も高まっている。本研究は、天然多糖の樹木セルロースナノファイバーや甲殻類由来キチンナノファイバーが、人工合成不可能な固有のナノ形状と糖鎖界面を備えることに着目し、既存のプラスチック培養基材では見られない、特異な細胞応答挙動を見出した。特に、これまで細胞接着に不利と考えられてきた親水性基材による細胞接着・増殖の促進効果は、天然多糖の未知機能としての学術的意義に加えて、再生医療用細胞培養基材の実用化の面からも興味深い重要な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：A novel concept in cell culture engineering has been investigated through physicochemical biomimetics of extracellular matrix found in vivo using natural polysaccharide nanofibers. TEMPO oxidation of bio-inert cellulose provided surface-carboxylated nanocellulose having collagen-like nanofiber form and hyaluronan-like repeated carboxylates, which remarkably enhanced the cell attachment and proliferation of mouse fibroblasts, strongly depending on the carboxy contents and crystalline structures. Besides, the combination with chitosan nanofibers without any cell adhesion capability was surprisingly allowed to boost up the cell proliferation efficiency, far superior to commercial tissue culture polystyrene plates. Pure and structurally-regulated polysaccharide nanofibers, different from extracted bio-components that often cause therapeutic problems, are expected to have the potential to design bioadaptive cell culture scaffolds in “Glyconanoarchitectonics” to realize materials therapy.

研究分野：木質科学・多糖バイオマテリアル科学

キーワード：セルロース キチン・キトサン ナノファイバー 構造多糖 界面修飾 細胞・組織培養 バイオインターフェース バイオマテリアル

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 再生医療実現の鍵を握る細胞培養技術の発展が希求されており、なかでも核酸・タンパク質に次ぐ第三の生命鎖である糖鎖に注目が集まっている。細胞外マトリックス (ECM) は、細胞の増殖や分化に直接関与する重要な生命機能を司ることから、ECM 模倣基材の開発が盛んである。ところで、生体 ECM はナノファイバー形状や規則的な糖鎖繰り返し構造などの特徴を有するが、これらの構造模倣を可能にする高分子合成は極めて困難であり、新発想の材料設計思想と戦略が必須である。

(2) 樹木の主成分であるセルロースや甲殻類の外骨格を成すキチンは、地球上で最も豊富に存在する天然多糖類であり、ともに極細のナノファイバー形状を有する。また、TEMPO 触媒酸化や脱アセチル化処理により、結晶界面に規則的にカルボン酸や一級アミンを導入できることから、合成高分子では成し得ない、高度な構造規則性を持つナノファイバーを設計できる (図 1)。この唯一無二の特徴を生かして、天然多糖類から新規細胞培養基材を開発する試みは、大きな可能性を秘めている。

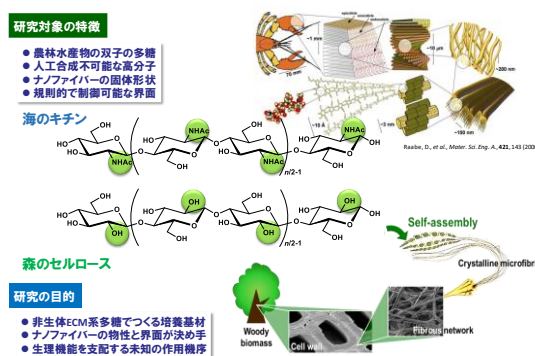
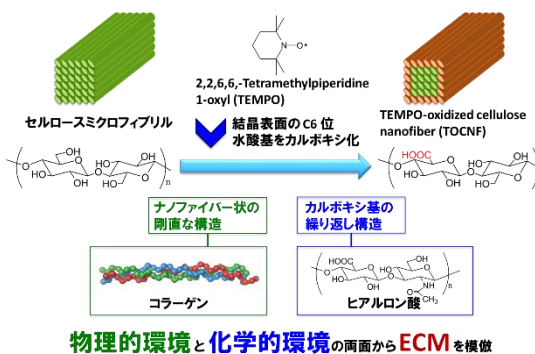


図 1 本研究対象の概要と研究構想

2. 研究の目的

(1) 本研究では、セルロースナノファイバー (CNF) を用いることで、ECM の主要成分であるコラーゲンのナノファイバー形状を物理的に模倣した。さらに、CNF の結晶表面を、2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) の触媒酸化によりカルボキシ基を規則的に導入することで、同じく ECM であるヒアルロン酸のウロン酸型繰り返し構造の模倣を試みた (図 2)。物理的・化学的に ECM を模倣した TEMPO 酸化ナノセルロース (TOCNF) を用いて細胞培養基材を調製し、マウス由来線維芽細胞 NIH/3T3 などの培養を試みた。



物理的環境と化学的環境の両面から ECM を模倣

図 2 生体 ECM の構造模倣の基本コンセプト

(2) セルロースの構造アナログであるキチンを脱アセチル化したキトサン (Cs) は、抗菌活性や創傷治癒促進効果などを示す生理活性多糖である。そこで、TOCNF と一級アミノ基を有するナノファイバー形状の Cs (CsNF) を組み合わせることで、新規培養基材の開発を試みた。作製した混合基材を用いて、NIH/3T3 細胞の接着・増殖挙動を詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) 物理解繊 CNF の TEMPO 酸化を行う際、次亜塩素酸 Na 添加量でカルボキシ基の導入量を精密制御した。TOCNF 水分散液 (0.4 wt%) を 200 μ L ずつ直径 15 mm のカバーガラスに塗布し、室温乾燥させて細胞培養基材とした。TOCNF の結晶形をマーセル化処理で I 型から II 型に変態させた基材も用いた。対照として、細胞培養用ポリスチレン (TCPS) を用いた。

(2) TOCNF/CsNF 混合基材の調製では、カルボキシ基量とアミノ基量の変えて、各ナノファイバー水分散液を混合し、30 秒の超音波処理を行った。TOCNF 単独、CsNF 単独の場合も同様に超音波処理を施し、各溶液をカバーガラスに 200 μ L ずつ塗布後、室温で 24 h 乾燥させた。対照は TCPS 基材を用いた。

(3) 細胞培養用プレート (TCPS, 24 well) に作製した各種基材を設置し、DMEM 培地 (10% ウシ胎児血清、5% ペニシリン/ストレプトマイシン, 500 μ L) を添加し、懸濁した各種細胞 (NIH/3T3 細胞、マウス由来筋芽細胞 C2C12、ヒト肝ガン細胞 HepG2) を分注した (最終濃度 2.0-5.0 \times 10⁵ cells/well)。37°C, 5% CO₂ 条件下で 3-72 h 培養し、Cell Counting Kit-8 で細胞数を計測した後、カルセイン AM で生細胞を緑色、エチジウムホモダイマー III で死細胞を赤色に染色して蛍光顕微鏡で観察を行った。また、ライブセルイメージング測定も行った。

4. 研究成果

(1) カルボキシ基量の異なる TOCNF 基材の調製と構造観察

TEMPO 酸化処理は、CNF の結晶界面に露出している C6 位の一級水酸基のみを選択的にカルボキシ基に酸化できることから、その界面は、ヒアルロン酸に見られる 2 残基に 1 つが酸化されたウロン酸型の繰り返し構造の規則性を有する (図 2)。この人工合成不可能なナノファイバーを調製し、キャスト法で造膜したところ、カルボキシ基のない元の CNF では白濁した膜となったが、カルボン酸の導入にともない、透明・均質な薄膜をガラス基板上に造膜することができた (図 3)。SEM 観察の結果、表面は非常になめらかで、AFM 観察より、膜表面にナノファイバー形状が確認できた。

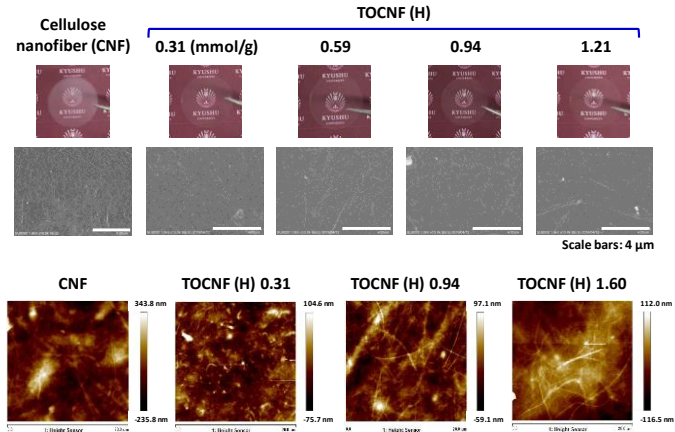


図 3 TOCNF 薄膜の光学像・SEM 像・AFM 像

(2) TOCNF 膜上での NIH/3T3 細胞の培養特性

含有カルボキシ基量の異なる TOCNF 基材上で NIH/3T3 細胞を 72 h 培養した結果、カルボキシ基を持たない元の CNF 基材およびカルボキシ基量が少ない 0.39 mmol/g の TOCNF 基材では細胞が凝集したスフェロイドを形成し、基材上に弱く接着した (図 4)。カルボキシ基量が 0.59–0.94 mmol/g の TOCNF 基材では、細胞接着に不利な親水性表面であるにもかかわらず、細胞が基材に接着・伸展しており、カルボキシ基量が多いほど、生細胞数が増加した。しかし、カルボキシ基量が 1.60 mmol/g の基材では再びスフェロイドを形成し、生細胞数も減少した (図 4)。一般的に、播種した細胞が基材に接着するためには、はじめに培地中の血清に含まれる糖タンパク質であるフィブロネクチンやビトロネクチンなどの細胞接着分子が基材に吸着する必要がある。そのため、細胞培養にはタンパク質の吸着に適した疎水性基材が用いられるが、本結果から、CNF 界面の親水性のカルボキシ基が細胞接着に直接的な影響を与える可能性と、最適なカルボキシ基量の存在が示唆された (図 4)。この現象はこれまでに報告がなく、TOCNF に特異的なバイオアダプティブ特性、すなわち、生体との相互作用を能動的に制御するマテリアルとして、非常に興味深い研究成果である。

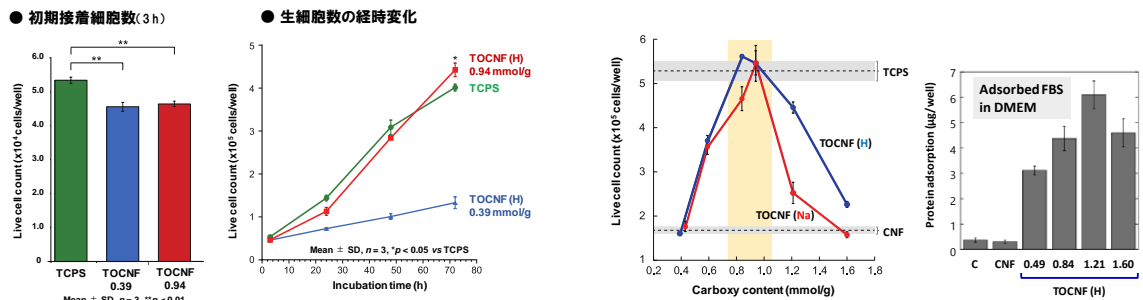
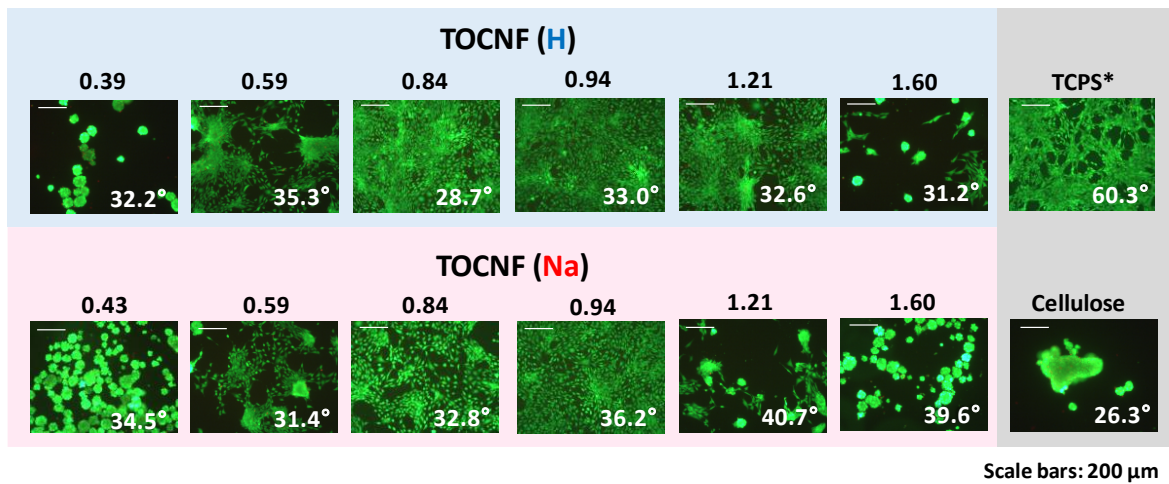


図 4 TOCNF 薄膜上での NIH/3T3 細胞の挙動、表面カルボキシ基量依存的な細胞接着挙動およびタンパク質の吸着挙動

(3) TOCNF 薄膜の結晶構造および細胞種の違いによる接着挙動の変化

特異な細胞接着挙動を示した TOCNF 薄膜であるが、天然セルロースから調製しているため、その結晶構造は伸び切り平行鎖の I 型である。これを、マーセル化処理により結晶構造を逆平行鎖の II 型にすると、処理前では細胞が接着可能なカルボキシ基量であっても細胞がスフェロイドを形成した (図 5)。このことから、物理的因子であるセルロースの結晶形も細胞接着に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、NIH/3T3 と同じく線維芽細胞の C2C12 は良好に接着したが、上皮細胞の HepG2 は接着性が弱く、スフェロイドを形成した (図 6)。細胞種による接着挙動の違いが基材の物性に依存するかは定かではないが、新規なバイオアダプティブ特性として興味を持たれる。

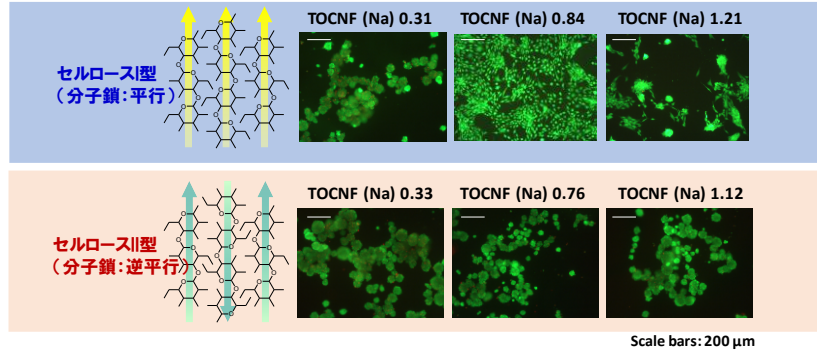


図 5 TOCNF の結晶形と細胞接着挙動

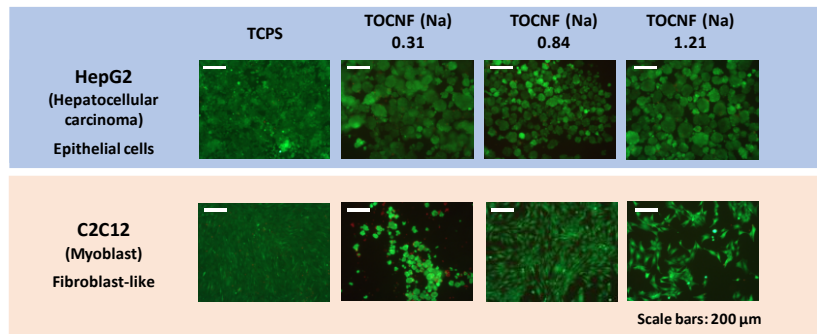


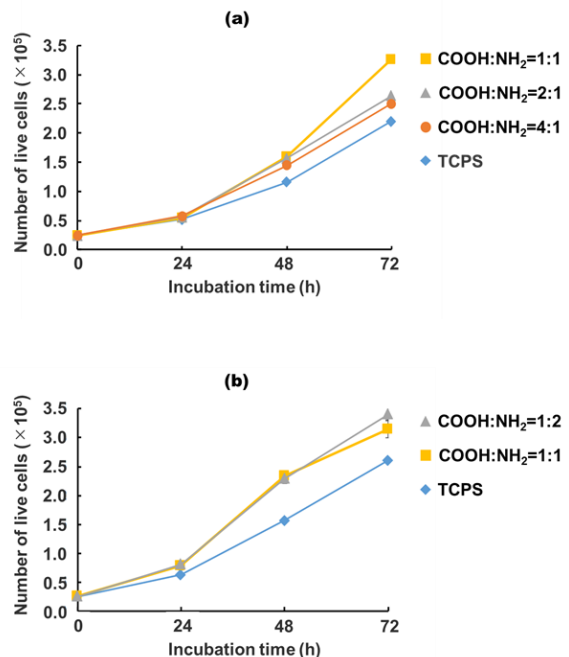
図 6 TOCNF 薄膜上での各種細胞の接着挙動

(4) 森と海多糖ナノファイバー混合基材上での NIH/3T3 細胞の特異な細胞増殖挙動

異なる種類の多糖ナノファイバーの組み合わせに着目した細胞培養基材の機能探究を試みた。

TOCNF/CsNF 混合基材における官能基のモル比を検討したところ、アミノ基に対してカルボキシ基を等倍、2 倍、4 倍とした基材では、培養 72 h で官能基のモル比が等倍 (COOH:NH₂ = 1:1) の基材で最も細胞数が増加していた (図 7a)。また、カルボキシ基に対して、アミノ基を等倍、2 倍、4 倍とした基材では、官能基のモル比が等倍 (COOH:NH₂ = 1:1) の基材と 2 倍 (COOH:NH₂ = 1:2) の基材との間に、培養 72 h 後の細胞数の有意な差はみられなかった (図 7b)。官能基のモル比が 4 倍 (COOH:NH₂ = 1:4) の基材はナノファイバー水分散液を混合し、超音波ホモジナイザー処理後に溶液が凝集したため基材の作製には至らなかった。これらの結果より、官能基のモル比が等倍 (COOH:NH₂ = 1:1) の基材が有望であった。この基材について、以下でさらなる検討を進めた。

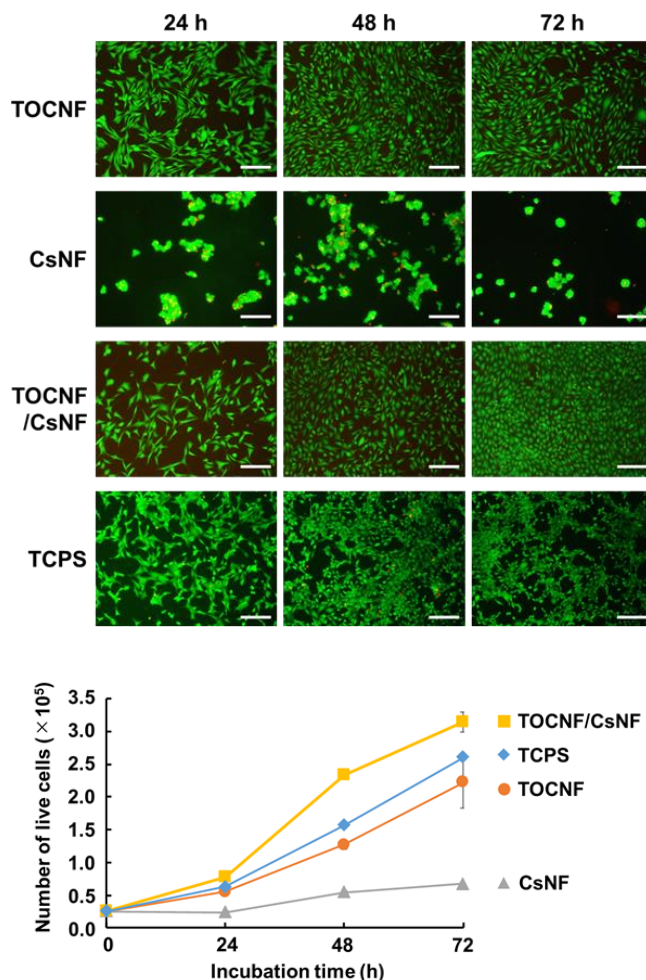
図 7 TOCNF/CsNF 混合比の異なる基材上での NIH/3T3 細胞の接着挙動



(5) 多糖混合基材における生細胞数の変化

TOCNF 単独基材および TOCNF/CsNF 混合基材では、TCPS と同等に細胞が良好に接着・伸展していたが、生理活性が期待された CsNF 単独基材では細胞がほとんど接着・伸展せず、細胞同士が凝集してスフェロイドを形成した (図 8)。培養 72 h 後の細胞数を測定したところ、細胞数は CsNF 基材で著しく少なかった。一方、TOCNF/CsNF 混合基材では、TCPS、TOCNF 単独基材よりも細胞数が多く、極めて良好な細胞接着・増殖挙動を示した。さらに、基材への初期接着を検討したところ、各基材間に初期接着細胞数の差異は見られなかった。これらから、各基材が接着後の細胞の生育段階に影響を及ぼしたことが推察された。また、生理活性多糖の Cs (ナノファイバーではない) には線維芽細胞の接着促進効果は乏しいものの、増殖促進効果が報告されていることから、TOCNF/CsNF 混合基材においては、細胞接着後に CsNF による増殖促進効果が発現し、TCPS および TOCNF 単独基材を上回る接着特性を獲得した可能性が考えられる。構造アナログの組み合わせによる一種の協奏効果の作用機序に興味を持たれる。

図 8 TOCNF/CsNF 混合薄膜上での NIH/3T3 細胞の接着挙動



(6) 各種基材への細胞接着挙動

ライブセルイメージングは、細胞の詳細な接着挙動を動的に観察する手法であり、多糖ナノファイバー基材と細胞との相互作用状態を可視化できる。本研究で調製した TOCNF 基材、CsNF 基材および TOCNF/CsNF 混合基材への NIH/3T3 細胞の初期接着挙動を観察したところ、CsNF 基材ではほとんど接着できずに細胞が培地に浮遊していたが、混合基材では速やかに仮足を伸ばして基材と作用する様子が確認できた (図 9)。細胞接着における基材との直接的な相互作用の存在が示唆された。

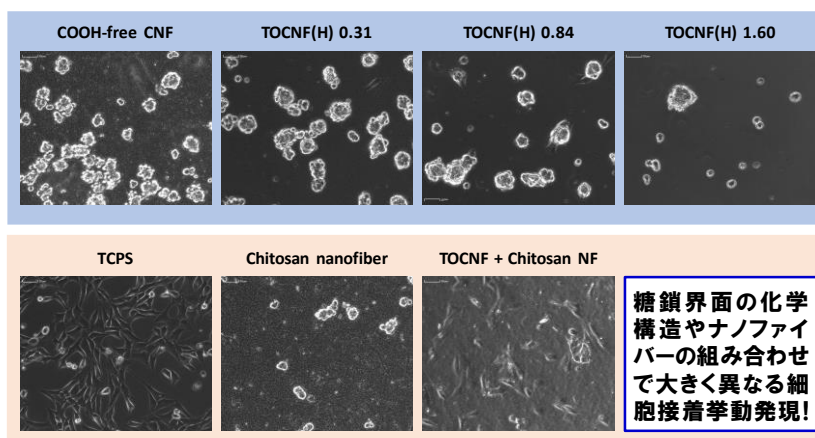


図 9 各種基材表面への NIH/3T3 細胞接着のライブセルイメージングスナップショット

本研究により、細胞培養における多糖ナノファイバーの界面構造の重要性が実証された。また、天然の構造多糖類の特徴である剛直なナノファイバー構造に着目することで、生体内の ECM を物性と界面特性の両面から模倣できる可能性が強く示唆された。今後、詳細な機構解明の探究により、CNF の界面物理化学の制御に基づく ECM 機能模倣を志向したバイオマテリアルの開発が可能となる。また、マテリアルが生体機能を制御するバイオアダプティブ工学の未踏領域「グライコナノアーキテクニクス」の研究基盤の構築につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mayumi Hatakeyama, Daisuke Ryuno, Shingo Yokota, Hirofumi Ichinose, Takuya Kitaoka	4. 巻 178
2. 論文標題 One-step synthesis of cellooligomer-conjugated gold nanoparticles in a water-in-oil emulsion system and their application in biological sensing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfb.2019.02.051	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 畠山真由美、北岡卓也	4. 巻 56
2. 論文標題 糖鎖薄膜の界面設計と細胞接着	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本接着学会誌	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kojiro Uetani, Naliharifetra Jessica Ranaivoarimanana, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka	4. 巻 16
2. 論文標題 Inherently Distinctive Potentialities and Uses of Nanocellulose Based on its Nanoarchitecture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioResources	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hatakeyama Mayumi, Nakada Fumi, Ichinose Hirofumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 175
2. 論文標題 Direct stimulation of cellular immune response via TLR2 signaling triggered by contact with hybrid glyco-biointerfaces composed of chitohexaose and cellohexaose	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 517 ~ 522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfb.2018.12.039	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 -

〔学会発表〕 計32件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 糖鎖薄膜の界面機能化と細胞接着
3. 学会等名 日本接着学会4研究会合同シンポジウム「接着の未来」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Hatakeyama, Hirofumi Ichinose, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Fibroblast cell culture on extracellular matrix-mimetic scaffolds composed of surface-carboxylated nanocellulose
3. 学会等名 2019 TAPPI International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Biomaterials Innovation for Forest and Marine Polysaccharides
3. 学会等名 Academic Seminar at King Mongkut's University of Technology North Bangkok (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Magical nanocellulose: TEMPO-oxidized cellulose nanofibers for catalytic and advanced applications
3. 学会等名 Cellulose-based Biomaterials Workshop at King Mongkut's University of Technology North Bangkok (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Hatakeyama, Hirofumi Ichinose, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Extracellular matrix-mimetic scaffolds based on surface-carboxylated nanocellulose for fibroblast cell culture
3. 学会等名 6th International Polysaccharide Conference of EPNOE (European Polysaccharide Network of Excellence) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 構造多糖ナノファイバーでECM機能を惹起する細胞培養基材の開発
3. 学会等名 第3回多糖マテリアル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 天然構造多糖のナノ・バイオマテリアルの未来探訪
3. 学会等名 紙パルプ技術協会木材科学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Cellulose and Chitosan Nanofibers for Green Organocatalysis
3. 学会等名 EPNOE (European Polysaccharide Network of Excellence) Junior Online Seminar 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 天然構造多糖のナノ・バイオマテリアルの新機能開拓
3. 学会等名 異分野技術の融合によるCNF社会実装促進事業、第3期（2020年度）ナノセルロース塾（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayumi Hatakeyama, Tomoka Noda, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Nanofibers-based biomaterials composed of surface-carboxylated nanocellulose for cell culture applications
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress Virtual（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoka Noda, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Nanofibers-based biomaterials composed of nanocellulose and nanochitosan to promote fibroblast cell adhesion and proliferation
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress Virtual（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Concept-driven trial and error to find out new functions of nanocellulose
3. 学会等名 Failed Brilliance in Nanocellulose Science and Technology, 257th American Chemical Society National Meeting & Exposition 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 ナノセルロースが主役の先端マテリアルの機能開拓
3. 学会等名 グリーン科学技術研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 糖鎖薄膜のナノ界面構造が決め手の細胞培養基材の設計戦略
3. 学会等名 平成29年度第47回繊維学会夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北岡卓也
2. 発表標題 構造多糖の界面を生体反応の相互作用場とする細胞培養基材の設計戦略
3. 学会等名 第66回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 畠山真由美、北岡卓也（分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 315
3. 書名 無機/有機材料の表面処理・改質による生体適合性付与「糖鎖薄膜の界面ナノ構造と細胞応答」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

生物資源化学研究室ホームページ
http://bm.wood.agr.kyushu-u.ac.jp/

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	一瀬 博文 (ICHINOSE Hirofumi) (00432948)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

	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 協力者	畠山 真由美 (HATAKEYAMA Mayumi) (20871437)	九州大学・農学研究院・学術研究員 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------