

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22223

研究課題名(和文)細胞ゲル材料の創出

研究課題名(英文)Generation of cell-based hydrogels as supra-functional materials

研究代表者

長濱 宏治(NAGAHAMA, KOJI)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：00551847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：N-カドヘリンを発現するマウス筋芽細胞で2つの細胞架橋ゲルを製し、容器内で積層するとゲル同士は自発的に接着した。上のゲルと下のゲルの細胞同士がN-カドヘリン依存的な細胞間結合を形成した。細胞ゲルでは、界面で細胞間結合により生じた接着力がゲルネットワークを通じて集積・統合し、さらにゲル全体に伝播することで、ゲル全体として接着力を示した。さらに、C2C12細胞ゲルを細断し、ゲル断片を容器内でまとめて培養すると、断片同士は自発的に接着して傷口は修復され、ひと塊のゲルを復元したことより、細胞ゲルは生体組織と同様な機構で自己治癒機能を発現し、まさに「生きているゲル」として振舞うことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、生きている細胞が示す高次な機能や応答を、生細胞を組み込んだ材料全体の機能として発現させることが可能だと実証した世界初の例であり、本成果は材料科学全般に対して、新しい材料設計指針を提供するものである。また、本研究成果は細胞の新しい使用方法を提案するものでもあり、細胞生物学全般に対しても強いインパクトをもたらす。つまり、本研究成果は、挑戦的研究萌芽に相応しい学術的意義をもつものである。細胞ゲルを生体組織に接触させて静置すると、ゲルは組織に強く接着するを見いだしており、本研究成果の応用例として、自家細胞を用いた新規な生体接着剤を検討している。

研究成果の概要(英文)：Biological-tissues exhibit significant high-performance self-healing, and cadherin-mediated cell-cell adhesion is a key mechanism in the healing process. This is because cells are capable of a certain level of motility and actively migrate to damage sites, thereby achieving cell-cell adhesion with high efficacy. Here, we report biological-tissue-inspired self-healing hydrogels in which azide-modified living cells are covalently cross-linked with alkyne-modified alginate polymers via bioorthogonal reactions. As a proof-of-concept, we demonstrate their unique self-healing capabilities originating from cadherin-mediated adhesion between cells incorporated into the gels as mobile healing mechanism. This study provides an example of self-healing material incorporating living components into a synthetic material to promote self-healing.

研究分野：生命高分子科学

キーワード：細胞 ハイドロゲル 自己治癒 接着 カドヘリン クリックケミストリー

1. 研究開始当初の背景

現在最も有望視されている刺激応答ゲル(スマートゲル)は、核酸やタンパク質などの賢い生体高分子を共有結合により合成高分子とハイブリッドしたゲルである。これらバイオハイブリッドゲルでは、外部刺激により誘起される生体高分子の構造変化を起源として、ゲル全体がマクロな動的応答を示す。バイオハイブリッドゲルは、生体高分子の賢さに由来して高い機能を示し、その機能は合成高分子のみで構成される刺激応答ゲルを凌駕している。応募者もこれまでにスマートゲルに関する基礎および応用研究を行っており、ゲルを高機能化するため、多糖やペプチドをハイブリッドする手法を用いてきた。近年では、バイオハイブリッドゲルの動的応答を診断などライフサイエンス分野で応用するための研究が盛んに行われているが、ゲルが動的応答を発現する起源が生体高分子の構造変化であるため、動的応答として膨潤・収縮しか得られず、多様性や汎用性に欠けるという課題がある。このような背景のもと、私たちは『地球上で最も賢い物質である細胞』に着目し、生きている細胞を共有結合により合成高分子とハイブリッドしたゲルを着想し、開発に取り組んできた。近年、細胞ゲルの作製に成功し、そのユニークで高い機能を実証できた。

2. 研究の目的

細胞ゲルが発現する動的応答や機能は、ゲル内の細胞が示す賢い反応や応答を起源とするため、従来の高分子ゲルでは得られないユニークで賢いものであり、細胞ゲルは次世代ゲル材料となる可能性を秘めている。一方で、「ゲルの架橋点である細胞が示す反応や応答」と「細胞ゲル全体が発現する動的応答や創発機能」の相関は解明できていないのが現状である。今後、細胞ゲルを広く応用展開していくためには、動的応答や創発機能が発現する機構の全容を解明する必要がある。そこで、本研究課題では、細胞ゲルの架橋点である細胞が示す反応や応答を網羅的に解析し、それらを起源として発現する動的応答や創発機能を探索することで、細胞ゲルが発現する動的応答や創発機能の全容を解明し、その発現機構を明らかにする。

3. 研究の方法

細胞ゲルの材料特性を理解するには、細胞ゲルの物性を徹底して調べ、また物性を決定する要因を知る必要がある。そこで、諸物性を左右すると考えられる要因(細胞の種類、細胞へのアジド基導入数、細胞濃度など)を系統的に変化させて作製した細胞ゲルの物性を解析し、各要因と物性との関係を解明する。さらに、上記要因の調整により、ゲル物性を制御する。また、細胞ゲル内の細胞が示すどのような反応や応答が、ゲルに動的応答や創発機能を発現させる起源となるのか理解するため、本項目では、細胞ゲル内の細胞が示す反応や応答を網羅的に定量解析する。さらに、細胞ゲルが発現する動的応答や創発機能の全容、および発現機構の解明を目的に、細胞反応や応答を起源として、細胞ゲルがどのような動的応答や創発機能を発現するのか探索する。

4. 研究成果

細胞の糖代謝反応を利用すれば、細胞膜タンパク質の糖鎖シアル酸に細胞が本来もたない官能基を導入することができる。細胞ゲルは2段階反応により作製した(図1)。まず、糖代謝反応により細胞膜タンパク質糖鎖シアル酸にアジド基を導入した。次いで、アルギン酸とアミノ末端4分岐型ポリエチレングリコールを反応させてアルギン酸を分岐体とした後、複数のシクロオクチン(DBCO)基を化学修飾した(bAlg-DBCO)。アジド化細胞をbAlg-DBCO水溶液で均一に懸濁し、37℃で生体直交型反応を進め、細胞ゲルを得た。ゲルネットワークの連通路を介してゲル内の細胞に栄養素や酸素を供給でき、また細胞の老廃物もゲル外に拡散されるため、細胞ゲルは培地中37℃で高い生存率を維持したまま長期間培養できる。これまでに、様々な細胞(筋芽細胞、筋衛星細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞など)を用いて細胞ゲルの作製を確認した。細胞はゲルの架橋点であり、アルギン酸ゲルネットワークと共有結合している。つまり、ゲル内の細胞はゲルネットワークを介して互いに連結しており、これが細胞ゲルの最大の特徴である。

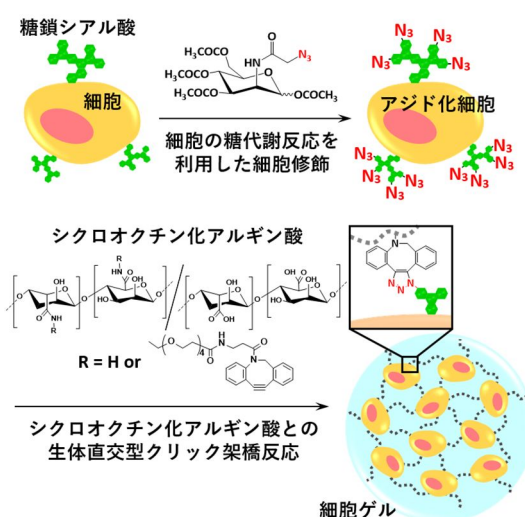


図1. 細胞ゲルの作製方法.

細胞ゲル内の細胞が示す機能を起源として活用し、ゲル全体にマクロな機能を発現させることができるだろうか。細胞膜タンパク質カドヘリンにはN型やE型などのタイプがあり、同タイプのカドヘリン同士がカルシウムイオン依存的に結合する。この仕組みにより、細胞は同タイプのカドヘリンを発現する細胞と選択的に細胞間結合を形成し、三次元的な組織を構築する。私たちは、選択的な細胞間結合形成を活用したゲルへの機能付与を検討した[1]。N-カドヘリンを発現するマウス筋芽細胞(C2C12)で2つの細胞ゲルを作製し、容器内で積層して培養したところ、ゲル同士は自発的に接着した(図2a)。上に重ねたゲルの細胞と下のゲルの細胞を蛍光色素で染め分け、N-カドヘリンを免疫蛍光染色した後、ゲル界面を共焦点顕微鏡で観察すると、上のゲルと下のゲルの細胞同士がゲル間をまたいでN-カドヘリン依存的な細胞間結合を形成している様子が見られた。一方、コントロールゲル(非アジド化C2C12細胞をbAlg-DBCOで懸濁し、カルシウムイオンで物理架橋したゲル:細胞はゲルネットワークの間隙に物理的に内包されており、ゲルネットワークと化学的に連結していない)を容器内で積層すると、界面でN-カドヘリン依存的な細胞間結合の形成は見られたが、ゲルの接着は起こらなかった。つまり、コントロールゲルでも、ゲル界面に位置する細胞において細胞間結合による接着力は発生しているものの、細胞がゲルネットワークに連結していないため、接着力がゲル全体に伝達されず、ゲル全体としての接着力は発生しなかった。それに対して細胞ゲルでは、界面で細胞間結合により生じたミクロな接着力がゲルネットワークを通じて集積・統合し、さらにゲル全体に伝播することで、ゲル全体としてマクロな接着力の発生に結びついた。E-カドヘリンを発現する好中球性の前骨髄球(HL-60)で細胞ゲルを作製し、C2C12細胞ゲルと積層してもゲル同士は接着しなかったことより、ゲルの接着反応はカドヘリンのタイプ依存的であることが示された。つまり、細胞が持つ選択的な細胞間結合形成機能を活かして、ゲルに選択的接着機能を付与することができた。

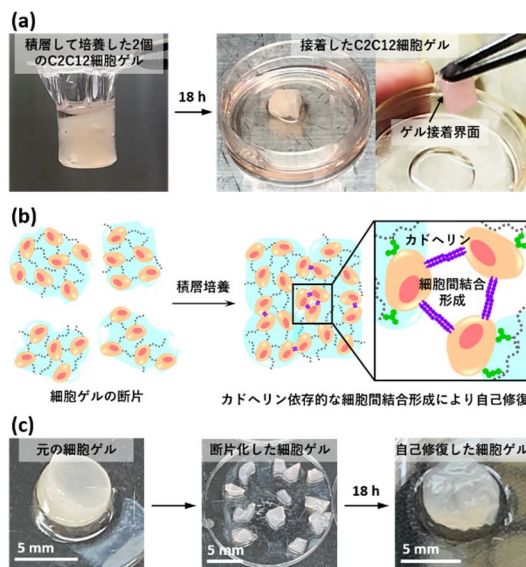


図2. 細胞ゲルの自己治癒特性。

そこで次に、この接着機能を活かしてゲルの自己治癒機能を検討した(図2b)。C2C12細胞ゲルを不均一な形状および断面を持つ断片に細断し、ゲル断片を容器内でまとめて培養すると、断片同士は自発的に接着して傷口は修復され、ひと塊のゲルを復元した(図2c)。つまり、細胞ゲルは生体組織と同様な機構で自己治癒機能を発現し、まさに「生きているゲル」として振舞うことが示された。最近、C2C12細胞ゲルをマウス骨格筋組織に接触させて静置すると、ゲルは骨格筋組織に強く接着することを見いだしており、自家細胞を用いた新規な生体接着剤として応用できないか検討している。

細胞ゲルの生医学材料としての応用の一例として、再生医療、特に組織工学への応用を検討した[2]。アジド化細胞とbAlg-DBCOの反応溶液をゲル形成直前に生体に注射投与すると、投与部位でゲルを形成し、移植した細胞は高い生存率(95%)を示したことから、インジェクタブル細胞ゲルとして検討した。細胞をゲルネットワークの間隙に物理的に内包して移植する従来のゲルと比較すると、細胞ゲルの特徴は主に2点ある。特徴：細胞をゲルネットワークに共有結合して移植するため、細胞移動を制限し、強制的にゲル内に留めることができる。実際に、従来の細胞内包タイプのコントロールゲル(非アジド化細胞とbAlg-DBCOの懸濁液をカルシウムイオンで物理架橋して作製したゲル)と比べて、細胞ゲルは1.7倍高い細胞保持率を示した。特徴：細胞ゲル内の細胞はゲルネットワークを通じて互いに連結しているため、生体組織の力学刺激が効果的に細胞に伝達する。メカノバイオロジー研究により、細胞は受容する力学刺激に応じて機能や応答を変化させることが報告されている。実際に、収縮・弛緩の力学刺激が常に生じている骨格筋組織に着目し、下肢骨格筋損傷マウスの損傷部位にC2C12細胞ゲルを注射投与すると、2週間後には移植細胞の大部分が筋分化し、配向性のある成熟した筋組織を再建した。一方、従来の細胞内包タイプのコントロールゲルでC2C12細胞を移植した筋損傷マウスでは、筋組織の再建は起こらなかった。インジェクタブル細胞ゲルの特徴は、心筋・腱・軟骨・骨など力学刺激が常に生じている組織に対して、画期的な再生医療技術を提供できると期待される。

参考文献

- [1] K. Nagahama *et al.*, *ACS Macro Lett.*, 10, 1073(2021).
 [2] 長濱宏治, *ファルマシア*, 57, 1030-1034(2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuka Kimura, Seika Aoyama, Natsumi Ueda, Tokitaka Katayama, Kimika Ono, Koji Nagahama	4. 巻 5
2. 論文標題 Covalent Cell Loading Injectable Hydrogel Scaffold Significantly Promotes Tissue Regeneration In Vivo Compared with a Conventional Physical Cell Loading Hydrogel Scaffold	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Biology	6. 最初と最後の頁 2000106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adbi.202000106	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 長濱宏治	4. 巻 3
2. 論文標題 細胞移植用インジェクタブルゲルの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 724-728
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 Kimika Ono, Yuka Sanada, Yuka Kimura, Seika Aoyama, Natsumi Ueda, Tokitaka Katayama, Koji Nagahama	4. 巻 8
2. 論文標題 A thin hydrogel barrier linked onto cell surface sialic acids through covalent bonds induces cancer cell death in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 577-585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9BM01758E	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 Koji Nagahama, Seika Aoyama, Natsumi Ueda, Yuka Kimura, Tokitaka Katayama, Kimika Ono	4. 巻 10
2. 論文標題 Biological Tissue-Inspired Living Self-Healing Hydrogels Based on Cadherin-Mediated Specific Cell-Cell Adhesion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Macro Letters	6. 最初と最後の頁 1073-1079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmacrolett.1c00359	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 長濱宏治	4. 巻 57
2. 論文標題 生体直交型反応による細胞とハイドロゲルの融合 - 医療応用を目指して -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1030-1034
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 長濱宏治	4. 巻 71
2. 論文標題 細胞を高分子で架橋したハイドロゲルの作製および生医学材料としての応用展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 高分子	6. 最初と最後の頁 73-74
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 青山星海、長濱宏治
2. 発表標題 細胞の接着および結合反応を利用したゲルの特異的接着および自己修復機能の発現
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Nagahama, Yuuka Kimura, Seika Aoyama
2. 発表標題 Living functional hydrogels generated by bioorthogonal cross-linking reactions of azide-modified cells with alkyne-modified polymers
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 菜摘美, 木村 友香, 長濱 宏治
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞ゲルの作製およびゲル投与による骨格筋再生促進効果の検討
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山 星海, 長濱 宏治
2. 発表標題 カドヘリンによる細胞間結合を接着機構とする自己復元ゲルの開発および新しい組織修復材料としての提案
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅文也、青山星海、木村友香、上田菜摘美、長濱宏治
2. 発表標題 カドヘリンの特異的な細胞-細胞間結合に基づいた生体模倣自己治癒ゲルの開発
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長濱宏治、上田菜摘美、木村友香、山口純、小野寺智洋、岩崎倫政
2. 発表標題 細胞を高分子で架橋したハイドロゲルを用いた骨格筋再生技術の開発
3. 学会等名 第40回整形外科バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田菜摘美、長濱宏治
2. 発表標題 細胞架橋ゲルを用いた生体の力学刺激に応答する組織工学技術の創出
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

甲南大学フロンティアサイエンス学部ホームページ http://www.konan-first.jp/ 長濱研究室ホームページ https://www.konan-u.ac.jp/hp/nagahama/
--

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

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
---------	---------