

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20514

研究課題名（和文）光スイッチに応答した分化制御細胞足場材の開発

研究課題名（英文）Development of a photo-switch-responsive cell scaffold to regulate cell differentiation

研究代表者

宮島 浩樹（Miyajima, Hiroki）

横浜国立大学・大学院工学研究院・特任教員（助教）

研究者番号：80905589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞分化を制御するための機能性材料開発に向けて、光刺激に応答して機能化するハイドロゲルの作製と得られたハイドロゲルの細胞足場材料への応用を目指した。光刺激によって構造が変化する光応答性化合物を光スイッチとして応用し、骨分化誘導因子と光スイッチを高分子鎖に導入して光応答性高分子ハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルに光照射することで、ハイドロゲルからの骨分化誘導因子の放出を確認した。本ハイドロゲル上で間葉系幹細胞の骨分化培養を行い、光照射処理を施したハイドロゲル上での間葉系幹細胞の骨分化誘導を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分化の制御は、細胞機能解析や組織再生など再生医療における基礎から応用まで幅広い領域への貢献が期待できる。本研究で実証した細胞分化を制御するための技術は、刺激応答性ハイドロゲルを細胞足場として応用したものであり、細胞足場として応用する分子や材料の設計を基軸として工学的な研究領域から細胞工学や再生医療分野の研究発展に貢献するための研究開発指針を示すものである。

研究成果の概要（英文）：For development of functional materials to control cell differentiation, functionalized hydrogels in response to light stimuli were prepared and the obtained hydrogels were applied as scaffold for cell culture. A photo-responsive compound that structurally change by light irradiation was applied as a photo-switch, and an osteogenesis-inducing factor and the photo-switch were introduced into polymer to prepare photo-responsive hydrogels. By light irradiation of the prepared hydrogels, the release of the osteogenesis-inducing factor from the hydrogels after light irradiation was confirmed. Mesenchymal stem cells (MSCs) were cultured on the hydrogel with the photo-switch and osteogenesis-inducing factor, and osteogenesis of MSCs on the hydrogel was demonstrated by light irradiation.

研究分野：生体関連化学

キーワード：細胞足場 ハイドロゲル 幹細胞 細胞分化 光制御

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は医療技術の発展のための重要な研究課題であり、医学や理工学など様々な分野から盛んに研究開発が進められている。再生医療研究における高効率な幹細胞の分化制御に向けて、特定の細胞やその細胞の周辺環境を微細にコントロールする技術の開発が求められている。細胞培養のための材料工学的な研究開発では、機能性の高い材料を細胞足場となる培養基材として応用することで、その材料による細胞機能の向上や制御が実証されている。そこで機能性細胞足場を構築し、細胞分化を制御することができれば、材料工学的な側面から組織再生や細胞分化機構の解明など再生医療研究に広く貢献できる技術開発として期待できる。

### 2. 研究の目的

細胞培養のための足場材料は細胞が接着・増殖できる培養基材であり、コラーゲンなどのハイドロゲルが応用されている。本研究ではハイドロゲルに光刺激で応答する部位(光スイッチ)を導入し、光スイッチに分化誘導因子を結合させることで、光スイッチの反応に応じて細胞分化を制御するハイドロゲル細胞足場の開発を目的とする(図1)。本技術を確立できれば、材料への刺激に応じた細胞分化の制御が可能となり、生体内で実際に起こる細胞分化を人為的に再現するような多段階的な分化誘導や組織モデル構築など、再生医療に関わる新しい工学的研究アプローチとなりうる。

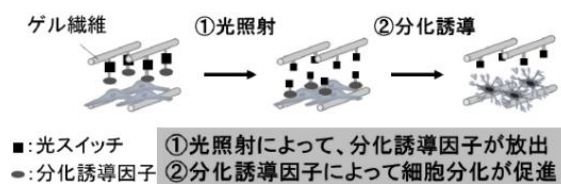


図1. 光スイッチを応用した細胞分化制御.

### 3. 研究の方法

#### (1) 分化誘導因子を結合した光分解性モノマーの合成

光応答性モノマーとして知られているオルトニトロベンジルアクリレート (*o*-NBA) を選択した (A.M. Kloxin, *et al.*, *Nat. Protoc.* 2010, 5, 1867–1887)。*o*-NBA は光刺激によって分子内の結合が開裂する光応答性分子であり、その特性を応用した機能性材料が報告されている。この *o*-NBA を合成し、間葉系幹細胞 (MSCs) の骨分化誘導因子として知られているデキサメタゾン (Dex) を *o*-NBA に導入した化合物 (NBA-Dex) を合成した。得られた化合物についての構造解析を行い、目的物の合成確認を行った。また、NBA-Dex の光分解挙動を解析するため、0.05 mM NBA-Dex の DMSO 溶液に 365 nm の光を照射し、光照射に伴う NBA-Dex 溶液の紫外可視分光光度計による UV-Vis スペクトルの経時的変化を調査した。

#### (2) ハイドロゲル作製とハイドロゲルからの骨分化誘導因子の光放出

ハイドロゲルを作製するため、ゼラチンメタクリレート (GelMA) を選択した。GelMA はゼラチン誘導体であるため生体適合性が高く、開始剤の存在下でメタクリレートが重合して安定的なハイドロゲルを形成することから、細胞培養のためのハイドロゲル足場材料として広く研究されている。合成した GelMA を NBA-Dex と共重合することで、NBA-Dex を担持したハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルに 365 nm の光を照射し、そのハイドロゲルを DMSO に浸漬することで、光刺激によってハイドロゲル内から放出された NBA-Dex について定量評価した。

#### (3) ハイドロゲル細胞足場による骨分化誘導

作製したハイドロゲルを細胞培養のための培養基材 (細胞足場) として応用した。実験では、骨や脂肪、筋肉などの組織に分化することが知られているヒト間葉系幹細胞を選択した。間葉系幹細胞の骨分化を分化誘導する分化誘導因子の1種である Dex について、まずは任意の濃度の Dex を溶解した Dex 含有培地で間葉系幹細胞の骨分化培養を行った。続いて、目的の光応答性ハイドロゲルを用いて、間葉系幹細胞の骨分化培養を行った。7 日間の骨分化培養の過程で、3 日に 1 度の培地交換とハイドロゲルへの光照射を行い、骨分化培養を行った。培養後の細胞について、カルシウムと錯形成するアリザリンレッド S 染色剤によって染色することで、ハイドロゲル細胞足場の骨分化誘導能を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 骨分化誘導因子を結合した光分解性モノマーの合成

目的の光スイッチとして、光応答性モノマーのオルトニトロベンジルアクリレート (*o*-NBA) を合成した。光応答性モノマーに骨分化誘導因子デキサメタゾン (Dex) を結合させることで、分化誘導因子を結合した光応答性モノマーの NBA-Dex を得た (図 2A)。得られた化合物の構造解析として、<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR による構造解析を行い、合成反応によって新しく形成した結合に由来する NMR ピークを確認した。質量分析 (MALDI-TOF-MS) によっても目的物の分子量に相当するピークが得られたため、得られた化合物が目的の NBA-Dex であることを確認した。

ハイドロゲルに NBA-Dex を導入する前に、得られた NBA-Dex の光分解挙動について調査した。0.05 mM NBA-Dex の DMSO 溶液に 365 nm の光を一定時間照射し、光照射に伴う NBA-Dex 溶液の UV-Vis スペクトルの経時的変化を測定した。その結果、光照射に伴って、UV-Vis スペクトルが変化する様子が確認できた (図 2B)。また、光照射後の NBA-Dex 溶液について、<sup>1</sup>H NMR で構造解析したところ、光照射による <sup>1</sup>H NMR ピークの変化が確認でき、合成した化合物が光刺激によって分解することを確認した。

(2) ハイドロゲル作製とハイドロゲルからの骨分化誘導因子の光放出

ハイドロゲルを作製するため、ゼラチンメタクリレート (GelMA) を選択した。GelMA はゼラチン誘導体であり、生体適合性が高い高分子材料として組織培養や細胞プリンティング等に应用されている。ハイドロゲル作製のための水溶性化学開始剤の存在下で、GelMA と (1) で合成した NBA-Dex を混合することで、光応答性部位を介して骨分化誘導因子を結合した高分子ハイドロゲルを作製した。用いた GelMA や NBA-Dex、開始剤の濃度を最適化することで、細胞培養条件でも安定的なハイドロゲルを作製できた。作製したハイドロゲルに 365 nm の光を一定時間照射し、そのハイドロゲルを DMSO 浸漬することによって、ハイドロゲル高分子鎖から切り出された NBA-Dex を回収し、定量評価した。その結果、わずか数分程度の光刺激で細胞の骨分化誘導が期待できる程度の NBA-Dex がハイドロゲルから切り出される結果が得られた。

(3) ハイドロゲル細胞足場による骨分化誘導

初めに骨分化誘導因子 Dex が間葉系幹細胞の骨分化誘導で働くことを確認するための実験を行った。不含 (0 nM), 10 nM, 100 nM の Dex を溶解した培地を用いて、間葉系幹細胞の 7 日間の骨分化培養を行ったところ、培養後のリアルタイム PCR によって 100 nM Dex 含有培地で培養した間葉系幹細胞において骨分化マーカー遺伝子 *RUNX2* および *ALP* の発現上昇を確認した。続いて、(2) で作製したハイドロゲルを細胞足場として応用し、骨分化培養を行った。用いたハイドロゲルの間葉系幹細胞への細胞毒性は低毒性であることを確認した後、目的の骨分化培養を実証した。7 日間の骨分化培養後、間葉系幹細胞が接着した NBA-Dex ハイドロゲルをアリザリンレッド S 染色後にサンプル観察を行ったところ、光照射したハイドロゲルにおいて、アリザリンレッド S の赤色染色が顕著に見られ、骨分化誘導が確認できた。この結果から NBA-Dex ハイドロゲルを細胞足場として応用することで、光照射によってハイドロゲルから NBA-Dex が切り出され、間葉系幹細胞の骨分化誘導が促進される可能性が示唆された。

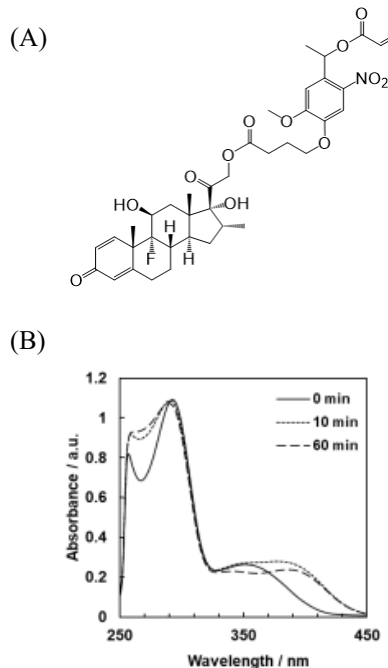


図 2. NBA-Dex の化学構造 (A) および光照射した NBA-Dex 溶液の UV-vis スペクトル変化 (B) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮島 浩樹・澁井 晶仁・加藤 朗佳・飯島 一智
2. 発表標題 骨分化制御を指向した誘導因子結合型光応答性モノマーの開発
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Miyajima・Akihito Shibui・Saeka Kato・Kazutoshi Iijima
2. 発表標題 Photo-responsive Monomer-Dexamethasone Conjugate for Osteogenesis
3. 学会等名 第32回日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮島 浩樹・加藤 朗佳・飯島 一智
2. 発表標題 細胞機能制御を目指した光応答性細胞足場の開発
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会（2022）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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