

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620170

研究課題名(和文)ハニカムスキャフォールドを用いた幹細胞操作技術の新展開

研究課題名(英文)A New development of Controlling Stem Cells by Using Honeycomb Scaffolds

研究代表者

藪 浩(YABU, HIROSHI)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：40396255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリブタジエン(PB)およびポリスチレン(PS)を溶媒に溶かし、界面活性剤を加えてキャスト製膜することにより、ハニカム状多孔質膜の作製を行った。また、リファレンス用として、それぞれのフラット膜を作製した。PBについては、UV露光により光架橋を行った。表面弾性率を原子間力顕微鏡を用いて測定し、弾性率が未架橋PB<架橋PB<PSであることが示唆された。それぞれの基板上でヒト間葉系幹細胞を様々な分化誘導培地で培養したところ、細胞の接着および分化が弾性率と孔径等のパラメータによって異なる事が明らかとなった。これらの知見は幹細胞操作技術の新しい展開をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Honeycomb patterned scaffolds have been fabricated by casting solutions of polybutadiene (PB) and polystyrene (PS) containing amphiphiles under humid conditions. Flat films of these materials were also prepared as reference films. By irradiation of UV light, PB honeycomb and flat scaffolds were cross linked. By using an atomic microscope, surface modulus of each sample has been measured. The measurement revealed that surface modulus increased by UV irradiation. Human mesenchymal stem cells were cultured on these scaffolds and we found that adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cells were modulated by changing scaffold parameters including surface modulus and pore sizes. These results will open a path to a new development on controlling behavior of stem cells.

研究分野：高分子化学

キーワード：自己組織化 ハニカム状多孔質膜 幹細胞 分化 接着

1. 研究開始当初の背景

疾患によって侵された組織を自己の細胞から *in vitro* で再構築し、体内に戻すことにより治療を行う再生医療・組織工学の分野において、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) や iPS 細胞に代表される幹細胞を望みの組織に増殖・分化させることは必要不可欠な技術である。現在様々な液性因子や遺伝子導入により、幹細胞の増殖・分化を行う研究が行われているが、がん化や感染の問題を避けて通れないのが現状である。

近年、数十~数百 kPa 程度の弾性率を持つゲルやエラストマーなどからなるスキャフォールドのトポロジーや硬さを変えることにより、幹細胞の接着・増殖・分化に影響することが報告されている。本研究はハニカムスキャフォールドという新しい細胞培養基材により、幹細胞の接着・増殖・分化の制御を行う事を目的としている。細胞-材料表面の相関に関する代表的な研究を弾性率と表面パターンとの観点からまとめた図を図2に示す。低弾性領域ではハイドロゲルの弾性率や表面パターンングを組み合わせた研究がすでに報告されている。一方、無機物や硬質ポリマーであるポリメチルメタクリレート (PMMA) などを用いた表面パターンングについても検討がなされている。しかしながら弾性率が数 MPa~数 GPa でセルラー (細胞と同等) サイズ~サブセルラーサイズにおける研究はこの研究領域のミッシングリンクとなっている。また、既往の研究では材料表面の弾性率は材料に依存し、一部のゲルを除いて弾性率を同一形状で系統的に変えることは困難であった。(図1)

申請者らは疎水性ポリマーの溶液を高湿度下でキャスト製膜する事により、結露した水滴を鋳型としてハニカム状多孔質膜が得られること(図2) ポリブタジエン (PB) から作製したハニカム状多孔質膜は、光架橋によりその弾性率を数十 MPa~数 GPa まで制御出来ることを報告している。ごく最近、ゲルなどに比べ 10~100 倍の弾性率を持つにもかかわらず、ハニカム状多孔質膜を細胞培養の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見いだしている。

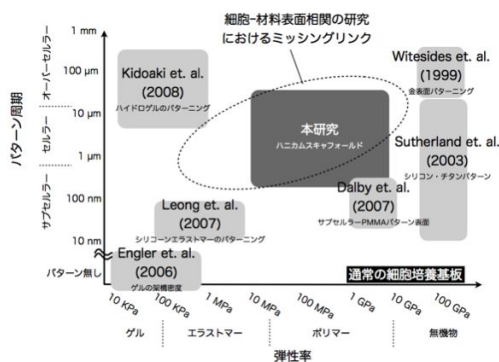


図1. 本研究の目指す領域

そこで、ハニカムスキャフォールドの表面トポロジーと弾性率を系統的に変えて幹細胞の接着・増殖・分化を評価すれば、細胞-パターン化材料表面の相関が明らかとなり、再生医療に必要な足場材料の基礎的知見を得られるのではないかと考えた。

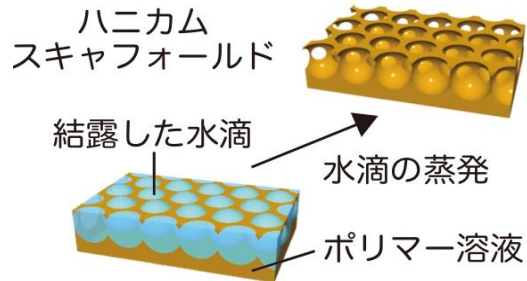


図2. ハニカムスキャフォールドの形成

2. 研究の目的

本研究の目的は、弾性率可変 PB ハニカムスキャフォールド上で hMSC などの幹細胞を培養し、その接着・増殖・分化を系統的に調べることで、スキャフォールドのトポロジーや弾性率がこれらのパラメータに与える影響を総合的に明らかとすることを目的とすることである。

3. 研究の方法

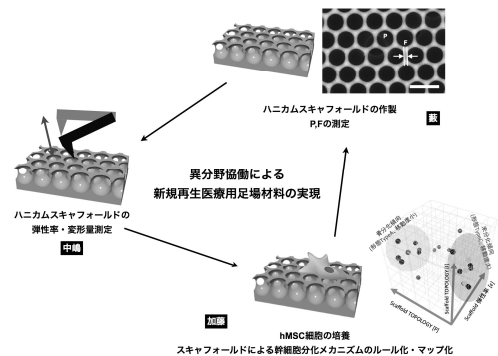


図3. 実験の計画

図3に本研究の計画を示す。細胞のサイズに対して孔径を様々に変えた PB ハニカムスキャフォールドの作製と光架橋を行った。具体的には高湿度下で PB の有機溶媒溶液をキャスト製膜し、水滴を鋳型として PB ハニカムスキャフォールドを作製する。スキャフォールドの孔径 (P)、多孔体フレーム部分の幅 (F) を湿度、溶媒蒸発時間、溶媒の沸点等のパラメータを変えることで制御した。PB を窒素雰囲気下で UV 光を用いた光架橋により、エラストマーレベル (数十 MPa 程度) からエンジニアリングプラスチック (数 GPa 程度) まで、スキャフォールドの弾性率を系統的に変化させた。

次に原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた弾性

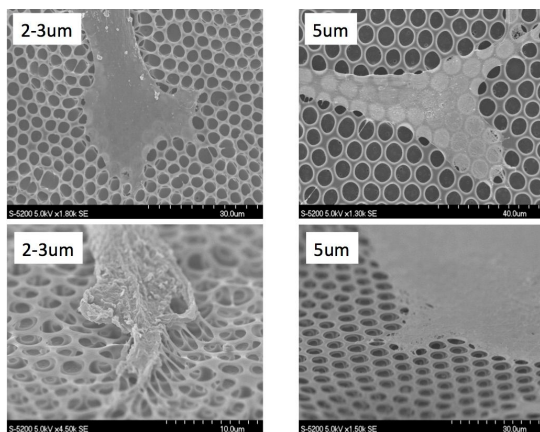
率の評価を行った。現有の AFM を用いて、光架橋時間に対して弾性率がどのように変化するか系統的に検討した。また、細胞は接着する際に基材表面に応力を加える事が知られている。表面構造に応力が加わった際にどのように変形するかについても構造力学計算などを用いて検討した。

hMSC のハニカムスキャフォールド上での培養を行い、多変量画像解析技術を用いて明らかとした。まず、hMSC をさまざまな弾性率のスキャフォールド上で培養しながら視野的・経時的に網羅的な細胞画像データベース取得の実験系を確立した。次に神経分化誘導、骨分化誘導、および脂肪分化誘導培地中での細胞の接着・分化挙動を画像解析技術を用いて計測した。

#### 4. 研究成果

藪らは PB、UV 露光 PB、および PS のハニカムスキャフォールドおよび参照実験用のフラットフィルムの作製を行った。当該フィルムの表面弾性率を中嶋らの AFM によって表面弾性率を測定し、UV 露光時間と表面弾性率の測定を行った。その結果、無露光の PB ハニカムスキャフォールドの弾性率が数十 MPa 程度であったのに対し、露光時間が長くなるに従って、弾性率が上昇し、最終的に 2GPa 程度に上昇することを確認した。

藪らが作製した孔径 2 μm、5 μm、15 μm の PB、UV 露光 PB のハニカムフィルムを 24 枚ずつ加藤らに送付し、神経分誘導培地においてヒト間葉系幹細胞を培養したところ、ばらつきは大きい細胞接着は孔径が大きい方が有利であること、神経分化は孔径が小



さい方が有利であることが示唆された。

図4. ハニカムスキャフォールド上の一缶葉系幹細胞の走査型電子顕微鏡像

さらに詳細にヒト間葉系幹細胞の接着と分化を観察するために、骨分化誘導培地、および脂肪分化誘導培地中での培養を、孔径 2 μm、5 μm、10 μm、15 μm の PB、UV 露光 PB のハニカムスキャフォールドを 48 枚ずつ用意し行った。参照実験として PS のハニカムスキャフォールドおよびそれぞれのフラ

ット膜を 72 枚用意して実験したところ、細胞接着はフラット膜においては無露光の PB が最も良く、ハニカムスキャフォールド上では抑制されている様子が観察された。また、分化においては、孔径 10 μm 程度の孔径で骨分化・脂肪分化共に促進されている様子が観察された。また、ヒト間葉系幹細胞が無露光ハニカムスキャフォールドをその牽引力により変形させていることが走査型電子顕微鏡の像から明らかとなった(図4)。

以上の結果からヒト間葉系幹細胞の接着・分化にハニカムスキャフォールドの弾性率・孔径が大きく影響していることを明らかとした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件) すべて査読あり

(1) Biomimetic Ultra-Bubble Repellent Surfaces Based on Self-Organized Honeycomb Film, J. Kamei, Y. Saito, H. Yabu, Langmuir, 30(47), 14118-14122 (2014).

(2) Bio-Inspired Low Frictional Surfaces Having Micro-Dimple Arrays Prepared with Honeycomb Patterned Porous Films as Wet Etching Masks, Y. Saito, H. Yabu, Langmuir, 31(3), 959-963 (2015).

(3) On-Demand Liquid Transportation Using Bioinspired Omniphobic Lubricated Surfaces Based on Self-Organized Honeycomb and Pincushion Films, J. Kamei, H. Yabu, Advanced Functional Materials, 25(27), 4195-4201 (2015).

(4) Thermally Stable Honeycomb-Patterned Porous Films of a Poly(L-Lactic Acid) and Poly(D-Lactic Acid) Stereo Complex Prepared Using the Breath Figure Technique, H. Abe, Y. Hirai, H. Yabu, Macromolecular Materials and Engineering, accepted for publication.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 亀井潤、阿部博弥、齊藤祐太、藪浩「水中における撥気泡表面の管内表面への作製」第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日～2014 年 5 月 30 日 名古屋国際会議場

〔その他〕

[http://www.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/yabu\\_1abo/index/Welcome.html](http://www.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/yabu_1abo/index/Welcome.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪 浩 (YABU, Hiroshi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授  
研究者番号：40396255

(2) 研究分担者

加藤 竜司 (KATO, Ryuji)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授  
研究者番号：50377884

(3)連携研究者

中嶋 健 (NAKAJIMA, Ken)

東京工業大学・理工学研究科・教授  
研究者番号：90301770