

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630356

研究課題名(和文) 三次元臓器様組織構築に向けた細胞アーキテクトニクス材料の創製

研究課題名(英文) Development of cell architectonics materials for fabrication of 3D organ-like tissues

研究代表者

田口 哲志 (Taguchi, Tetsushi)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA研究者

研究者番号：70354264

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)：ティラピア由来ゼラチンに疎水基としてコレステリル基を導入することにより、様々な導入率を有するコレステリル化ゼラチンを合成した。脂質集合体であるリポソームに添加することにより物理的な架橋形成を動的粘弾性測定により確認した。得られたリポソーム集合体は、コラゲナーゼによる分解された。コレステリル基導入率の高いリポソーム集合体は、低い導入率のものと比較して分解速度が遅かった。肝細胞に対してコレステリル化ゼラチンを添加すると濃度依存的に細胞集合体が形成されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cholesteryl group-modified tilapia gelatins (Chol-T-Gltns) with various Chol contents from 3 to 69 mol% per amino group of Gltn were prepared for the assembly of liposomes and cells. Liposomes were physically crosslinked by anchoring Chol groups of Chol-T-Gltns into lipid membranes. The resulting liposome gels were enzymatically degraded by addition of collagenase. Liposome gels prepared using Chol-T-Gltn with high Chol content (69Chol-T-Gltn) showed slower enzymatic degradation when compared with gels prepared using Chol-T-Gltn with low Chol content (3Chol-T-Gltn). The hepatocyte cell line HepG2 showed good assembly properties and no cytotoxic effects after addition of 69Chol-T-Gltns. In addition, the number of HepG2 cells increased with concentration of 69Chol-T-Gltns. Therefore, Chol-T-Gltn, particularly, 69Chol-T-Gltn, can be used as an assembling material for liposomes and various cell types.

研究分野：生体材料

キーワード：細胞集合 接着材料

1. 研究開始当初の背景

再生医工学技術の進展により、生体吸収性高分子、天然高分子あるいはこれらの複合体から構成される多孔質足場材料が開発され、皮膚、軟骨、骨などの比較的単純な結合組織については、既に臨床応用が始まっている。一方、細胞を主な構成成分とする肝臓、すい臓などの実質臓器を生体外で構築するための材料科学的研究は、十分に行われているとは言えない。これらの臓器に存在する細胞は、E-カドヘリンに代表される細胞間接着分子により細胞間のコミュニケーションが行われ、高い細胞機能を維持している。すなわち、細胞を用いて臓器を生体外で構築するためには、これまでの多孔質材料を用いた手法とは本質的に異なり、細胞をビルディングブロックとして短時間かつ簡便に三次元臓器様組織へ組み上げるための材料、すなわち、細胞アーキテクトニクス材料の創製が必要となる。

2. 研究の目的

細胞アーキテクトニクス材料に必要とされる機能として、細胞集合化能、細胞接着能および分解吸収能が要求される。本研究では、インテグリンに認識され細胞接着性を示すペプチド配列(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)等)を有し、細胞膜を構成している脂質二分子膜にアンカリングして短時間での細胞集合化が可能な疎水基が導入され、かつ、細胞の分泌するマトリックスメタロプロテアーゼ等により酵素的に分解するペプチド配列を有する細胞アーキテクトニクス材料を創製することを目的とした。得られた細胞アーキテクトニクス材料と脂質集合体あるいは培養細胞を用いて、*in vitro*における集合化能および分解性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 細胞アーキテクトニクス材料の合成

インテグリンに認識されるアミノ酸配列(RGD等)およびマトリックスメタロプロテアーゼに対する基質(LGPA等)を主鎖に有する親水性高分子としてゼラチンの側鎖にアミド結合を介して疎水基を導入することにより、細胞アーキテクトニクス材料を合成した。合成は、Dimethyl sulfoxideに溶解させたティラピア鱗由来ゼラチン Triethylamine 存在下の塩基性雰囲気下で Cholesteryl chloroformate を加え、窒素雰囲気下で反応させた。仕込みの Cholesteryl chloroformate を変化させることにより、ゼラチン中のアミノ基に対して種々の疎水基導入率を有するコレステリル基導入ゼラチン (Chol-Gltln) を得た。Chol 基導入率はトリニトロベンゼンスルホン酸法を用いて算出した。得られた細胞アーキテクトニクス材料を核磁気共鳴装置 ($^1\text{H-NMR}$)、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) 等によりキャラクタリゼーションを行った。

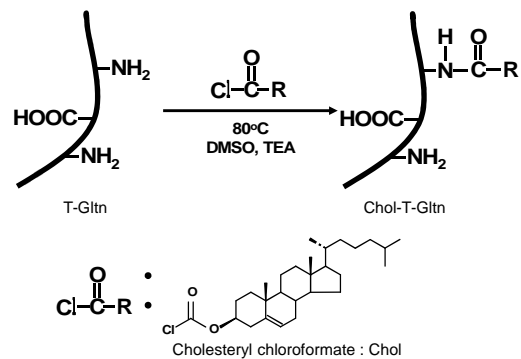


Figure 1. Synthesis of cholesteryl group-modified tilapia gelatin (Chol-T-Gltln).

(2) 細胞アーキテクトニクス材料による脂質/細胞集合体組織形成評価

2.1) 脂質集合体の調製

脂質集合体を調製するため、ナスフラスコを用い、クロロホルムに人工脂質である Dimethyl dioctadecylammonium bromide (DODAB) を 0.01 w/v % で溶解させた。エバポレーターにより十分に減圧乾燥させ、ナスフラスコ壁面に脂質膜を展開させた。脂質濃度 40 mM となるように 50 以上にした超純水を加え、ポルテックスミキサーにより壁面の脂質膜を剥離させた。50 以上の環境において超音波処理し、十分に均一な懸濁液となっていることを確認した。100 nm のフィルターを用い、エクストルージョン法により粒径を制御した。

2.2) 細胞アーキテクトニクス材料による脂質集合体の架橋能評価

得られた脂質集合体に種々の疎水基導入率を有する細胞アーキテクトニクス材料を添加することにより、組織体形成評価(ゲル化)を行った。40mM DODAB 脂質集合体/HEPES 溶液 0.5 ml に対して 40w/v% Chol-Gltln / HEPES 溶液を 0.5 ml 加え、37 において緩やかに攪拌した。その後、動的粘弾性測定により得られた組織体の物理的評価を行った。

2.3) シクロデキストリンを用いた架橋阻害試験

脂質集合体の組織体が、疎水基の Chol の脂質二分子膜に対するアンカリングにより物理架橋されていることを明らかにするため、Chol 基に対して包摂能をもつ β -シクロデキストリンを脂質集合体の組織体に添加した系において、動的粘弾性測定を行った。これにより β -シクロデキストリンを添加した系がゲル化をしなければ、 β -シクロデキストリンが Chol 基を包摂することによってゲルの形成を阻害していることが示唆される。実験は、37 に加温した細胞アーキテクトニクス材料 40 wt % 1 mL に、47 mol の β -シクロデキストリンを溶解させ、40mM DODAB 溶液を体積比 1:1 で加え、攪拌した。その後、

動的粘弾性測定を行った。

2.4) 脂質集合体組織体の酵素分解能評価

Tris Buffer に 2.5 mM となるように CaCl_2 を加えた溶液に細胞アーキテクトニクス材料を溶解させ、40% 細胞アーキテクトニクス材料/Tris-Ca 溶液を調製した。一方、Tris Buffer を用いて調製した 40 mM DODAB 脂質集合体溶液に、5, 10, 15mg/mL となるようにコラゲナーゼを溶解させた。得られた 2 種の溶液を体積比 1:1 で素早く攪拌し、動的粘弾性粘弾性測定を行った。 G' (貯蔵弾性率) = G'' (損失弾性率) となる点をゲル分解点と定義し、コラゲナーゼ濃度依存性、Chol 基導入率依存性を検討した。

一方、脂質集合体組織体の分解時間に対する Chol 導入率の影響を検討するため、Tris Buffer に 2.5 mM となるように CaCl_2 を加えた溶液に Chol 導入率の異なる細胞アーキテクトニクス材料を溶解させ、40% Tris-Ca 溶液を調製した。また、Tris Buffer を用いて調製した 40 mM DODAB 脂質集合体溶液に、5 mg/mL となるようにコラゲナーゼを溶解させた。得られた 2 種の溶液を体積比 1:1 で素早く攪拌し、動的粘弾性粘弾性測定を行った。 $G' = G''$ となる点をゲル分解点と定義し、コラゲナーゼ濃度依存性、Chol 基導入率依存性を検討した。

2.5) 細胞アーキテクトニクス材料による細胞集合体形成評価

HepG2 細胞を用いた細胞架橋能評価を行った。DMEM 培地を使用し、(1 回目 FBS(-), 2 回目以降 FBS(+)) 2 mL チューブに 1×10^6 cells/well となるように細胞懸濁液を 100 μL 加え、そこに細胞アーキテクトニクス材料溶液を 100 μL を加えたのちに 2 min ボルテックスにより攪拌した。その後 48well plate1 に移し、incubate した。Day 1, 3, 7 の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞アーキテクトニクス材料の合成
 ティラピア由来ゼラチン(T-Gltn)に種々の濃度で Cholesteryl chloroformate を添加することにより、表 1 のように導入率が 3.2 - 68.7mol% 導入率を持つ細胞アーキテクトニクス材料(Chol-T-Gltn)を得た。

Table 1. Characteristics of Chol group-modified tilapia gelatin

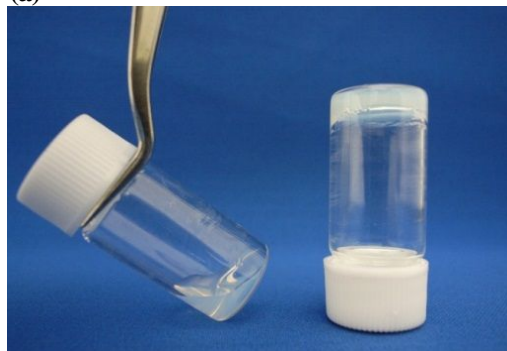
Abbreviation	Chol content (mol%)	CAC (mg/L)	Zeta potential (mV)	Yield (%)
00Chol-T-Gltn	-	36.5	6.02	-
03Chol-T-Gltn	3.2	24.9	-12.10	91.6
11Chol-T-Gltn	11.3	6.63	-2.81	88.6
19Chol-T-Gltn	19.2	5.64	-11.43	83.9
44Chol-T-Gltn	44.4	4.51	-16.30	85.8
69Chol-T-Gltn	68.7	3.42	-11.18	60.9

(2) 細胞アーキテクトニクス材料による脂質集合体の架橋能評価

図 2 (a)には細胞アーキテクトニクス材料を

添加前後の脂質集合体(リポソーム)溶液を示している。添加前においてゾル状のリポソーム溶液は、添加後に明らかなゲル形成を示すことが明らかとなった。また、図 2 (b)には、動的粘弾性測定を行った結果を示す。貯蔵弾性率および損失弾性率のデータからもゲル形成が明らかに認められ、特に Chol 導入率の高い細胞アーキテクトニクス材料については、高い強度のゲルが得られることが明らかとなった。

(a)



(b)

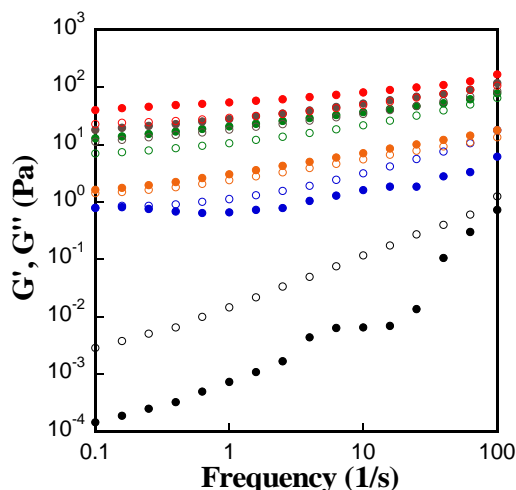


Figure 2. Assembly of liposome with Chol-T-Gltns. (a) Photograph of DODAB liposome solution (20 mM) before (left) and after (right) addition of 69Chol-T-Gltn (20 w/v%). (b) Storage modulus G' (closed symbol) and loss modulus G'' (open symbol) of mixture solution of liposome with Chol-T-Gltns as a function of frequency at 37°C. Chol contents of T-Gltns were 0 (●,○), 3 (●,○), 11 (●,○), 19 (●,○), 44 (●,○) and 69 (●,○) mol%, respectively.

(3) シクロデキストリンを用いた架橋阻害試験

細胞アーキテクトニクス材料のリポソーム溶液添加によるゲル形成が Chol 基によるものであるということを証明するため、Chol 基を包摂する シクロデキストリンを添加した系について動的粘弾性評価を行った。Chol 基を添加することにより、図 3 (a)のような Chol 基の包摂が生じ、ゲルが形成しないことが予想される。図 3 (b)のように貯蔵

弾性率と損失弾性率の結果から、ゲル形成が認められないことから、細胞アーキテクトにクス材料に導入した Chol 基が効果的にリポソームにアンカリングし、物理的に架橋していることが明らかとなった。

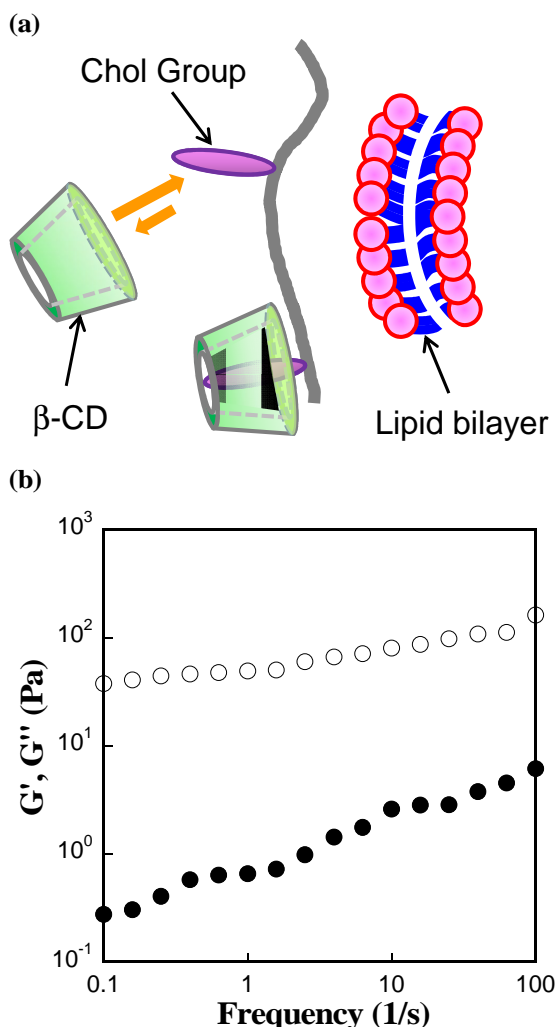


Figure 3. Prevention experiment of liposome gel formation by addition of β -CD. (a) A schematic illustration of capping Chol groups in Chol-T-Gltn by β -CD. (b) Storage modulus G' (●) and loss modulus G'' (○) of DODAB liposome gel as a function of frequency at 37°C. Concentrations of DODAB liposome, 69Chol-T-Gltn and β -CD were fixed at 20 mM, 20 w/v% and 23.5 mM, respectively.

(4) 脂質集合体組織体の酵素分解能評価

細胞アーキテクトニクス材料によって架橋したリポソーム組織体の分解性をコラゲナーゼ存在下で評価した。分解時間はコラゲナーゼ濃度依存的に早くなり (図 4 (a))、用いた細胞アーキテクトニクス材料の Chol 基導入率が高いほど遅くなった。(図 4 (b)) Chol 基導入率に依存した分解性の遅延は、架橋密度の上昇によるものと考えられた。

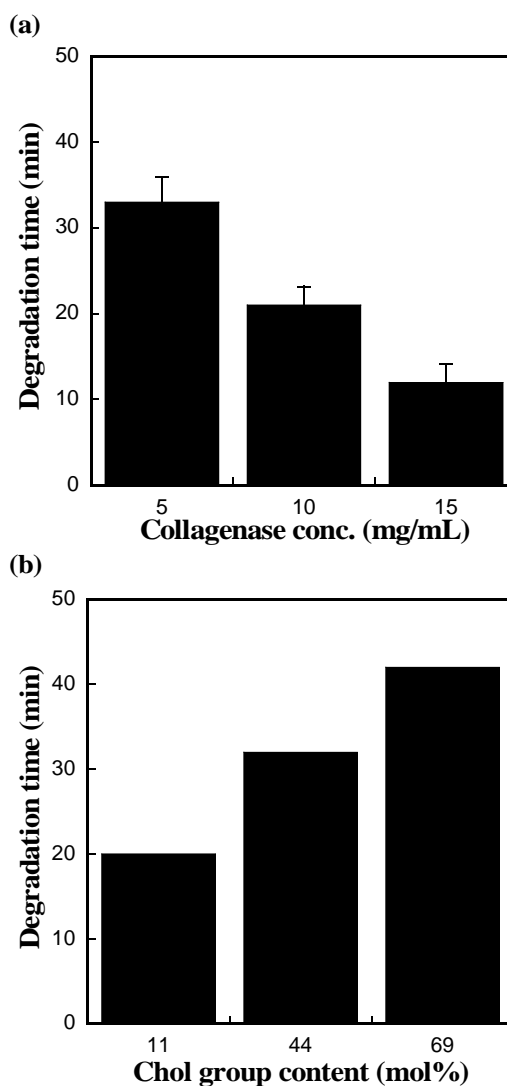


Figure 4. Enzymatic degradation study of Chol-T-Gltn crosslinked DODAB liposome gel. (a) Effects of collagenase concentration on degradation time. Data are means \pm SD of three samples. 40 w/v% 44Chol-T-Gltn solution was mixed with 40 mM DODAB liposome solution. Mixing ratio was 1/1 (v/v). (b) Effects of Chol group content on degradation time. Collagenase concentration was fixed at 5 mg/mL.

(5) 細胞アーキテクトニクス材料による細胞集合体形成評価

HepG2 細胞に細胞アーキテクトニクスを添加することによる集合体形成を評価した。図 5 のように細胞アーキテクトニクス材料の添加濃度増加に伴って、凝集塊が形成されることが明らかとなった。得られた細胞凝集塊は、細胞アーキテクトニクス材料により物理的に架橋されていることが予想される。また、本細胞アーキテクトニクス材料は細胞接着ドメイン / 細胞接着タンパク質結合ドメインも持っているため、細胞間において仮の細胞足場として作用していると考えられる。

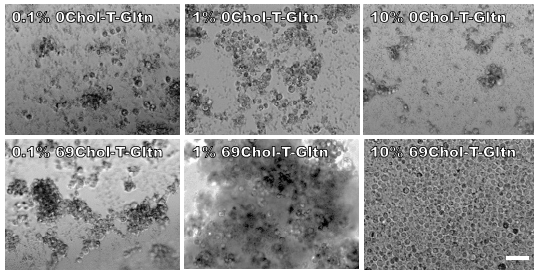


Figure 5. Assembly of HepG2 cells by addition of 0Chol-T-Gltn or 69Chol-T-Gltn. Phase contrast micrograph of HepG2 cells after addition of 0Chol-T-Gltn or 69Chol-T-Gltn with various concentrations. Scale bar = 50 μ m.

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)

1. Taguchi, T.; Mizuta, R.; Ito, T.; Yoshizawa, K.; Kajiyama, M., Robust sealing of blood vessels with cholesteryl group-modified, Alaska pollock-derived gelatin-based biodegradable sealant under wet conditions. *J Biomed Nanotechnol* 2016, 12, 128-134. (doi:10.1166/jbn.2016.2210)
2. Yoshizawa, K.; Ryo, M.; Taguchi, T., Enhanced angiogenesis of growth factor-free porous biodegradable adhesive made with hexanoyl group-modified gelatin. *Biomaterials* 2015, 63, 14-23. (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.003)
3. Ito, T.; Sasaki, M.; Taguchi, T., Enhanced ALP activity of MG63 cells cultured on hydroxyapatite-poly(ethylene glycol) hydrogel composites prepared using EDTA-OH. *Biomed Mater* 2015, 10, 015025. (doi: 10.1088/1748-6041/10/1/015025)
4. Taguchi, T.; Endo, Y., Crosslinking liposomes/cells using cholesteryl group-modified tilapia gelatin. *Int J Mol Sci* 2014, 15, 13123-34. (doi: 10.3390/ijms150713123)

[学会発表](計6件)

水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、田口哲志、
耐圧強度と生体親和性に優れた疎水化
タラゼラチンシーラントの設計と機能、
第37回日本バイオマテリアル学会大会、
2015/11/09 - 2015/11/10
水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、田口哲志、
優れた生体組織界面強度を示す疎水化
ゼラチン接着剤の創製、第5回CSJ化学
フェスタ2015、2015/10/13 - 2015/10/15
水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、田口哲志、
湿潤環境で血管組織接着性を示す生体
親和性シーラントの創製、第64回高分

子討論会、2015/09/15 - 2015/09/17
水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、梶山幹夫、
秋山利正、神谷勝弘、田口哲志、湿潤血
管組織に接着する生体親和性シーラ
ントの設計と機能、第36回日本バイオ
マテリアル学会大会、2014/11/17 -
2014/11/18

田口哲志、水田亮、吉澤恵子、秋山利正、
神谷勝弘、梶山幹夫、湿潤血管接着性を
有する外科用シーラントの開発、第52
回日本人工臓器学会大会、2014/10/17 -
2014/10/19

T. Taguchi, M. Matsuda, M. Inoue,
HYDROPHOBICALLY MODIFIED GELATIN
BASED ADHESIVES WITH HIGH BONDING
STRENGTH AND BIOCOMPATIBILITY, 41st
Annual ESAO congress, 2014/09/17 -
2014/09/20

[図書]

なし

[産業財産権]

出願状況

なし

取得状況

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 哲志 (TAGUCHI, Tetsushi)
国立研究開発法人物質・材料研究機構 国
際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA
研究者
研究者番号：70354264