

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750158

研究課題名(和文)細胞培養環境で溶解除去可能な温度応答性足場材料の開発

研究課題名(英文)Creation of Thermally-Dissolvable Hydrogels under Cell Culture Conditions

研究代表者

吉田 裕安材(YOSHIDA, Hiroaki)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：40727913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞培養環境で溶解除去可能な温度応答性足場材料の開発を目的として、生体由来高分子であるキトサンを化学修飾した誘導体を合成した。得られたキトサン誘導体水溶液は、体温付近で急速にゲル化し、ハイドロゲルというよりもプラスチックのような強度を示した。しかしながら、そのような強固な固体は4度で冷却することで、容易に液体へ復元する。以上の結果は、高分子固体材料が冷却により溶解することを示しており、従来の材料とは全く異なる新素材の開発に成功したものと見える。

研究成果の概要(英文)：In this research, we synthesized chitosan derivatives in order to develop thermally-removal hydrogel scaffolds under cell culture conditions. The polymer solution in water was quickly gelled at body temperature, and the formed hydrogels was very touch, seemed like plastics rather than hydrogels. However, the hydrogels could easily return to the solution by cooling at 4°C. These results clearly show the creation of the new material "polymeric solid materials which can dissolve by lowering temperature".

研究分野：高分子材料、バイオマテリアル

キーワード：感熱応答性高分子 ゴルーゲル転移 ハイドロゲル 高強度ゲル

1. 研究開始当初の背景

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が樹立され (S. Yamanaka et al., *Cell* 2007)、再生医療実現への期待が高まっている。しかし、生体組織は複数種類の細胞とタンパク質が互いに相互作用しながら機能を発現するため、iPS 細胞単体では十分な治療効果は期待できず、生体類似の三次元組織の構築技術が求められる。細胞の三次元組織化には高分子足場材料が有用であることが知られているが、生体内埋入後の足場材料の分解に伴う炎症や免疫反応といった、根本的な問題が解決されないままになっている。

これまで申請者は、世界に先駆けて、“細胞培養環境で分解性が制御可能なジスルフィド架橋型ハイドロゲル”を報告してきた (H. Yoshida et al., *Biomaterials* 2007; *Adv. Funct. Mater.* 2009; *Adv. Funct. Mater.* 2011)。簡潔に述べると、ジスルフィド結合で架橋した生体適合性ハイドロゲルは、細胞を三次元培養した後であっても、細胞毒性の無い適度な還元条件下でゲルのみを分解除去でき、結果として培養細胞とそれらが産生した細胞外マトリックスからなる三次元組織が回収できる。このような特性を有する足場材料は国内外を問わず、依然として他に例が無い。しかし、還元反応 (チオール分子) が細胞に与える影響が危惧されるだけでなく、異なる刺激により分解可能な足場材料が作製できれば、生体材料研究や再生医療研究の発展に寄与できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、再生医療・医学診断等へ応用可能な生体類似の高機能三次元組織の構築のため、「細胞培養環境で溶解除去可能な温度応答性足場材料の開発」を目的とする。

組織工学分野において、生体外での細胞の三次元組織化には高分子足場材料が重要であると考えられてきたが、生体内埋入後の足場材料の分解に伴う炎症や免疫反応が治療の足枷になっている。一方で、足場が不要な三次元組織構築技術が著しく発展しているが、複雑な立体組織の構築には型となる材料の利用が不可欠である。そこで、細胞・組織存在下でも分解除去可能な足場材料が構築できれば、上記の足場問題が解決され、立体組織の鋳型として有用であると考えた。

国内外を問わず、温度応答性高分子からなる三次元材料の溶解性を制御した例は無く、本研究が達成されれば大きなインパクトが期待される。また、温度に応じて溶解する材料は、高分子科学・材料科学・再生医療を始め、多様な分野において応用が期待される。例えば、再生医療分野で重要な役割が期待される足場材料は、生体内埋入後に炎症や免疫反応を引き起こすことが問題となっているが、温度応答性足場材料を用いた三次元培養後に足場のみを溶解することで、足場材料の

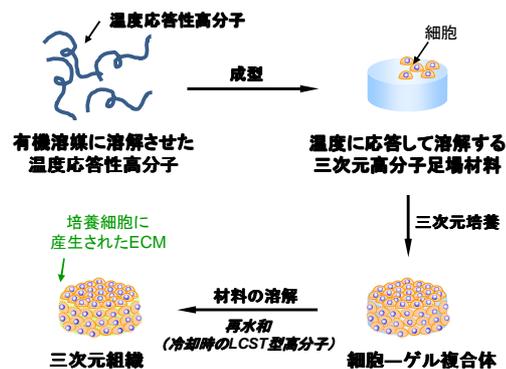


図 1 温度応答性足場材料の溶解による三次元組織の構築

問題が回避され、安全で治療効果の高い三次元組織の構築が可能となる (図 1)。また、近年活発な研究が進められている多様な三次元組織構築法と組み合わせることで、組織・臓器の内部に存在する空隙 (例: 心臓の心室・心房など) を再現することも可能になると考えられる。このように、従来殆ど例の無い“培養環境で分解性が制御可能な高分子材料”を開発することは、これまで解決されなかった様々な問題を解決できる可能性を秘めており、非常に意義深い研究であると言える。

本研究では、温度応答性高分子の絡み合いと疎水性相互作用を巧みに制御することで、再水和により溶解する三次元高分子材料が構築できることを明らかにする。LCST 型高分子の高濃度水溶液の加熱により三次元高分子材料が得られることは十分に知られているが、逆過程である材料の溶解は非常に困難であり、これが達成できれば高分子科学の発展に大きく貢献できる。また、このような温度応答溶解性を有する高分子材料は多様な機能性材料を構築するための鋳型として、また材料を含まない安全性の高い三次元組織を構築するための鋳型として、材料科学や再生医療等、幅広い分野で利用できる。

3. 研究の方法

本研究では、「培養環境で溶解除去可能な温度応答性足場材料の開発」を目的とする。刺激応答性高分子の一種である温度応答性高分子は、高分子科学における重要な研究対象の一つである。下限臨界溶解温度 (LCST) を示す温度応答性高分子は、その温度を境に高分子鎖の脱水和 (水和) に伴うコイル-グロブュール転移により凝集 (溶解) する。また、高濃度の温度応答性高分子水溶液を LCST 以上に加熱すると、高分子鎖の脱水和に伴う凝集と高分子鎖の絡み合いの増大が起こり、三次元材料 (通常ハイドロゲル) が得られ、これらは再生医療用足場材料や薬物徐放担体としての応用が期待されている。一般的に、LCST 型高分子は、希薄状態中では冷却 (水和) により溶解するが、高濃度状態から調製

した三次元材料では溶解は殆ど観察されない。これは加熱過程で高分子鎖が過剰に絡み合い、また安定な疎水性相互作用を形成するためだと考えられる。言い換えれば、高分子鎖の絡み合いと疎水性相互作用を上手く制御できれば、冷却に応じて分解する三次元材料が構築できると考えられ、培養環境で分解性が制御可能な新規温度応答性足場材料の開発が可能になると期待される。このような足場が開発できれば、高分子科学・再生医療分野への貢献が期待されるだけでなく、培養後に冷却することで足場のみを溶解除去することで安全性の高い組織の構築も可能となる。

4. 研究成果

本研究課題では、「細胞培養環境で溶解除去可能な温度応答性足場材料の開発」を目的とする。本研究では、主に①冷却により溶解可能な三次元高分子材料の作製法の確立、②培養環境で溶解除去可能な温度応答性足場材料の構築、③培養後に足場のみを溶解除去することによる三次元組織の構築、の三項目の達成を目標とする。

本課題を計画・実施するに当たり、数多くの感熱応答性高分子を調査・合成したが、体温付近での迅速なゲル化が可能な高分子は数多く見つかるものの、培養基材としての強度が低いことに加えて、また合成高分子ベースの材料の多く見受けられた。加えて、いずれの高分子も比較的短時間でゲル化するものの、逆過程であるゾル化は非常に遅い、あるいは溶解し無いことが改めて難点であることが判明した。

そこで、H26年度は、一つのキトサン誘導体に焦点を絞り検討を始めたところ、わずか数%のキトサン誘導体を水に溶解させるだけで、迅速にゾルゲル転移させることに成功した(図2)この現象は、培地で行った場合も同様に起こることを確認した。興味深いことに、低い高分子濃度にもかかわらず、得られたハイドロゲルはピンセットで持ち運べる程度の強度を示した。



図2 キトサン誘導体水溶液を用いた場合の迅速なゾルゲル転移挙動

この現象を利用して、細胞を含む高分子溶液を4度に冷却した後、37度の環境で成型することで、任意の三次元形状を有する細胞とゲルの複合体を作製できた。さらに、非常に興味深いことに、その複合体を再度4度で冷却すると、ゲルが溶解し、細胞組織体を得られることを確認した(図3)。図3の右図から

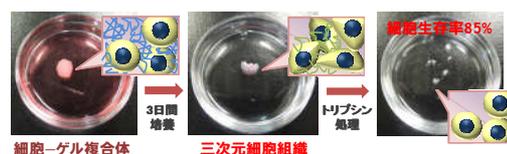


図3 感熱ゾルゲル挙動を利用した細胞の三次元組織化

も明らかのように、得られた三次元細胞組織体はタンパク質分解酵素であるトリプシンで処理することで容易に分解されることから、得られた組織の構成成分が培養細胞とそれらが分泌したECMから構成されていることが示された。

以上の結果は、当初予定していた研究計画の妥当性を示しているだけでなく、簡易実験ではあるが全ての計画が実証できたことを示している。

一方で、ゾルゲル転移とは異なる過程を利用した冷却応答性高分子材料の開発も検討した。候補化合物として、感熱応答性のL-フェニルアラニンエチルエステルで化学修飾したポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA-Phe)を用いた。この化合物は揮発性に優れたヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解するため、γ-PGA-Phe/HFIP溶液を凍結乾燥することで、スポンジ状の構造体を作製した。得られた材料は冷却により一定の溶解を示したものの、60%程度の重量減少しか見られず、約半分は残存してしまうことが明らかとなった。これは、有機溶媒処理の際に疎水性相互作用が強く働いてしまったこと、また凍結乾燥過程における高分子鎖の凝集が影響したものと考えている。

続いて、H27年度は、可逆的な感熱応答性高分子のゾルゲル転移におけるゲルの再溶解過程(ゾル化)の過程を詳細に検討すべく、キトサン誘導体の側鎖導入率や溶液濃度を制御した。ここで、側鎖導入率を制御するために新たなキトサン誘導体の合成法を開発した。これにより、キトサンのグルコサミンユニット1つ当たり0.2~2.5個の側鎖置換基を導入することが可能となった。その結果、側鎖導入率の増大に伴い、水溶性が向上することが明らかとなり、これは側鎖置換基の導入によりキトサンの結晶構造が解け、水和に有利に働いたものと考えている。また、導入率の増加に伴い、より低濃度の水溶液からのゲル化が確認できることが分かった。加えて、非常に興味深いことに、高濃度溶液から作製したゲルであっても、4度における再溶解が見られ、これまでに知られている感熱応答性高分子のゾルゲル転移挙動とは大きく異なることも明らかとなった。感熱応答性が生じる相転移温度に関して考慮したところ、濃度の増加に伴い、相転移温度が低下する傾向が見られたことから、溶液濃度の増加に依る高分子鎖の凝集が有利に働いたと考えられる。

一方、細胞培養液を用いた組織体構築においては、ディスペンサーを用いた細胞組織体の造形に成功した。より複雑な自動化技術を併用していくことで、今後さらに複雑な組織の造形が可能になると期待している。

先述のように、本課題では主に3つの研究項目を掲げていたが、作製したキトサン誘導体からなるハイドロゲルは冷却により溶解可能な三次元高分子材料であり、培養環境で分解除去可能な細胞足場材料であり、また培養後に足場のみを冷却溶解除去することで三次元組織を構築することに成功した。これらの結果は、本課題が期待通りに成功したことを明確にしており、またこの材料を自動化技術（例：3次元プリンター）と複合化させることにより、望みの構造を持った細胞組織体の作製が可能になるものと考えている。さらに、本課題で創出した「冷却溶解性の固体材料」は世界的にも報告例が無く、従来困難な用途に利用可能な材料として発展する可能性が大きい。

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）

〔学会発表〕（計7件）

①高村寧・島史明・吉田裕安材・明石満

“感熱応答高分子ハイドロゲルの立体造形による3次元組織構築”

日本化学会第96回春季年会、1Pc157、同志社大学（京都府京田辺市）、2016年3月24-27日

②小野靖貴・吉田裕安材

“温度応答性高分子を用いた高強度ハイドロゲルの作製”

第64回高分子討論会、3Pc027、東北大学（宮城県仙台市）、2015年9月15-17日

③吉田裕安材・明石満

“可逆的なゾルーゲル転移を利用した三次元組織の構築”

日本化学会第95回春季年会、1Pb46、日本大学（千葉県船橋市）、2015年3月26-29日

④高村寧・吉田裕安材・明石満

“感熱応答性高分子ハイドロゲルの三次元プリンティング”

第63回高分子討論会、1Pa47、長崎大学（長崎県長崎市）、2014年9月24-26日

⑤吉田裕安材・明石満

“可逆的なゾルーゲル転移を利用した三次元組織の構築”

第63回高分子討論会、1Pb46、長崎大学（長崎県長崎市）、2014年9月24-26日

⑥Piyapakorn Phassamon・吉田裕安材・明石

満

“Detailed Investigation of Thermosensitive Chitosan Having Hydroxybutyl Moieties”

第63回高分子討論会、1Pa45、長崎大学（長崎県長崎市）、2014年9月24-26日

⑦吉田裕安材・明石満

“細胞培養基材としての感熱応答溶解性ハイドロゲルの作製”

第63回高分子学会年次大会、2Pf124、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）、2014年5月28-30日

〔その他〕

研究代表者ホームページ

<http://hyoshidalab.wix.com/home>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 裕安材 (YOSHIDA, Hiroaki)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：40727913