

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870050

研究課題名(和文)自己支持性高分子ナノ薄膜からなる革新的細胞デリバリー担体の創製

研究課題名(英文)Development of Cell Delivery Carrier Consisting of Free-standing Polymer Nanosheets

研究代表者

藤枝 俊宣(Fujie, Toshinori)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：70538735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では加齢黄斑変性症のような難治性網膜疾患に対する治療策として、狭小な網膜下への網膜色素上皮細胞の移植を狙い、柔軟な高分子ナノ薄膜からなる細胞移植担体の創製を目的とした。ポリ乳酸グリコール酸共重合体からなる微細パターン化ナノ薄膜を調製し、細胞をナノ薄膜上で選択的に培養した。医療用注射針を用いて細胞担持ナノ薄膜の注入操作を試みたところ、針内部のずり応力にも関わらず射出後もナノ薄膜上の細胞は90%近く生存することが判明した。さらに、ラット網膜下に細胞担持ナノ薄膜を移植したところ、黄斑部近傍に細胞層の移植が示唆された。以上より、細胞移植療法におけるナノ薄膜の有用性を初めて示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：For the treatment of intractable retinal diseases such as age-related macular degeneration, in this study we envisioned development of a cell delivery carrier using flexible polymer nanosheets to transplant retinal pigment epithelial cells into a narrow subretinal place. Micropatterned nanosheets were fabricated from poly(lactic-co-glycolic acid), on which the cells were selectively cultured. It was clarified that the engineered cell monolayer on the micropatterned nanosheet was aspirated and injected through a clinical needle without loss of cell viability (approximately 90% viable). The cell monolayer was also transplanted to the subretinal place of rats near the macula. Overall, for the first time we demonstrated the utility of nanosheets in cell delivery system.

研究分野：ナノバイオ材料

キーワード：ナノバイオ材料 生体材料科学 生体組織工学 再生医療 細胞移植 加齢黄斑変性症 高分子超薄膜
微細加工技術

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患に対する細胞移植療法の社会的なニーズ拡大に伴い、再生医療分野では種々の疾患に応じた機能性足場材料の開発が進められている。加齢黄斑変性は、50歳以上の日本人の1%(国内4位、欧米1位)に見られる失明リスクの高い難治性網膜疾患であり、網膜組織中心の黄斑部が障害されることにより発症する。今日までに、網膜色素上皮(RPE)細胞などの視細胞懸濁液を医療用シリンジにて直接注入する細胞移植療法が検討されているが、眼底下の狭小な黄斑部へ分散した細胞を安定に送達・生着させることが極めて困難なため治療効果が低いことが課題である(引用文献①)。これに対して、近年では高分子薄膜やハイドロゲルを培養基材に用いた RPE 細胞の移植療法も考案されているが、いずれも基材膜厚が 10 μm 以上のため残存成分の炎症誘起やそれに伴う細胞浸潤阻害が問題視されている(引用文献②)。従って、なるべく少量の生体材料で移植細胞を安定に保持し、かつ、狭小な網膜下に移植できる薄くて柔らかい細胞移植担体の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、狭小な眼底下等への効果的な細胞移植を狙い、柔軟かつ拒絶反応の少ない自己支持性高分子超薄膜(ナノ薄膜)からなる新規細胞デリバリー担体の創製を目的とした(図1)。具体的には、(1)自己支持性ナノ薄膜の調製および物性評価、(2)ナノ薄膜上への安定な細胞担持ならびに細胞運動制御(接着・配列・分化)、(3)網膜色素上皮(RPE)細胞の移植に向けたナノ薄膜のミリ・マイクロメートル寸法化、(4)RPE 細胞担持ナノ薄膜の *in vitro* 安定性試験および細胞機能評価を行う。最終的には、(5)RPE 細胞担持ナノ薄膜の *in vivo* 網膜下に対する移植実験を行い、ナノ薄膜を利用した細胞移植療法の構築と基盤技術の整備を目標にした。さらに、本技術の応用として、(6)ナノ薄膜表面に骨膜様の微細溝構造の形成ならびに(7)微細溝化ナノ薄膜上での間葉系幹細胞(MSCs)の骨分化誘導についても検討した。

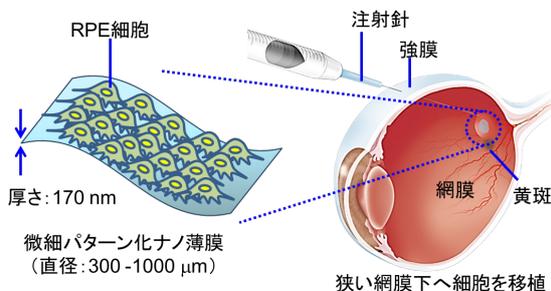


図1 ナノ薄膜を用いた細胞移植療法(発表論文⑤より改変して引用)

3. 研究の方法

(1) 高分子ナノ薄膜の調製と物性評価

合成高分子や医用高分子からなるナノ薄膜の調製条件を検討し、膜厚や構成高分子の種類によるナノ厚の材料物性および力学特性を評価した。

(2) ナノ薄膜表面における細胞運動の制御

異なる材料物性を有するナノ薄膜表面での細胞運動挙動を免疫染色法および画像解析ソフト(Image-J)を用いて解析した。

(3) ナノ薄膜の微細パターン化

生体適合性・生分解性を有する自己支持性ナノ薄膜を作製し、ポリジメチルシロキサン(PDMS)からなるハンコを利用したマイクロコンタクトプリンティング(μ CP)法を用いて、ナノ薄膜のミリ・マイクロメートル寸法化について検討した。

(4) 細胞担持ナノ薄膜の機能評価

RPE 細胞担持ナノ薄膜のシリンジ通過試験およびナノ薄膜上の細胞の安定性について評価した。

(5) 網膜への細胞担持ナノ薄膜の移植および操作性の評価

眼球網膜下に対して医療用注射針を用いた細胞担持ナノ薄膜の注入方法および移植効果について *ex vivo*(ブタ), *in vivo*(ラット)モデルを用いて検討した。

(6) マイクロモールディング法による微細溝化ナノ薄膜の作製

PDMS を鋳型としたマイクロモールディング法を用いて、ナノ薄膜上への骨膜用の微細溝構造の形成について検討した。

(7) 微細溝化ナノ薄膜を利用した MSCs の骨分化制御

微細溝化ナノ薄膜上で MSCs を培養することで、MSCs の異方的な配列の制御ならびに骨組織への分化制御を試みた。

4. 研究成果

(1) 高分子ナノ薄膜の調製と物性評価

任意の疎水性高分子(例:ポリスチレン:PS、ポリ乳酸:PLA、ポリ乳酸グリコール酸共重合体:PLGA)を水溶性高分子であるポリビニルアルコール:PVA からなる犠牲膜上にスピコートし、PVA を水中で溶解することで膜厚数十 nm の自己支持性ナノ薄膜を得た。AFM ナノメカニカルマッピングによって、ナノ薄膜の材料特性を評価したところ、膜厚が数十~数百ナノメートル領域において弾性変形能が増大することが明らかになり、極めて柔軟なナノ薄膜を得ることができた。

(2) ナノ薄膜表面における細胞運動の制御

ナノ薄膜上に担持した細胞(例:骨格筋細胞、網膜色素上皮細胞)の免疫染色像から細胞接着や組織化挙動を解析した。ナノ薄膜上

にカーボンナノチューブや磁性ナノ粒子を複合化させたところ、接着した細胞は微小繊維や表面粗さを認識することで、異方的な伸長挙動や高い増殖性を示し、組織化挙動を制御しうるということが判明した。

(3) ナノ薄膜の微細加工化

注射器による網膜下への細胞移植を達成するために、ポリ乳酸グリコール酸共重合体からなる自己支持性ナノ薄膜をシリンジ投与可能なサイズに成形した。μCP法を利用することで、数百マイクロメートルサイズの微細化ナノ薄膜を作製した(図2)。作製した微細化ナノ薄膜の表面には、RPE細胞を担持することが可能であり、注射針口径の約2倍程度の直径までのナノ薄膜であれば、細胞を安定に担持した状態で注射針内に吸引し、射出できることが明らかになった。

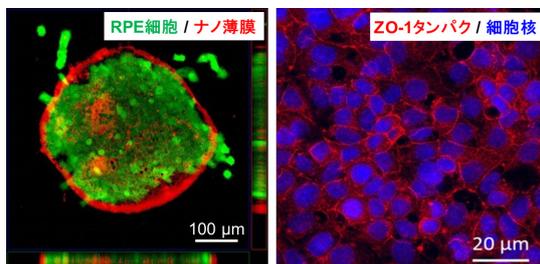


図2 RPE細胞担持ナノ薄膜と上皮組織構造(発表論文⑤より改変して引用)

(4) 細胞担持ナノ薄膜の機能評価

ナノ薄膜上でのRPE細胞の分化挙動、および、医療用シリンジによる吸引・射出操作前後での細胞生存率を評価した。RPE細胞とナノ薄膜を異なる蛍光色素で各々染色したところ、ナノ薄膜上でRPE細胞が単層組織を形成することが見出された。この時、単層組織中のZO-1タンパク質を免疫染色にて可視化したところ、RPE細胞に特徴的なタイトジャンクションの形成が認められた。そこで、RPE細胞担持ナノ薄膜(直径400 μm)を25G針(内径320 μm)で吸引・射出したところ、針管内における力学的ストレス負荷にも関わらず、吸引前後で細胞生存率に大きな変化が生じないことが明らかになった(図3)。

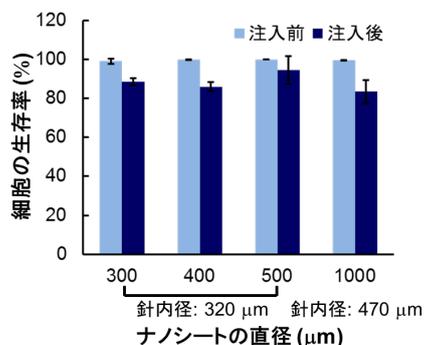


図3 注入前後での細胞生存率の評価(発表論文⑤より改変して引用)

さらに、異なる直径を有するナノ薄膜(直径

300-1000 μm)を用いた場合の細胞生存率を評価したところ、ナノ薄膜の直径に関わらず、吸引前後で90%近く細胞生存率を維持することに成功した。

(5) 網膜下への細胞担持ナノ薄膜の移植および操作性の評価

ブタ網膜下にナノ薄膜を注入したところ、ナノ薄膜は網膜下で円盤状に展開し、黄斑部近傍に生着する様子が認められた(図4)。さらに、RPE細胞担持ナノ薄膜をラット網膜下へ移植したところ、1週間後の病理組織切片観察より層状の細胞集団が黄斑部に観察された。以上より、微細化ナノ薄膜を利用した細胞デリバリーは、狭小な生体組織空間に低侵襲かつ簡便に細胞を届ける細胞移植技術として有用であることが初めて示された。

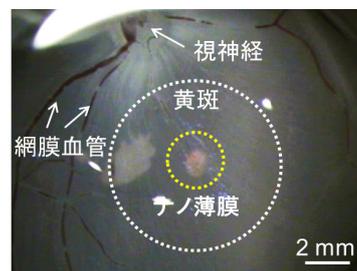


図4 ブタ網膜黄斑部に注入されたナノ薄膜(発表論文⑤より改変して引用)

(6) マイクロモールドイング法による微細溝化ナノ薄膜の作製

50 μm幅の微細溝構造を有するPDMSモールド上にPLGAをスピコートし、PVA膜を支持体とすることでナノ薄膜を剥離した。PVAを溶解することで、膜厚84 nmからなる自己支持性PLGAナノ薄膜(2 cm × 2 cm)を得た。この時、SEM観察および表面段差計測定から、ナノ薄膜表面にPDMSモールドと同様の50 μm幅の凹凸模様の溝構造が転写されている様子が認められた。さらに、ナノ薄膜の貼付性を調べるために、ニワトリの上腕骨を微細溝化ナノ薄膜で被覆したところ、骨表面に溝構造を転写することに成功した(図5)。

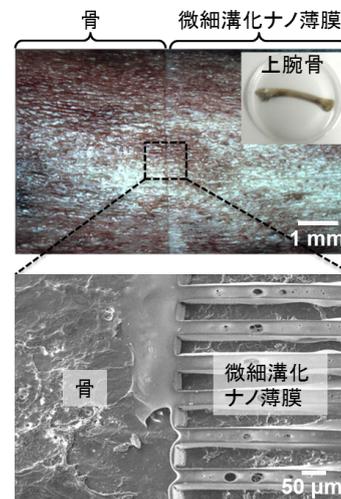


図5 骨膜様の構造を有する微細溝化ナノ薄膜

膜（発表論文②より改変して引用）

(7) 微細溝化ナノ薄膜を利用した MSCs の骨分化制御

微細溝化ナノ薄膜上で MSCs を培養したところ、溝方向に沿って MSCs が伸長する様子が観察された（図6）。さらに、溝構造の分化挙動への影響を評価するために、免疫染色法を用いて、骨芽細胞分化マーカーである Runx2/Cbfa1, SPARC, Osteocalcin, Type I Collagen, Calcium の発現について評価した。14日間培養後の免疫染色像より、微細溝化ナノシートでは、未処理チタンおよび平滑なナノシートと比べて、初期骨分化マーカーである Runx2/Cbfa1 および SPARC の顕著な発現が認められた。また、定量 RT-PCR の結果 (Runx2/Cbfa1, Osteocalcin, Type I Collagen) からも、微細溝構造上における骨芽細胞への分化の促進が示唆された。

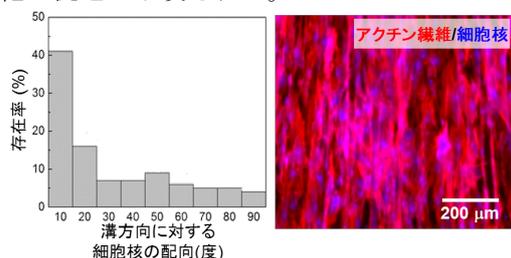


図6 微細溝化ナノ薄膜上で配列する MSCs (発表論文②より改変して引用)

以上より、微細溝化ナノ薄膜は既存のインプラント材料表面を、貼るだけで骨膜様に改質する手法として有用である。また、サブセルラーサイズの微細構造を有するナノ薄膜は、生体組織の異方性を制御する人工基底膜として、骨だけでなく筋組織工学にも応用可能であると期待される。

<引用文献>

- ① Aisenbrey, S. et al., *Arch. Ophthalmol.*, **124**, 183 (2006).
- ② Stanzel, B. V. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, 490 (2012).

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13報中6報を抜粋)

- ① Fujie, T., Shi, X., Ostrovidov, S., Liang, X., Nakajima, K., Chen, Y., Wu, H., Khademhosseini, A. Spatial coordination of cell orientation directed by unique nanoribbon sheets. *Biomaterials*, **53**, 86-94 (2015). (†Equally Contributed) 査読有。
- ② Shi, X., Fujie, T., Saito, A., Takeoka, S., Hou, Y., Shu, Y., Chen, M., Wu, H., Khademhosseini, A. Periosteum-mimetic structures made from freestanding microgrooved nanosheets. *Adv. Mater.*, **26**,

3290-3296 (2014) (†Equally Contributed) 査読有。

- ③ 藤枝 俊宣. 「再生医療を指向したバイオニックナノ薄膜の創製」, *化学と工業*, **67**(11), 996-997 (2014) 査読無。
- ④ 藤枝 俊宣. 「細胞外マトリックスを規範とする高分子ナノシートの創製と生体組織工学への応用」, *高分子論文集*, **71**(9), 408-417 (2014) 査読有。
- ⑤ Fujie, T., Mori, Y., Ito, S., Nishizawa, M., Bae, H., Nagai, N., Onami, H., Abe, T., Khademhosseini, A., Kaji, H. Micropatterned polymeric nanosheets for local delivery of an engineered epithelial monolayer. *Adv. Mater.*, **26**, 1699-1705 (2014) 査読有。
- ⑥ Fujie, T., Ahadian, S., Liu, H., Chang, H., Ostrovidov, S., Wu, H., Bae, H., Nakajima, K., Kaji, H., Khademhosseini, A. Engineered nanomembranes for directing cellular organization towards flexible biodevices. *Nano Lett.*, **13**, 3185-3192 (2013) 査読有。

[学会発表] (計37件中6件を抜粋)

- ① Fujie, T. Flexible Skin-contact electrodes for recording biological electrical signals. 2nd Symposium on the Institute of Advanced Active Aging, Waseda University. (招待講演) (2014.10.18., Tokyo).
- ② Fujie, T. Bionic Nanomembranes Towards Wearable Electronics. The 75th JSAP Annual Meeting 2014: Innovation in R&D of the Flexible Electronics -Toward the Inorganic Flexible Devices- (招待講演) (2014.9.19., Sapporo).
- ③ 藤枝 俊宣. 「先端医療分野への応用を目指した高分子ナノシートの開発」 帝人21世紀フォーラム (招待講演) (2015.1.11., 裾野).
- ④ 藤枝 俊宣. 「機能性高分子ナノシートの開発と生体組織工学への応用」 14-1 超分子研究会 (招待講演) (2014.5.14., 東京).
- ⑤ 藤枝 俊宣. 「高分子ナノシートからなる医療材料：ナノ絆創膏の開発」 第8回ナノ・バイオメディカル学会大会 (招待講演) (2014.5.2., 和歌山).
- ⑥ 藤枝 俊宣. 「機能性高分子ナノシートからなる革新的組織工学材料の創製」 日本化学会第94春季年会 (招待講演) (2014) (2014.3.30., 名古屋).

[図書] (計3冊中2冊を抜粋)

- ① 藤枝 俊宣, 木下 学. 「高分子ナノシートの柔軟性と密着性を利用した「ナノ絆創膏」の開発と医療応用 (第3章18節)」 生体模倣技術と新材料・新製品開発への応用, 技術情報協会 pp. 540-547 (2014).

- ② Fujie, T., Takeoka, S. (2014) Development of Nanosheet Technology Towards Advanced Nanomedical Engineering (ch. 6), in Nanobiotechnology (Eds. Phoenix, D.A. and Waqar, A.), One Central Press, United Kingdom. pp.68-94.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：形状制御されたナノシート及びその製造方法

発明者：岩瀬英治, 新保創太, 武岡真司, 藤枝俊宣, 梶 弘和, 阿部俊明

権利者：国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願 2015-043990

出願年月日：平成 27 年 3 月 5 日

国内外の別： 国内

名称：Cell-carrying patterned nano-thin film

発明者：Kaji, H., Fujie, T., Mori, Y., Nishizawa, M., Abe, T., Nagai, N.

権利者：Tohoku University

種類：特許

番号：PCT/JP2014/067852

出願年月日：平成 26 年 6 月 27 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.takeoka.biomed.sci.waseda.ac.jp/>

<http://research.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/jpn/research/811>

<https://research.wpi-aimr.tohoku.ac.jp/jpn/research/775>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤枝 俊宣 (FUJIE, Toshinori)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：7 0 5 3 8 7 3 5