

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13791

研究課題名(和文)細胞を架橋点とするスマートゲルの創製とゲル内細胞反応を利用した機能創発

研究課題名(英文) Living functional hydrogels generated by bioorthogonal cross-linking reactions of azide-modified cells with alkyne-modified polymers

研究代表者

長濱 宏治 (NAGAHAMA, Koji)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：00551847

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)：本研究では、細胞の糖代謝反応による糖鎖修飾法により、細胞が本来もっていない官能基であるアジド基を細胞表面に導入した後、生体適合性を有するアルギン酸の分岐構造体に複数のアザシクロオクチン基を有する高分子との生体直交クリック反応によって、細胞を高分子で架橋した“生きているゲル”の作製を行った。この細胞架橋ゲルは、細胞が高分子で化学架橋されているため、細胞のもつ細胞分裂や細胞接着などの反応を、高分子ネットワーク全体に伝播することができ、従来の機能性ゲルでは発現しえない高い機能をゲルに付与することができた。これらは世界初の成果であり、国内外の学会および学術論文などとして報告した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show a concept for utilizing cells and their functions from the viewpoint of materials science. In particular, we develop cell cross-linked living bulk hydrogels by bioorthogonal click cross-linking reactions of azide-modified mammalian cells with alkyne-modified biocompatible polymers. Importantly, we demonstrate the unique functionalities of the living hydrogels, originating from the basic functions of the cells incorporated in the living hydrogels as active cross-linking points. Moreover, we demonstrate potential application of the cell cross-linked hydrogels as injectable gels for tissue engineering. As this method can be applied to bacteria and viruses because their surfaces can be modified by metabolic glycoengineering, the findings of this study provide a promising route to the generation of living cell-based next-generation innovative materials, technologies, and medicines.

研究分野：高分子化学、生体材料学

キーワード：ハイドロゲル 細胞 バイオマテリアル

### 1. 研究開始当初の背景

近年、DNA やタンパク質など高機能な生体分子を合成分子と組合せることにより作製されたバイオハイブリッド型スマート材料が次世代材料として医療やエレクトロニクスなど幅広い分野で注目されている。一方、世界で最も高性能な材料は細胞である。近年、細胞の機能や反応を人為的に制御するための生物学的・化学的手法が開発され、細胞を生体外で比較的安定に扱うことができるようになってきた。このような背景のもと、私は細胞を高機能材料としてスマート材料の設計に活かすことを提案し、細胞と合成高分子とを組み合わせたハイブリッド型スマート材料の開発について研究してきた。

本研究課題で私は、細胞を架橋点として共有結合により高分子ネットワークに組込んだスマートゲル(以降、細胞架橋ゲルと表記)を創成する。細胞ゲル内部では、架橋点である細胞が生きており、自律的に細胞分裂・遊走・分化・細胞間結合・物質産生などの反応を行っているため、これら細胞反応によるミクロな応答(刺激)をシンクロさせ、ゲル全体に増幅・伝播させることができれば、細胞反応をスイッチとするゲルの動的な応答機能の発現に結びつく(例えば、細胞分裂によるゲルの時限崩壊プログラム、ゲル内での細胞間結合形成によるゲルの収縮、ゲル間での細胞間結合形成によるゲルの接着・自己修復、ゲル内での細胞遊走によるゲルの運動など)と考えた(図1)。

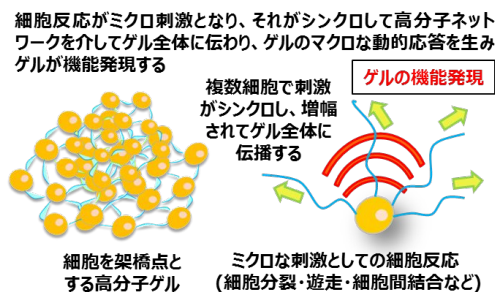


図1. 細胞反応を刺激とするゲルの動的な応答機能発現

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞を架橋点として共有結合により高分子ネットワークに組込んだ“生きている高分子ゲル”を合成し、ゲル内で起こる細胞反応(マイクロ刺激)をスイッチとしてマイクロ刺激をゲル全体に増幅・伝播し、ゲルのマクロな動的応答を誘発する(機能創発すること)が可能なる革新的スマート材料を創成することである。さらに、成果である細胞スマートゲルの応用展開も目的とする。これらを達成するため、本研究課題では(1)細胞表面クリックケミストリーによる細胞を架橋点とするゲル形成、(2)ゲル内で起こる細胞反応の定量解析、(3)細胞反応に応答して発現するゲルの動的応答や創発機能の探索を実現する。

### 3. 研究の方法

#### 平成 27 年度

糖質の代謝反応を利用して、細胞膜タンパク質の糖鎖末端(シアル酸)にアジド基を導入した生細胞(ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト白血球細胞、ヒト血管内皮細胞、マウス筋芽細胞)を作製した。また、シクロオクチンを化学修飾した分岐型アルギン酸(bAlg-DBCO)を合成し、bAlg-DBCO と細胞表面アジド基とのクリック反応により、生細胞を架橋点とする高分子ゲルを作製した。ゲル形成反応およびゲルの特性を左右するパラメータとして、架橋点である細胞数、および分岐型アルギン酸の濃度が考えられるため、これらを変化させてゲル形成反応を行い、最適条件を検討した。簡便なゲル形成の確認法として、本研究では試験管傾斜法を用いた。ゲル形成が起こった反応に関して、Calcein-AM と PI を用いた Live/Dead アッセイ、WST-1 アッセイにより、架橋点である細胞の生存率を評価し、高い生存率でゲル形成可能な反応条件を絞り込んだ。これらの実験により、細胞を生かしたままゲルの架橋点に用いることが可能な分子設計指針が明確となり、それらを活かして細胞ゲル形成反応を確立した。

#### 平成 28 年度

架橋点として生きた状態でゲルに組込んだ細胞がマイクロ刺激を生むためには、それらの細胞がゲル内で正常に細胞反応を行う必要がある。そこで、平成 27 年度に最適化したゲル形成反応によってゲルに組込んだ細胞が行う細胞反応を定量解析し、シャーレ上で通常培養した細胞の反応をコントロールとして比較した。本研究項目では、以下の細胞反応を定量解析し、マイクロ刺激としてゲルに動的応答を誘発し、機能発現につながる細胞反応を決定した。

**細胞分裂・細胞増殖:**細胞架橋ゲルを作製し、WST-1 アッセイによりゲルに組込んだ細胞の増殖速度を定量評価した(増殖曲線を作成)。  
**細胞遊走:**細胞架橋ゲルを作製し、ゲル内での細胞移動距離を顕微鏡観察により解析することにより、架橋点として高分子ネットワークにつながれた細胞がゲル内でどの程度移動できるかについて調べた。

**細胞接着:**接着細胞を架橋点に用いて細胞ゲルを作製し、顕微鏡観察によりゲル内の細胞の接着について調べた。

#### 平成 29 年度

平成 28 年度で決定した細胞反応をスイッチとして起こるゲルの動的応答や発現する機能について探索した。

**細胞分裂・細胞増殖:**ゲル内の細胞が一定の倍加時間で分裂し増殖することをスイッチとして起こるゲルの崩壊特性について評価した。

**細胞接着:**ゲル内の細胞が基板に選択的に接着することをスイッチとして起こるゲルの

動的接着特性について評価した。

#### 4. 研究成果

細胞表面糖鎖シアル酸をアジド化したマウス筋芽細胞 (C2C12) と bAlg-DBCO の組み合わせにより細胞架橋ゲルを作製する際、bAlg-DBCO 濃度が 2% 以上の場合、いずれの細胞数 ( $0.5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  個) においても細胞架橋ゲルを形成した。アジド化 C2C12 細胞とアルキン化していない bAlg との組み合わせでは、ゲル化は起こらなかったことより、得られたゲルは、アジド化 C2C12 細胞と bAlg-DBCO とのクリック架橋反応により得られたミリメートルスケールの細胞架橋ゲルであることが分かった。また、直鎖型アルキン化アルギン酸 (Alg-DBCO) とアジド化 C2C12 細胞との組み合わせでは、ゲル化が起こらないか、ゲル化に長い時間を要するが、アジド化 C2C12 細胞と bAlg-DBCO との茎合わせでは、アジド化細胞と高分子を攪拌してすぐにゲル化したことから、高分子に分岐構造を導入したため、3 次元のゲルネットワーク形成が促進され、ゲル化時間の短縮が可能になったと言える。さらに、ゲルの上に 500  $\mu$ L の DMEM 培地を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーターに 1 時間静置させてもゲルは崩壊しなかった。培地を除去し、取り出したゲルはスライドガラス上でも崩壊せず、そのままの形状を維持した。このことより、得られたゲルは、Alg-DBCO を用いて作製したゲルよりも強度が高いことが分かった。さらに細胞架橋ゲルは、取り扱いやすいハンドリング特性を有することが分かった。

アジド化 MCF-7 細胞およびアジド化 HL-60 細胞を用いてクリック架橋反応させた場合も、細胞数が  $2 \times 10^6$  個、2% の高分子濃度という反応条件において、攪拌後すぐにゲルが形成した。つまり、接着系細胞や浮遊系細胞でもゲル形成が確認できたことより、細胞架橋ゲルは、今回使用した 3 種類の細胞株だけではなく、幅広い細胞種においても作製可能であると考えられる。さらに、凍結したアジド化細胞を用いて bAlg-DBCO と反応させた場合でも、混合した後すぐにゲルを形成することが分かった。これより、アジド化細胞は、凍結による長期保存が可能であり、化学素材として十分な長期保存特性を有することが示された。

細胞架橋ゲル内のアジド化 C2C12 細胞は、培養してから 1 週間後においても生存率が 90% 以上を維持しており、高い生存性を示した。以上のことより、細胞架橋ゲル内の細胞は長期的に生きていることが確認された。

細胞架橋ゲル内のアジド化 C2C12 細胞は対数増殖期を示して増殖することを明らかにした。本細胞架橋ゲルは、細胞と高分子が共有結合で架橋されているため、細胞分裂時には、理想的には、細胞一個あたりの高分子の結合数が半分になると予想できる。つまり、細胞分裂が繰り返されていくうちにいつか

は高分子が結合していない娘細胞が現れる。つまり、細胞架橋ゲルを培養すると、ゲルを構成する要素として留まる細胞と細胞分裂時に外に出ていく細胞が存在することになる。そこで、細胞架橋ゲルの重量変化についての考察を行った。細胞架橋ゲルは、培養してから 3 日後ではゲル重量が初期値に比べ増大した。これは、ゲル内の細胞増殖率の推移と一致することより、ゲルの構成成分である細胞が増殖したことによるゲル重量の増大であると考えられる。一般的に、分解性ゲルの重量の推移は、ゲルの構成成分が分解されることにより減少を示すことが知られている。つまり、本細胞架橋ゲルは、世界で初めてゲル重量が増大する性質 (self-growing) を有した分解性ゲルであることが分かった。

細胞架橋ゲルを細胞非接着素材である MPC ポリマーコートシャーレおよび細胞接着性素材であるコラーゲンコートシャーレ上で培養し、24 時間後にゲルとシャーレの界面に存在する細胞の接着を調べた。一般に、MPC ポリマー表面は高親水性であるため、接着タンパク質などがくっつかず、細胞は接着しないことが知られている。MPC ポリマーコートシャーレで培養した細胞架橋ゲルでは、培養してから 24 時間後において、ゲル表面の細胞は球形であり、接着している細胞は見られなかった。MPC ポリマーコートシャーレを傾けると、細胞架橋ゲルは流れてシャーレの下に滑り落ちた。他方、コラーゲンコートシャーレ上で培養した細胞架橋ゲルでは、ゲル表面の細胞の多くは接着し、伸展構造をとっている様子が確認できた。以上のことより、ゲル表面に存在する細胞は、基板の表面の性質に応答し、接着性を变化させる細胞本来の接着反応を行うことが示された。また、ゲルは傾けても流れず、その位置に留まっていた。さらに、シャーレを机に 10 回ほど叩きつけ、強い物理刺激を与えても、ゲルは流れ落ちなかった。以上のことより、シャーレとゲルの界面に存在する細胞の細胞外基質との接着を利用することで、ゲルはシャーレに接着するという機能を獲得した。つまり、ゲル内の細胞の接着反応を活かすことで、ゲルそのものに接着機能を付与できることが明らかになった。これは、細胞反応を利用したゲルの機能発現の例であり、本研究が世界初の事例である。

一般に、ゲルは多く含まれる水が潤滑剤となるため、固体の素材よりも摩擦係数が著しく低く (Table 1) [32]、ほとんどの素材に接着できないことが知られている。それに対して、細胞は、幅広い表面特性を有する素材に接着性を示すことが知られている [33]。Fig. 31 は、様々な表面特性を有する素材に対する細胞の接着性を示したグラフである。このグラフより、一部の超親水性表面を除き、弱い親水性表面から撥水性表面まで幅広い素材に接着することが分かる。細胞架橋ゲルの場合も、アルギン酸はシャーレに接着しないが、

細胞が接着するため、ゲル全体としてシャーレに接着している。つまり、細胞架橋ゲルの手法は、ゲルの応用を著しく制限する重大な問題点である「素材非接着性」を解決できるものであり、ゲル科学にブレークスルーをもたらすと期待される。細胞架橋ゲルをトリプシン処理すると、ゲル内の細胞はシャーレからはがれ、ゲルもシャーレからはがれた。はがれた細胞架橋ゲルを別のコラーゲンコートシャーレに移し、24 時間培養したところ、ゲルは再びシャーレに接着した。つまり、ゲルの接着および脱着に、細胞の反応を利用することで、ゲルに繰り返し接着・脱着機能を付与できることが明らかになった。

本研究において、細胞を賢い化学素材として用いた“生きている機能性ハイドロゲル”を作製することに成功し、さらに、細胞反応を利用したゲルの機能創発に成功した。つまり、本細胞架橋ゲルは、細胞反応をゲルの機能発現に変換することが可能な世界初のシステムであり、細胞の新しい活用法を提案するものである。

#### 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 2 件)

Koji Nagahama, Naho Oyama, Kimika Ono, Atsushi Hotta, Keiko Kawachi, Takahito Nishikata  
Nanocomposite injectable gels capable of self-replenishing regenerative extracellular microenvironments for in vivo tissue engineering  
Biomaterials Science, 6, 550-561 (2018)

#### 長瀧 宏治

生命分子 - 合成高分子ハイブリッドの開発とナノバイオマテリアル その可能性  
Materials Stage, 7, 18-21 (2015)

#### 〔学会発表〕(計 10 件)

木村 友香、長瀧 宏治  
細胞架橋ゲルの創製と機能創発  
第 17 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、2018 年 3 月

青山 星海、長瀧 宏治  
神経細胞を高分子で架橋したハイドロゲルの作製およびゲル内での神経ネットワーク構築  
第 17 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、2018 年 3 月

長瀧 宏治、武本 紋佳  
細胞を高分子で架橋したハイドロゲルの創製および細胞反応を利用したゲル

の機能創発  
第 66 回高分子討論会、愛媛大学城北キャンパス、2017 年 9 月

長瀧 宏治、武本 紋佳  
細胞を高分子で架橋したハイドロゲルの創製および細胞反応を利用したゲルの機能創発  
第 27 回バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学大岡山キャンパス、2017 年 7 月

武本 紋佳、長瀧 宏治  
細胞を化学素材として用いた“生きている”ハイドロゲルの開発とその機能探索  
第 65 回高分子討論会、神奈川大学横浜キャンパス、2016 年 9 月

武本 紋佳、長瀧 宏治  
細胞架橋ゲルの作製および細胞反応を活かしたゲルの機能 創発の試み ~ “生きている”高機能材料の開発を目指して~  
第 26 回バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学大岡山キャンパス、2016 年 7 月

Ayaka Takemoto, Koji Nagahama  
“Living” smart gels made by bioorthogonal cross-linking reactions of azide-modified cells with alkyne-modified biocompatible polymers  
Polymer Networks Group Meeting 2016, Royal Institute of Technology, Stockholm (Sweden), 2016 年 6 月

武本 紋佳、長瀧 宏治  
細胞を架橋点する“生きた”ゲルの創製と細胞反応を活かした機能創発  
第 64 回高分子討論会、東北大学川内キャンパス、2015 年 9 月

武本 紋佳、長瀧 宏治  
細胞を架橋点する新規スマートゲルの開発および細胞反応を利用した機能創発  
第 61 回高分子究発表会(神戸) 兵庫県民会館、2015 年 7 月

武本 紋佳、長瀧 宏治  
細胞表面糖鎖修飾を利用した細胞架橋ゲルの開発とその機能探索  
第 64 回高分子会年次大会、札幌コンベンションセンター、2015 年 5 月

#### 〔図書〕(計 1 件)

長瀧 宏治  
ゲルを用いた再生医療関連技術の開発  
ゲル化・増粘剤の使い方、選び方、事例

集（技術情報協会） 503-513（2018）

〔その他〕

ホームページ等

甲南大学フロンティアサイエンス学部ホームページ

<http://www.konan-first.jp/database/search.php>

6．研究組織

(1)研究代表者

長濱 宏治（NAGAHAMA, Koji）

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・  
准教授

研究者番号：00551847