

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14238

研究課題名(和文) 環境応答型ハイドロゲルを利用した細胞を基材とするバイオマテリアルの創製

研究課題名(英文) Redox-responsive hydrogels as potent matrices for fabrication of cell-based biomaterials

研究代表者

神谷 典穂 (Kamiya, Noriho)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：50302766

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)：生細胞からなる集塊構造体は、薬剤スクリーニング系(細胞アッセイ)や再生医療分野において、動物実験やドナー不足等の課題を克服可能な人工の生体材料として期待されている。本研究では、独自に開発した酸化還元応答型ハイドロゲル調製法を駆使して、細胞を主要構成要素とする自立的なバイオ素材の作製を試みた。具体的には、(1)ハイドロゲル内部での肝がん由来細胞の包括培養による球状構造体(スフェロイド)、(2)ハイドロゲル上面での繊維芽細胞の培養によるシート状構造体を作製した。さらに、対象細胞を人工多能性幹細胞(iPS細胞)や昆虫細胞へと拡張し、これらの細胞からなる凝集構造体の構築に関する基礎知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Cellular aggregates such as spheroids and cell sheets have been received much attention especially as a base material for drug assays, regenerative medicine, and tissue engineering. Hydrogels have potential for scalable preparation of cellular aggregates because they provide a two- or three-dimensional environment suitable for cell culture. Herein, we validated the potential use of a redox-responsive hydrogel as a scaffold for the fabrication of cell-based biomaterials. A hydrogel composed of thiolated poly(ethylene glycol), which can be degraded using cysteine as a reducing agent under mild conditions, was prepared by a new enzymatic method using horseradish peroxidase. Several cell lines encapsulated in the hydrogel formed cellular spheroids, whereas fibroblast cells adhered on the hydrogel formed cell sheets. Preliminary studies with induced pluripotent stem (iPS) cells and insect cells showed the potential utility in the formulation and recovery of the cellular aggregates.

研究分野：生体分子工学

キーワード：ハイドロゲル バイオマテリアル 細胞培養 細胞アッセイ 酵素 タンパク質 酸化還元 バイオインターフェース

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は生命の基本単位であり、生体を構成する個々の細胞が各々異なる役割を担い、高次の組織構造を形成することで、生命体としての機能を維持している。生体から細胞を分離し、生体外で安定に培養することは、基礎科学分野において生命現象解明への第一歩となる。また、近年、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell, ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cell, iPS 細胞) などの幹細胞が注目されている。これらの幹細胞は、様々な種類の細胞へと分化する多分化能と、自己を複製する能力を併せ持ち、再生医療や細胞アッセイ分野への応用が期待されている。さらに、現在多くのタンパク質製剤 (抗体医薬やワクチン等) が培養細胞を用いて生産されており、これらは世界のバイオ医薬品の売り上げトップ 10 の大部分を占めている。このように細胞培養技術は、最先端の研究開発と医療を下支えする基盤技術として欠かせないものであり、生体外での細胞機能の維持・活用を目的とした細胞培養技術、さらには組織様構造の構築に関する研究開発が各国で活発に進められている。

### 2. 研究の目的

高分子ハイドロゲルは、基礎科学からバイオテクノロジー分野まで幅広く利用されている基盤材料である。ハイドロゲル中で細胞を安定に包括培養することができれば、球状の細胞凝集構造体を得ることができる。スフェロイドと呼ばれるこの三次元状の小さな細胞凝集構造体は、一般的なプレート上で単層培養される細胞と比べ、生理機能が向上することが報告されている。一方、ハイドロゲル上に細胞を播種し、接着状態で培養することができれば、シート状の細胞凝集構造体の作製が可能である。一般的に細胞シートと呼ばれるこの二次元状の細胞構造体は、生体組織の再構築を目指す再生医療分野において重要な研究対象となっている。

上述の細胞凝集構造体は、細胞を用いた薬剤スクリーニング系 (細胞アッセイ) や再生医療分野において、動物実験やドナー不足等の課題を克服可能な人工の生体材料として期待されている。そこで本研究では、細胞凝集構造体を生細胞を基材とするバイオ素材と捉え、これを簡便な操作で大規模に作製し、得られた高次構造体を簡便に回収する技術の開発を目的とした。具体的には、申請者らが最近開発した酵素反応による酸化還元応答型ハイドロゲルの新規調製法<sup>1,2)</sup>を利用し、細胞を主要構成要素とする自立的なバイオ素材の調製法の確立に向け、(1) ハイドロゲル内部での細胞包括培養によるスフェロイド形成、(2) ハイドロゲル上面での接着培養による細胞シート形成について検討した。まず、実験例の多い動物培養細胞を用いて、ハイドロゲル基材の物理的・化学的特性が細胞増殖に与える影響を総合的に評価し、異なる

形状を有する細胞構造体の調製法を確立することを目標とした。さらに、動物細胞で得られた成果を踏まえ、報告例の少ない昆虫細胞を対象とした細胞凝集構造体の構築に関する基礎知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

酵素反応を介した酸化還元応答型ハイドロゲルの調製法の概要を以下に示す。分岐型 SH 基修飾ポリエチレングリコール (4- or 8-arm PEG-SH, 日油株式会社)、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP, 和光純薬工業株式会社)、グリシルチロシン (Gly-Tyr) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) に溶解し、これらの水溶液と細胞懸濁液を混合し、静置することで細胞をゲル内に包括した。一方、細胞シートの作製においては、ハイドロゲル上に付着細胞を播種した。それぞれの系において、細胞が十分に増殖するまで適宜培地を交換しながら培養を行った。その後、還元剤としてシステイン (Cys) 水溶液を添加することでハイドロゲルをゾルへと溶解し、得られた細胞構造体を回収した。二重染色試薬 (Cellstain-Double Staining Kit, 同仁化学研究所) により生細胞と死細胞を染め分け、蛍光顕微鏡観察により細胞の生存率を評価した。また、細胞の生理機能の評価も適宜実施した。スフェロイド形成をモデルとした本研究の概念図を図 1 に示す。

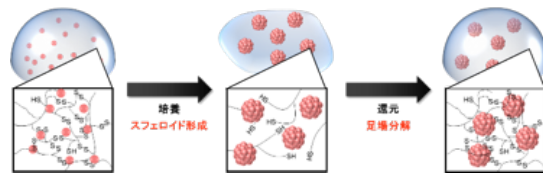


図 1 ハイドロゲル中でのスフェロイド形成とゲルネットワークの崩壊による回収の概念図

### 4. 研究成果

(1) ハイドロゲル中での包括培養による球状細胞凝集構造体 (スフェロイド) の形成

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞株を用いた包括培養により、スフェロイドの形成を試みた。ゲル構成成分 (PEG-SH, HRP, Gly-Tyr) を含むゾル溶液と HepG2 細胞懸濁液を混合し、30 分程度静置することで細胞包括ゲルを得た。その後、培地交換をしながら細胞培養を継続し、スフェロイドの形成を確認した後、Cys を含む水溶液を添加してゲルを崩壊させ、スフェロイドを回収した (図 2)。

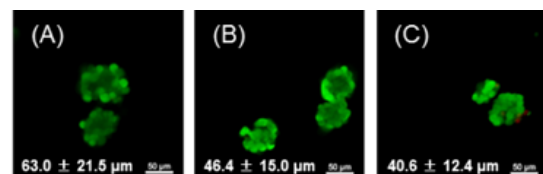


図 2 回収後のスフェロイドの蛍光顕微鏡画像 (緑 : 生, 赤 : 死細胞). 高分子濃度: (A) 5, (B) 10, (C) 15% (w/v). (スフェロイド平均直径を図中に示した。)

得られたスフェロイドの直径は高分子濃度の増加と共に減少した。これは高分子濃度の増加に伴う架橋密度の増加により、細胞の増殖可能な空間が減少し、細胞増殖が抑制されたためと考えられる。また、回収したスフェロイドを染色後、蛍光顕微鏡による観察を行った結果、死細胞はほとんど観察されず、細胞は高い生存率を維持していた。

次に、肝臓の基本機能であるアルブミン分泌量及び尿素合成量の評価を行った。培養に用いた培地及び Cys 溶液により溶解させたゾル溶液中のアルブミン量は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により、尿素は試薬キットを用いて定量を行った。その結果、ハイドロゲル内包括培養と単層培養間を比較すると、ゲル内で培養した細胞はアルブミン産生量、尿素合成量の何れも共に高い値を示し、肝細胞機能を発現していることが確認された (図 3)。以上のことから、酸化還元応答性ハイドロゲルを用いた包括細胞培養により、細胞機能を維持した状態でのスフェロイド形成と、ゲルからのスフェロイドの回収が可能なが明らかとなった。

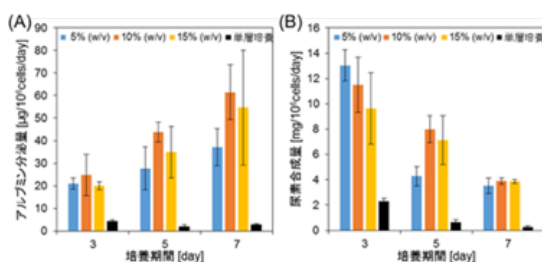


図3 HepG2 細胞スフェロイドと単層培養系の比較 (A) アルブミン分泌量, (B) 尿素合成量

また、本手法の汎用性を評価するため、iPS 細胞の包括培養による胚様体の作製を試みた。その結果、ゲル内での iPS 細胞の包括培養に伴うスフェロイドの作製が可能であった。今後、iPS 細胞の未分化状態の維持等、さらなる基礎研究が必要である。

#### (2) ハイドロゲル上での接着培養による細胞凝集体 (細胞シート) の形成

ポリエチレングリコール (PEG-SH) を基材とするハイドロゲルによる付着細胞の培養に際し、細胞の足掛かりとなる部位をゲルネットワークに導入した基材を設計した。コラーゲン由来ゼラチン、絹タンパク質由来セリシン成分が導入されたハイブリッド型酸化還元応答性ハイドロゲルを調製し、L929 繊維芽細胞を培養したところ、何れにおいてもシート状細胞凝集体が得られた。

次に、チオール基を化学修飾したゼラチンとヘパリンを同時にハイドロゲルに導入することで、細胞接着性と増殖因子結合性を併せ持つ機能性ハイドロゲルの作製を試みた (図 4)。培養 4 時間後の観察結果から、ゼラチン導入によるハイドロゲルへの細胞接着性の付与を確認した。一方、培養 2 日後の

観察結果から、ヘパリン導入濃度に依存した細胞接着性の変化が観察され、特に高濃度のヘパリンの導入はハイドロゲルと細胞間の接着性を低減することが示唆された。

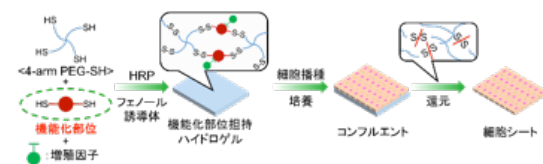


図4 増殖因子固定化ハイドロゲルの設計と細胞シート作製への応用の概念図

図 5 に回収した細胞シートの観察結果を示す。蛍光顕微鏡による観察結果から、死細胞はほとんど観察されず、Cys 溶液の添加により、生細胞に対して穏和な条件下で細胞シートの回収が可能なが示された。

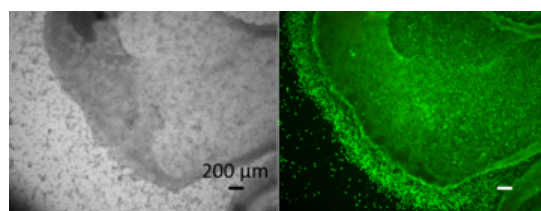


図5 ハイブリッド型ハイドロゲル上で作製した L929 細胞シート (左: 明視野像; 右: 蛍光画像)

以上の成果を踏まえ、昆虫細胞からなる集塊構造の形成に向け、ヤガ科由来 Sf9 細胞の包括培養ならびにゲル上での接着培養による細胞凝集体の作製を試みた。その結果、動物細胞の培養と同様、細胞接着因子を導入したハイドロゲル上において生細胞からなるシート状昆虫細胞集塊構造の形成を示唆する結果を得た。しかしながら、得られた構造体は動物細胞と比較して安定性に乏しく、細胞間および細胞-基質間の相互作用が弱いことが示唆された。異なる昆虫由来株化細胞に対する基礎検討の結果、昆虫細胞を基材とするバイオ素材の設計においては、適切な細胞外基質の導入が必要なが示唆された。

以上のことから、本研究で使用した酸化還元応答性ハイドロゲルは、再生医療や細胞アッセイ分野で求められている高次細胞培養系へ広く適用可能なが示された。また、さらなる展開に資する新たな用途開発に繋がる複数のシーズを得ることができた。

#### <引用文献>

- ① K. Moriyama et al., Chem. Commun., 50, 5895-5898 (2014)
- ② K. Moriyama et al., RSC Adv., 5, 3070-3073 (2015)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① K. Moriyama, S. Naito, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, 'Enzymatically



prepared redox-responsive hydrogels as potent matrices for hepatocellular carcinoma cell spheroid formation.’, *Biotechnol. J.*, 11, 1452-1460 (2016)  
[DOI: 10.1002/biot.201600087](https://doi.org/10.1002/biot.201600087)

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 香川元気、内藤翔乃、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘増殖因子固定化ハイドロゲルを基材とする細胞培養系の開発’, 細胞アッセイ研究会シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2017年1月31日, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール.
- ② 香川元気、内藤翔乃、南畑孝介、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘増殖因子固定化酸化還元応答性ハイドロゲルの設計と細胞シート作製の試み’, 第38回日本バイオマテリアル学会大会, 2016年11月21~22日, 福岡国際会議場.
- ③ 内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘酸化還元応答性ハイドロゲル内での肝細胞スフェロイドの作製と機能評価’, 第38回日本バイオマテリアル学会大会, 2016年11月21~22日, 福岡国際会議場.
- ④ G. Kagawa, S. Naito, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, ‘Functionalization of redox-responsive hydrogel as a scaffold for the fabrication of cellular sheets’, 22<sup>nd</sup> Young Asian Biochemical Engineers’ Community 2016 (YABEC 2016), 2016年10月27~29日, 宮崎シーガイア国際会議場.
- ⑤ 神谷典穂、内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、南畑孝介、後藤雅宏、‘酸化還元応答性ハイドロゲルを基材とする細胞組織体の形成と機能評価’, 第68回日本生物工学会, 2016年9月28~30日, 富山国際会議場.
- ⑥ 香川元気、内藤翔乃、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘増殖因子固定化ハイドロゲルを基材とする細胞シートの作製’, 化学工学会第48回秋季大会, 2016年9月6~8日, 徳島大学.
- ⑦ 内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘酸化還元応答性ハイドロゲル中での細胞包括培養によるスフェロイドの作製と機能評価’, 化学工学会第81年会, 2016年3月13~15日, 関西大学.
- ⑧ 香川元気、神谷典穂、後藤雅宏、‘細胞シート作製担体としてのハイドロゲルの機能化に関する基礎研究’, 第18回化学工学会学生発表会, 2016年3月5日, 福岡大学.
- ⑨ 内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘酵素触媒を介した酸化還元応答性ハイドロゲルへの細胞包括とスフェロイド作製への応用’, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11

月9~10日, 京都テルサ.

- ⑩ 内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘スフェロイド作製を目的とした酸化還元応答性ハイドロゲル内での3次元細胞培養’, 第5回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会, 2015年9月18日, 九州大学.
- ⑪ 内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘酸化還元応答性ハイドロゲル内での簡易スフェロイド形成及び回収技術の確立’, 化学工学会第47回秋季大会, 2015年9月9~11日, 北海道大学.
- ⑫ 内藤翔乃、森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、‘酸化還元応答性ハイドロゲルを用いたスフェロイドの作製’, 第52回化学関連支部合同九州大会, 2015年6月27~28日, 北九州国際会議場.

〔図書〕(計 1 件)

- ① K. Moriyama, R. Wakabayashi, N. Kamiya, *RSC Smart Materials*, No.24 (Qun Wang (ed.)), *Smart Materials for Tissue Engineering: Fundamental Principles*, ‘Enzyme-mediated Smart Materials for Tissue Engineering.’, Chapter 17, pp. 469-490, Royal Society of Chemistry (2017)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: ハイドロゲルの製造方法、包括対象物の包括方法、および包括対象物の放出方法  
発明者: 神谷典穂、森山幸祐、南畑孝介  
権利者: 神谷典穂、森山幸祐、株式会社日立製作所  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2015/062458  
出願年月日: 2015年4月16日  
国内外の別: 国外

〔その他〕ホームページ等

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~kamiya/CFC-BT/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神谷 典穂 (KAMIYA, Noriho)  
九州大学・工学研究院・教授  
研究者番号: 50302766

### (2) 研究分担者 該当なし

### (3) 連携研究者

日下部 宜宏 (KUSAKABE, Takahiro)  
九州大学・農学研究院・教授  
研究者番号: 30253595

### (4) 研究協力者

森山 幸祐 (MORIYAMA, Kosuke)  
内藤 翔乃 (NAITO, Shono)  
香川 元気 (KAGAWA, Genki)