

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05249

研究課題名(和文) 軟骨組織再生のためのセルロースナノファイバー傾斜構造材料の創製

研究課題名(英文) Self-assembly of human mesenchymal stem cells with cellulose nanofibers for articular cartilage tissue regeneration

研究代表者

吉川 千晶 (YOSHIKAWA, Chiaki)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主幹研究員

研究者番号：10447930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨再生のための傾斜高次構造材料として、濃厚ポリマーブラシ付とセルロースナノファイバーと間葉系幹細胞の自己組織化に成功した。軟骨分化誘導時にナノファイバーと細胞がマイクロスケールの単一構造体(シートやボール)を形成すること、高次構造に依存して力学特性が異なることなどが明らかとなった。また、一般的なペレット培養などに比べて、軟骨分化が促進されることも確認された。これらの成果は、力学特性・構造特性の不均一性が軟骨再生において重要であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では間葉系幹細胞とポリマーブラシ間の静電相互作用を駆動力として、細胞-CNF-CPBを自己組織化させる技術を開発した。この自己組織化システムは、従来培養法と比較して軟骨分化を促進させることや、特別な装置が不要で極めて簡便であることから、細胞を高次構造化させる新しい基盤技術として、再生医療のみならず、創薬研究や化粧品開発などの研究分野への波及効果が期待できる。また、本研究課題では足場材料としてセルロースナノファイバーを用いているが、バイオマスの有効活用という観点でも社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：A novel self-assemble system of human mesenchymal stem cells (hMSCs) was developed using cellulose nanofibers (CNFs) modified with concentrated polymer brushes (CPBs) for articular cartilage tissue regeneration. By varying the CNF-CPB concentrations, we demonstrated that hMSCs were self-assembled with the CNF-CPBs and changed their sizes and shapes in a concentration-dependent manner. It should be noted that in the chondrogenic differentiation media, hMSCs/CNF-CPBs formed one sheet or one ball. The self-assemblies exhibited an usually high degree of chondrogenesis with the chondrogenic differentiation media with significant upregulation in type II collagen expression compared to the pellet culture. In addition, the level of the upregulation was different depending on the CNF-CPB concentrations. The self-assemblies also exhibited the different stiffness. Overall, our developed self-assembly system could be a new method for articular cartilage regeneration.

研究分野：高分子化学

キーワード：濃厚ポリマーブラシ セルロースナノファイバー 間葉系幹細胞 関節軟骨 自己組織化 再生医療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨損傷は外傷性の損傷や変形関節症・リウマチなどの組織の劣化などで引き起こされるが、自然治癒が見込めないため、再生医療による修復が期待されている。これまでに、細胞生物学 (*Stem Cells Trans. Med.*, 6, 1295-1303 (2017))、及び組織工学 (*Biomater. Sci.*, 5, 613-31 (2017)) の両面から研究が進められているが、未だ根本的な再生法は確立されていない。これは、現在使用されている均質な足場材料では、関節軟骨組織の連続的傾斜構造 (*Osteoarthritis Cartilage*, 24, 1317-29 (2016)) が再現できず、必要な性質や機能が発揮されないためである (図1)。

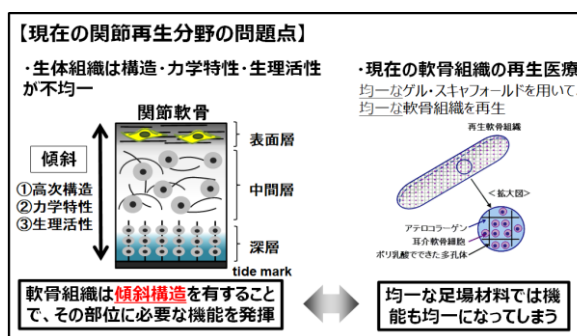


図1. 関節軟骨再生の問題点

これまでの足場材料研究では、力学特性または生理活性物質のどちらかに着目した研究しか行われておらず、両面を同時に検証し、統合的に材料開発した例はない。その一方で、生体内では力学特性と生理活性物質が協調して組織再生に影響を与えることが知られている (*EMBO*, 27, 2829-2838 (2008))。

2. 研究の目的

本研究課題では、生理活性・力学特性・高次構造の傾斜を最適化することで軟骨組織内の各部位に必要な機能を発現できると考え、軟骨組織を模倣した傾斜高次構造材料の創製を企図した。具体的には、濃厚ポリマーブラシ被覆セルロースナノファイバー (CNF-CPB) を足場材料として用い、(1) フロキュレーションにより CNF-CPB/細胞複合体を作成し (図2)、(2) 関節軟骨組織を模倣して、力学特性や生理活性が異なる高次構造を構築する。さらに (3) 各構造体における細胞機能について検討し、生理活性・力学特性・高次構造における不均一性と軟骨再生との相関について明らかにすることを目的とした。

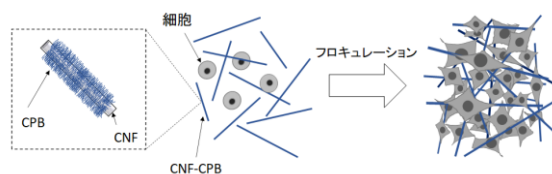


図2. CNF-CPB と細胞のフロキュレーション

3. 研究の方法

(1) 濃厚ポリマーブラシ被覆セルロースナノファイバー (CNF-CPB) の作製

表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) の開始基をエステル化反応によりセルロースナノファイバー (CNF) へ導入した (CNF-Br)。開始基密度は元素分析およびフーリエ変換型赤外分光測定 (FT-IR) により決定した。次に、SI-ATRP により CNF に各種ポリマーをグラフトした。重合後、フリーポリマーの分子量、分子量分布をゲルパーミエーションクロマトグラフィー測定により決定した。グラフト量は元素分析または FT-IR により決定し、フリーポリマーの分子量を用いてグラフト密度を算出した。

(2) 間葉系幹細胞との共培養

上記で得られた CNF-CPB と間葉系幹細胞 (hMSC) を所定濃度で混合し、3 週間培養した。参照サンプルとして、ペレット培養も準備した。なお、hMSC の軟骨分化は分化誘導培地 (TGF- β 含有) を用いて実施した。また、実験条件の最適化を目的として、市販のセルライン (HepG2、L929、hTERT など) を用いた検討も合わせて行った。

(3) 高次構造・細胞機能評価

CNF-CPB/hMSC の高次構造を位相差顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡により確認した。定量 PCR 法により軟骨マーカー遺伝子の発現量を調べるとともに、凍結切片の免疫染色 (コラーゲン I&II、アグリカン) を実施した。力学特性は原子間力顕微鏡 (AFM) により評価した。

4. 研究成果

(1) 生理活性物質 (ペプチド) の担持

①モノマー合成

CNF-CPB と hMSC を効率よく自己組織化させるため、生理活性物質 (ペプチド) の導入を検討した。ここでは、hMSC が CD44 抗原を細胞膜表面に有することに着目し、CD44 結合ペプチド

ドを Fmoc 固相合成法により合成し、アクリルアミドモノマーに担持させた。なお、CD44 に特異的に結合するペプチド配列 (QQGWFF) は、ファージディスプレイ法により決定した。まず、ペプチド末端が hMSC との結合に与える影響を調べるため、N 末端または C 末端側にモノマーを導入し、末端の異なる 2 種類のモノマーを合成した。

②ペプチド含有ポリマーの合成とその有用性評価

ペプチドモノマー(PP) (生理活性)、2-ヒドロキシプロピルアクリルアミド(HPA) (生体親和性)、ベンゾフェノンアクリルアミド(BPA) (光反応性) を三元共重合し、光架橋性のポリマーを合成した。共重合体中のペプチド担持量は μ BCA 法により評価した。また、CD 測定により共重合体中のペプチドがランダムコイルを形成していることがわかった。次に、共重合体を PET フィルム上にスピニングし、紫外線照射により固定した。

得られたポリマー表面に対し、hMSC、HepG2、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) を用いて接着実験を行った。その結果、C 末端フリーなポリマー表面にはいずれの細胞も接着しなかったが、N 末端フリーのポリマー表面では hMSC のみが接着・進展することが確認された。この結果は、ペプチド末端 (配向) が細胞認識に重要であることを示す。

また、ペプチド含有量が増えるにつれて hMSC の接着量が増えた (図 3)。これらの結果から、共重合体に含まれる生体親和性ポリマーが細胞接着を抑制し、CD44 結合ペプチドが CD44 抗原を有する hMSC のみを接着・進展させたと考えられる。

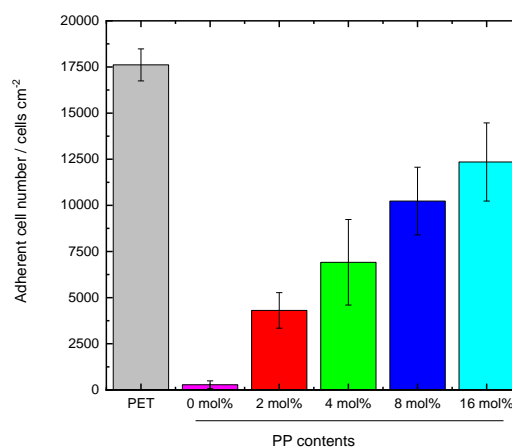


図 3. N 末端フリーな PP を有するコーティング膜への hMSC 接着量。播種密度 = 20000 個/cm²。

③ブラシ層への導入

SI-ATRP により、シリコン基板上に HPA と PP (N 末端フリー) のランダム共重合体のグラフトを試みた。ここでは重合を制御するためにフリー開始剤を系に添加しているが、フリー開始剤から成長するフリーポリマーの重合は GPC により確認された。これに対し、シリコン基板上にはポリマーブラシはほとんどグラフトされなかった。これは、ポリマーブラシ (開始基) の密度が高く、成長末端が隣接しているため、ペプチド (PP) の嵩高さのために成長が阻害されたと考えられる。

(2) 電荷を有するポリマーブラシの作製

次に、フロキュレーション (静電相互作用) により細胞と自己組織化させるため、電荷ポリマーを CNF 表面に ATRP によりグラフトした。ここではアニオン性のスチレンスルホン酸ナトリウム (SSNa) とアクリル酸 (*t*-ブチルアクリレート) の重合後に *t*-ブチル基を脱保護 (AA)、カチオン性の [2-(メタクリロイルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムクロリド (METAC) とメタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル (DMAEMA) の 4 種類を用いた。コントロールとして、中性の親水性モノマー、ポリ (エチレン) メチルエーテルメタクリレート (PEGMA) を用いた。重合条件の最適化を行い、4 種類の電荷ポリマーと中性の親水性ポリマーの濃厚ポリマーブラシ (CPB) を CNF にグラフトすることに成功した。

(3) CNF-CPB と hMSC の共培養

①電荷の影響

電荷ポリマー (PSSNa, PAA, PMETAC, PDMAEMA)、中性の親水性ポリマー (PEGMA) をグラフトした CNF を使い、表面電位が細胞との自己凝集に与える影響について検討した。その結果、いずれの電荷ポリマーの場合も各種細胞 (HepG2, L929, hTERT, hMSC) と自己凝集するのに対し、中性のポリマーでは自己凝集は起こらなかった。また、表面電位に依存して自己凝集の挙動が大きく異なることが確認された。以上の結果から自己凝集の駆動力が静電相互作用であることが確認された。

②軟骨分化

最も効率よく自己凝集した PSSNa ブラシ付与 CNF を用い、hMSC の軟骨分化について検証した。軟骨分化誘導因子 TGF- β を作用させたところ、培養 24 時間後には hMSC と CNF-PSSNa は大きな、単一の構造体（シートまたは球）に自己組織化した（図 4）。得られた自己組織化体を 3 週間培養し、定量 PCR により軟骨マーカー遺伝子（I 型&II 型コラーゲン、アグリカン、Sox9、OCN）の発現量を調べた。一例として、図 5 に II 型コラーゲン/I 型コラーゲン比を示す。TGF- β を作用させた場合、CNF-CPB との自己組織化体では軟骨マーカー遺伝子の発現量が顕著に上昇することが確認された。また、CNF-CPB 濃度が高いほど、分化誘導が促進されることも明らかとなった。この結果は、CNF-CPB/細胞自己組織化体の高次構造やサイズが、機能発現に重要であることを示唆する。

③力学特性

軟骨分化誘導 3 週間後の CNF-CPB/hMSC 自己組織化体から切片（厚み 10 μm ）を作成し、その力学特性（弾性率）を AFM により測定した。その結果、CNF-CPB 濃度（高次構造）に依存して、異なる弾性率を示すことが確認できた。これは関節軟骨組織が層によって異なる力学特性を有する事実に似ている。

以上、本研究課題で得られた結果から、CNF-CPB の化学組成・構造特性および培養条件を最適化することで、構造特性・力学特性・生理活性の異なる軟骨組織体の形成が可能であることが示された。

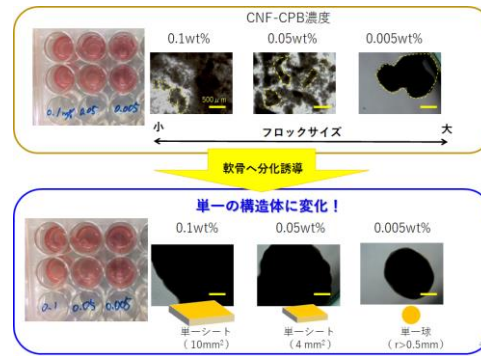


図 4. CNF-CPB と hMSC の軟骨分化誘導における自己組織化。

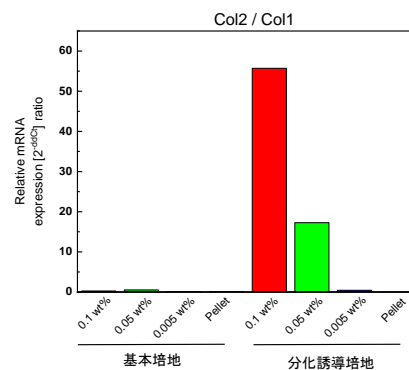


図 5. II 型コラーゲン/I 型コラーゲン比：培養 3 週間。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Chiaki, Hattori Shinya, Huang Chih-Feng, Kobayashi Hisatoshi, Tanaka Masaru	4. 巻 -
2. 論文標題 In vitro and In vivo Blood Compatibility of Concentrated Polymer Brushes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1TB00886B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Chiaki, Nakaji-Hirabayashi Tadashi, Nishijima Nanami, Nonsuwan Punnida, Toh Rou Jun, Kowalczyk Wioleta, Thissen Helmut	4. 巻 120
2. 論文標題 Ultra-low fouling photocrosslinked coatings for the selective capture of cells expressing CD44	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 111630 ~ 111630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msec.2020.111630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakakibara Keita, Maeda Keishi, Yoshikawa Chiaki, Tsujii Yoshinobu	4. 巻 4
2. 論文標題 Water Lubricating and Biocompatible Films of Bacterial Cellulose Nanofibers Surface-Modified with Densely Grafted, Concentrated Polymer Brushes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1503 ~ 1511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.0c03014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Chiaki, Sakakibara Keita, Nonsuwan Punnida, Yamazaki Tomohiko, Tsujii Yoshinobu	4. 巻 -
2. 論文標題 Nonbiofouling Coatings Using Bottlebrushes with Concentrated Polymer Brush Architecture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.1c00247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa, C.; Delalat, B.; Huang, F.; Braun, S.; Peter K.; Voelcker, N.; Thissen, H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Photo-crosslinked coatings based on 2-hydroxypropyl acrylamide for the prevention of cell attachment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Mate. Chem. B	6. 最初と最後の頁 3520-3527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9TB00044E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshikawa, C.; Sakakibara, K.; Nakaji-Hirabayashi, T.; Yamazaki, T.; Tsujii, Y.	4. 巻 105
2. 論文標題 Well-defined monolith morphology regulates cell adhesion and its functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mate Sci Eng C.	6. 最初と最後の頁 110108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2019.110108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 山内嘉尚, 吉川千晶, 中路 正
2. 発表標題 高分子グラフト化電荷中和型ナノファイバーの気体選択透過材料への応用
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会第10回北信越ブロック研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ノンスワン バンニダ、西島菜々美、榊原圭太、中路正、吉川千晶
2. 発表標題 Cellulose Nanofibers Modified with Concentrated Poly(p-Styrenesulfonic Acid Sodium Salt) Brushes for Cartilage Regeneration
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikawa Chiaki、Nakaji-Hirabayashi Tadashi、Thissen Helmut
2. 発表標題 Photo-crosslinked bioactive coatings based on poly(2-hydroxypropyl acrylamide) for selective capture of mesenchymal stem cells
3. 学会等名 WBC-2020 (11th World Biomaterials Congress) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川千晶
2. 発表標題 濃厚ポリマーブラシを活用した生体材料の開発
3. 学会等名 第 47 回東北地区高分子若手研究会夏季ゼミナール (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川千晶、榊原圭太、辻井敬亘
2. 発表標題 濃厚ポリマーブラシ被覆セルロースナノファイバーと細胞の自己組織化
3. 学会等名 2019年度 繊維学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川千晶
2. 発表標題 細胞のプロキュレーションによる自己組織化培養システムの創出
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 C. Yoshikawa, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Thissen et al
2. 発表標題 Bioinert and bioactive coatings based on poly(2-hydroxypropyl acrylamide)
3. 学会等名 TERMIS-AP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiaki Yoshikawa
2. 発表標題 Flocculation of Cells by Cellulose Nanofibers Modified with Concentrated Polymer Brushes
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiaki Yoshikawa
2. 発表標題 Concentrated Polymer Brushes as Biointerfaces: Fundamental and Application Studies
3. 学会等名 1st NIMS-CSIRO Symposium: Materials for Biomedical Applications (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Yoshikawa
2. 発表標題 Bioinert and Bioactive Coatings based on Poly(2-hydroxypropyl acrylamide)
3. 学会等名 2nd CSIRO-NIMS Symposium: Materials and Technologies for Life Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiaki Yoshikawa, Keita Sakakibara, Takashi Hoshiba, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Yoshinobu Tsujii
2. 発表標題 Well-defined Monolith Morphology Regulates Cell Adhesion and Functions
3. 学会等名 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川千晶、干場隆志、榊原圭太、辻井敬亘
2. 発表標題 フロキュレーションによるセルロースナノファイバーと細胞の自己組織化
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	榊原 圭太 (SAKAKIBARA Keita) (20618649)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------