

令和 3 年 8 月 25 日現在

機関番号：57301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14066

研究課題名（和文）組織損傷時の生体内環境に着想を得たエクソソーム生産用の幹細胞培養環境設計

研究課題名（英文）Design of stem cell culture environment for production of exosome inspired by tissue damage in-vivo

研究代表者

森山 幸祐（Moriyama, Kosuke）

佐世保工業高等専門学校・物質工学科・助教

研究者番号：30814313

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）：本研究では物理的及び化学的観点から幹細胞の3次元培養を可能とする高分子ハイドロゲルを作製することを目的としている。実施期間内において、高分子水溶液のゲル化時間に焦点を当て、研究を進めてきた。我々がこれまでに独自に開発したゲル形成法では、高分子水溶液のゲル化時間が長く、細胞をゲル内に包括し培養するためのゲル作製法に不適當であるという課題があった。そこで高分子間架橋反応を触媒する酵素の活性化をより効果的に進行させることが予測される系を考案した。具体的には系中に塩基を添加することで、高分子水溶液のゲル化時間が劇的に短縮されることを見出し、細胞包括に適したゲル化法を確立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々は細胞や生体分子に対して極めて温和なハイドロゲル作製法を開発している。しかしながら当該手法は高分子水溶液がゲル化するまでの時間が長く（数十分程度）、その結果、細胞包括培養のためのゲル作製法として不適當であるという課題があった。本研究ではこの課題を克服し、高分子水溶液のゲル化時間を数分程度に短縮することで、従来法を細胞包括培養に適応可能なゲル作製法に改良することに成功した。また本研究成果は、先述の応用例だけでなく医工学や生物工学等、様々な分野において利用可能なゲル作製法であると考えられ、そのような観点から社会的意義が大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to prepare a polymer hydrogel for three-dimensional culture of stem cells designed with physical and chemical perspectives. We have been studied focusing on the gelation time of aqueous polymer solution. The gel formation method previously reported from our group has a problem that it is not suitable for a gelation to prepare the hydrogel scaffold to culture cells within a gel because the gelation time is long. We succeeded in promoting the gelation reaction by adding a base to the gel precursor solution to proceed efficiently the catalytic reaction of the enzyme carrying the cross-linking reaction.

研究分野：生体材料

キーワード：高分子ハイドロゲル 酵素触媒反応 ゲル化時間 細胞包括

1. 研究開始当初の背景

生体内あるいは生体外においてヒトを含む動物細胞の生存率やその細胞が持つ機能を高く維持するためには細胞外の環境設計が重要である。このような環境を提供することが可能な人工足場材料は医療、特に再生医療分野において魅力的な材料として活発に研究が進められている。我々はそのような人工足場材料として高分子ハイドロゲルに着目している。ハイドロゲルは柔軟性や弾力性などの性質が我々の生体組織と類似していることから、人工足場材料を構築する上で重要な基盤材料になると考えられる。これまでに「生体内分子によるゲルの機能化」という化学的視点、そして「ゲルの弾性率」という物理的視点の各々を考慮した人工足場材料が提案されてきた。しかしながらこれらを複合的に考慮し、設計された人工足場材料はこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

このような細胞培養を目的としたハイドロゲルを構築する上で重要な点は、その作製法である。具体的には高分子間の架橋形成反応が、細胞の生存率や生体由来分子の機能低下を招くことなく進行することが強く望まれる。我々はこれまで西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の触媒反応を利用し、細胞培養への応用を目的としたハイドロゲル基材を作製する研究を行ってきた。その研究過程において、従来法に比べ、細胞やタンパク質等の生体分子に対し、極めて温和なゲル形成法を開発している[*Chem. Commun.*, 2014, 50, 5895.; 特願 2016-513848]。この手法により作製したゲルの内部あるいはゲル上において、高い機能を保持したまま対象細胞の培養が可能であることを見出している[*Biotechnol. J.*, 2016, 11, 1452.; *RSC Adv.*, 2015, 5, 3070.]。本ゲル形成法は、HRP にフェノール誘導体とチオール基を含む高分子を混合することでジスルフィド結合を架橋点とするゲルが生じるものである。これまでに、本手法による高分子間架橋形成反応が細胞生存率の低下を招くことなく進行することを確認している。しかしながら、当該手法における高分子水溶液のゲル形成時間は比較的長いことから、細胞培養用の足場材料としての利用が制限されるという課題があった。今回我々は、ジスルフィド形成反応時におけるチオール基の脱プロトン化に着目し(図 1)、系中への塩基添加が高分子水溶液のゲル形成時間に及ぼす影響を評価した。

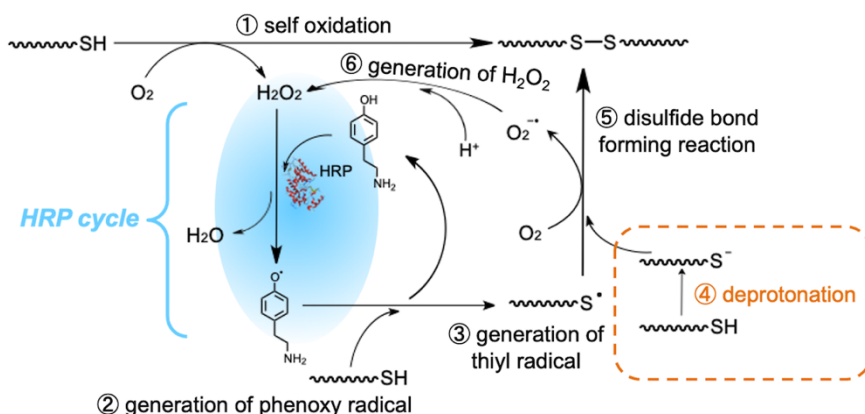


図 1. ゲル化時間短縮のための戦略. チオールの脱プロトン化を促進することで HRP の活性化に必要な過酸化水素の生成が促進されることが考えられる。

3. 研究の方法

高分子材料として末端にチオール基が修飾された 4 分岐型の Poly(ethylene glycol) (4-arm PEG-SH) を、小分子フェノール誘導体としてチラミンを用いた。本研究では小分子添加剤としてトリエチルアミン (TEA) を選択し、塩基が高分子水溶液のゲル化時間に及ぼす影響を評価した。また、塩基添加の有無が得られるゲルの弾性率や膨潤率等の物理的特性に及ぼす影響を評価した。また最後に小分子塩基として生体由来分子であるアミノ酸を用い、これが高分子水溶液のゲル化時間に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) TEA 添加が高分子水溶液のゲル化時間に及ぼす影響

まず初めに TEA 濃度がゲル化時間に及ぼす影響を評価したところ、いずれの HRP 濃度条件においてもゲル前駆体溶液中の TEA 濃度が増加すると共にゲル形成時間は短縮された(表 1)。我々が開発したゲル作製法では高分子末端のチオール基が HRP 触媒反応によりチオールラジカルとなり、これがチオールアニオンと反応することで架橋形成が進行する。その結果、HRP の活性化に必要な過酸化水素が生成される。従って、系中における TEA 濃度の増加によりチオール基の脱プロトン化が促進されたことによって高分子水溶液のゲル化時間が短縮されたと考えられる。次いで HRP 濃度が高分子水溶液のゲル化時間に及ぼす影響を評価した。その結果、HRP 濃度の増加とともに高分子水溶液のゲル化時間は短縮された(表 1)。これは HRP 濃度の増加によって、系中のチオールラジカルの生成量が増加したためであると考えられる。本検討において、最もゲル化時間が短縮された条件は HRP: 濃度 5 U/ml、TEA: 5 mM であり、当該条件における高分子水溶液のゲル化時間は約 8 min であった。以上の結果から、ゲル前駆水溶液に還元剤を添加することで、我々が開発したゲル化プロセスを高効率化することに成功した。

表 1. TEA 濃度が高分子水溶液のゲル化時間に及ぼす影響.

TEA [mM]	HRP: 0.05U/ml	HRP: 0.5U/ml	HRP: 5U/ml
	Gelation time [min]		
0	105 ± 27	26.4 ± 1.7	26.2 ± 1.6
1	79.6 ± 14	19.1 ± 0.76	18.7 ± 0.92
3	49.0 ± 1.9	15.4 ± 1.9	12.9 ± 1.1
5	35.1 ± 3.2	12.4 ± 0.96	8.03 ± 0.53

(2) TEA 添加が得られるゲルの物理的特性に与える影響

次に TEA 添加の有無が、得られるゲルの貯蔵弾性率に及ぼす影響を評価した。その結果、4-arm PEG-SH が 5 wt% の条件で作製したハイドロゲルは TEA 添加の有無に関わらず、1.1 kPa 程度の貯蔵弾性率を示した(図 2(a))。また平衡膨潤率並びにゲル中の高分子含有量に関しても TEA 添加による影響は観察されなかった(図 2(b)及び(c))。以上の結果から、TEA は得られるゲルの物性には影響を及ぼさず、ゲル化のカイネティクスにのみ影響することが示唆された。

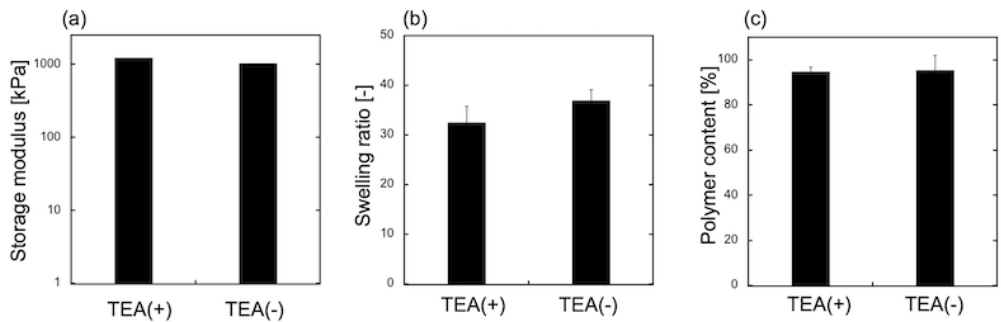


図 2. TEA の添加がゲルの物理的特性に及ぼす影響.

(3) 還元剤によるゲルの溶解

我々が考案したゲル化法ではジスルフィド結合により高分子間が架橋されているため、得られたハイドロゲルは還元環境下において容易に溶解させることができる。そこで還元剤としてアミノ酸の一種であるシステイン(Cys)を用い、ゲル前駆溶液への TEA 添加がゲルの溶解挙動に与える影響を評価した。PBS に浸漬させた条件ではハイドロゲルの溶解は観察されなかった。一方で、Cys 水溶液に浸漬させたゲルは TEA 添加の有無に関わらずゲルの溶解が観察された。また両条件においてゲルの溶解時間に大きな差は観察されなかったことから、TEA の添加はゲルの還元応答性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(4) 塩基性アミノ酸の有用性

上記で使用してきた還元剤である TEA は細胞毒性を示すという課題があった。そこでこの問題を解決するため、TEA の代替として生体由来分子である塩基性アミノ酸(アルギニン)の有用性を評価した。まず初めにゲル化時間の評価を行なったところアルギニンを用いた条件でもゲル化時間の短縮が確認された(表 2)。また、作製したゲルの物理的特性や還元環境における溶解挙動を確認したところ、こちらも TEA と同様の傾向が観察されたことから、塩基性アミノ酸であるアルギニンを TEA の代替として利用可能であることが明らかとなった。

表 2. アルギニン濃度が高分子水溶液のゲル化時間に及ぼす影響.

Arginine [mM]	Gelation time [min]
0	23.9±0.71
1	19.5±2.1
3	16.8±1.6
5	15.8±1.7
10	12.5±3.8

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 森山 幸祐、山口 恭平、若林 里衣、後藤 雅宏、神谷 典穂
2 . 発表標題 酵素仲介型ゲル化プロセスの高効率化に向けた添加剤の効果
3 . 学会等名 化学工学会第85年会、関西大学
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 森山 幸祐、井元 乃絵、山口 恭平、若林 里衣、後藤 雅宏、神谷 典穂
2 . 発表標題 ペルオキシダーゼ触媒反応を利用したゲル形成反応の高効率化
3 . 学会等名 化学工学会第86年会
4 . 発表年 2021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
研究協力者	井元 乃絵 (Inomoto Noe)		
研究協力者	山口 恭平 (Yamaguchi Kyohei)		

6．研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山口 忠大 (Yamaguchi Tadahiro)		

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
---------	---------