

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18381

研究課題名（和文）生体内免疫反応回避を目指した擬似細胞材料の創製

研究課題名（英文）Fabrication of pseudo-cellular materials to avoid immune responses in vivo

研究代表者

小田 悠加（Oda, Haruka）

東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任助教

研究者番号：30784508

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）：免疫反応を回避するための材料として擬似細胞材料を提唱した。この擬似細胞材料はまず細胞と似ている形状、粘弾性および表面構造を持つものとして考え、作製を試みた。このための方法としてマイクロ流体デバイスを用いたポリマー粒子の作製を行い、さらに粒子の表面修飾をするためにマイクロ流体デバイスの表面修飾を行うことにより効率的に作製したポリマー粒子表面の修飾を行った。作製された擬似細胞材料に対し、細胞は粘弾性に応じて異なる反応を示すことを見出した。また長期的に移植可能な強度を持つ材料との複合化にも成功した。これは長期的に安定な移植可能材料につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工材料を生体内に移植することで失われた生体機能を代替しようとする試みは多く行われている。しかし、移植された物質は生体の免疫反応により本来期待された機能を発揮できないことが多い。そこで本研究では細胞と材料との相互作用を理解し制御することを可能とする材料を提示することを目的とする。これを達成することで免疫反応の理解の一端となるとともに長期に移植可能な材料設計を提示することができる。広く適用可能な移植用材料は多くの医療分野へ貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：A pseudo-cellular material to avoid the immune response was proposed. This pseudo-cellular material is considered to have a morphology, viscoelasticity and surface structure similar to that of a cell. We have tried to make them. For this purpose, polymer particles were fabricated using a microfluidic device and furthermore, the particles surface modification of the microfluidic device was efficiently fabricated by surface modification. The surface of the polymer particles was modified. We found that the cells responded differently to the fabricated pseudo-cellular materials depending on their viscoelasticity. Also the particle was compounded with the strong polymer materials for long-term implantable strength. This leads to long-term stable implantable materials.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ハイドロゲル 粒子 生体材料

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療や組織工学の発展により、人工的に構築した材料を生体内に移植することで失われた生体機能を代替しようという試みは多く行われている。特に、同等の機能を持つ細胞を移植することで長期的に機能を代替する細胞治療が新しい医療として注目を集めている。しかし、移植された物質は生体の免疫反応により本来期待された機能を発揮できないことが多い。生体内に異物となる細胞が導入されると免疫反応により細胞の排除が起きる。すなわち、細胞死が引き起こされると共に細胞の破壊が起こる。このような状況から細胞を守る方法の一つとしてハイドロゲルによる細胞のカプセル化が研究されてきた。この方法では細胞はハイドロゲル内部に存在するため、ハイドロゲルの網目構造により免疫細胞からの攻撃が回避される一方で必要な養分やシグナルへのアクセスは保たれる。しかしながらハイドロゲル表面への線維化などの問題が生じることが多く、未だ免疫反応を十分に回避することのできるハイドロゲル材料は作製されていない。このような材料ができれば、様々な細胞を内包し移植することができるため、細胞治療へ大きく貢献することと期待される。

2. 研究の目的

本研究では細胞と材料との相互作用を理解し、制御することを可能とする材料の提示を目的とする。この目的を達成することにより免疫反応の理解の一端となるとともに長期的に移植可能な材料設計を提示することができる。この目的を達成するために、本研究では細胞を材料として捉え、模擬細胞材料を作製する。ここで、細胞という複雑な系を全て再現することを目指すのではなく、材料として大量に作製することが可能な設計指針を提示することが大切であると考えている。すなわち、この疑似細胞材料は細胞と似ている形状、粘弾性、および表面菅状樹を持つものとして考え、作製を試みる。

3. 研究の方法

1) マイクロ流体デバイスを用いたポリマー粒子の作製

細胞と同程度の直径を持つ任意の粘弾性をもつポリマー微粒粒子を作製するため、マイクロ流体デバイスを用いてポリマー粒子を作製する。具体的にはフローフォーカシング法という方法を用いて直径が 10 - 30 μm の液滴を生成する。この液滴中にポリマーを溶解させておき、液滴が油層中で安定に存在している間にゲル化させるという方法である。水溶性ポリマーとしてアルギン酸ナトリウムを用い、マンヌロン酸とグルロン酸の割合を変えることで粘弾性を制御した、

2) マイクロ流体デバイスを用いた粒子の表面修飾

マイクロ流体デバイスを用いて、粒子を一つずつトラッピングする方法 () を用いて作製した粒子の表面への修飾を試みた。この方法を用いることにより大量の粒子を修飾することが可能となる他、必要に応じて条件を変化させた修飾を試みる事が可能となると考えた。また、この方法を用いて生体材料を扱うことを考えると生理条件下での全ての作業を行うことが必要となる。すなわち、常温、常圧、中性の条件においてマイクロ流体デバイス表面の修飾が可能である必要があり、この点に関しても検討を行う。

3) 細胞類似材料に対する生体反応の検討

最後にこのようにして作製された細胞類似材料に対する生体反応を観察した。具体的には、作製したポリマー微粒粒子表面に細胞を播種し、その影響を観察した。また、移植可能となるように加工し、マウスへの移植を試みることにより影響を観察した。

4. 研究成果

1) マンヌロン酸とグルロン酸の割合を変化させることで粘弾性の異なるハイドロゲルを調整することが可能であることを確かめた。また、この際粒子が一律の物理特性を示す必要があるため、多くの場合で用いられている外部からカルシウムイオンを供給するゲル化方法ではなく炭酸カルシウムが酸性条件下でカルシウムを放出することによるインナーゲレーション法を用いてゲル化を行った。このため、マイクロ流体デバイスの水層の流路を二つに分け、それらが液滴生成の直前に混ざり合うような流路を設計した。また、

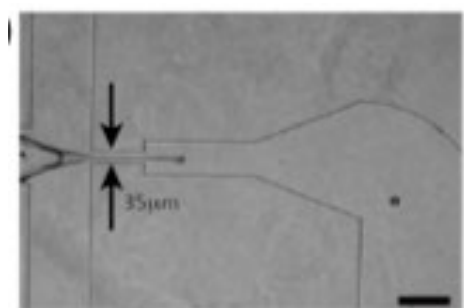
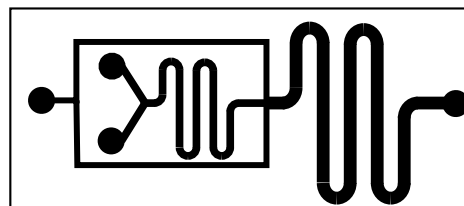


図 1 (a) 作製したマイクロ流路の概要図。油層の入り口が一つ、水層の入り口が 2 つあり、液滴を作製した後、出口で回収される。(b) 液滴が生成される様子。スケールバー : 100 μm

その後ゲル化までに十分な時間を油層中の流れの中で過ごすことができるように流路の設計の最適化を行った(図1 (a))。この結果、0.5kPa から 7.0 kPa 程度に弾性率を制御した直径 20 μ m 程度のポリマー粒子を作製することができた。(図1 (b))

2) マイクロ流体デバイスはフォトリソグラフィ法を用いて作製した。この時、最終的にはPDMS を用いて細胞と接する流路を造形する。PDMS 表面からポリマーを重合することにより、PDMS 表面の特性を変化させることができることを見出した。この技術により、マイクロ流路を用いて細胞をトラップした際に任意の相互作用を生じさせることが可能になる。また、同様の技術を用いて細胞の存在下で流路の接着が可能であったため、本研究以外にも様々な応用が可能であることが期待される。この結果は後で詳しく記述するように国際学会にて発表された。

3) まず、異なる弾性率を有するマイクロ粒子の表面に細胞接着性タンパク質である RGD ペプチドを提示したものを作製した。このマイクロ粒子を底面に隙間なく沈殿させた状態でヒト真皮線維芽細胞を播種した。12 時間後に細胞を固定し、核およびアクチンを染色した。図2に示すように、弾性率によって接着した細胞の形状が異なることが分かった。2.5kPa の粒子の上では細胞は伸展し細胞骨格が発達していたが、それ以外の硬さの粒子の上ではそのような状態は見られなかった。また、同様の弾性率を有するハイドロゲル平面表面ではどの弾性率においても細胞は伸展したことから、この結果は細胞が表面のトポロジーに反応して形状を変化させていることが示唆された。

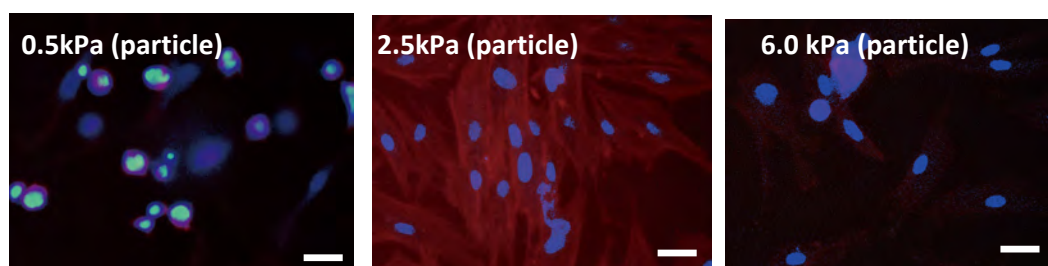


図2. 異なる貯蔵弾性率を有するアルギン酸ハイドロゲル粒子の上で培養した人真皮線維芽細胞。細胞核：青、アクチン線維：赤。スケールバー：40 μ m

最後にこの粒子のうち、細胞の接着が悪かったものを用いて直径 1 mm、長さ 10 cm 程度の円柱状の物質を作製し、長期間の移植に向けた検討を行った。予め作製した粒子を用いて、さらに低濃度のアルギン酸溶液を用いて円柱状に成形すると長期間(2週間以上)のマウスの腹腔への移植においても線維化が見られないことが確認された。一方で、全体的な強度が低下し取り出すことが困難になることが分かった。そこで、PVA 溶液を凍結融解法を用いて同様の形に成形することにより強度が十分な移植片を作製した。この方法を用いても従来と同様にマイクロ加工性に優れ、移植片として内部に細胞などを導入することができるようデバイスの改良を行った。この結果、十分な強度を保ったハイドロゲルが作製された。この PVA ハイドロゲル表面に細胞の接着性が弱いハイドロゲルビーズを結合させることで長期間培養しても強度を保ち、かつ線維化を惹起しない材料を設計することができると考えられる。

糖研究で得られた結果は現在論文準備中であり、その派生で得られた研究結果はすでに国際学会で発表されており、以下のセクションで示している。

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 2件）

1. 発表者名 H.Oda, S. Nagata, S. Takeuchi
2. 発表標題 Tough hydrogel tube for long-term cellular graft
3. 学会等名 MEMS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H.Oda and S. Takeuchi
2. 発表標題 PDMS bonding without O2 plasma treatment
3. 学会等名 The Twenty Third International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----