

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18390

研究課題名（和文）薬剤フリーで創る高機能足場：生体内環境の再現と応用

研究課題名（英文）Reagent-free fabrication of functionalized cell culture substrates for biomedical applications

研究代表者

大山 智子（Oyama, Tomoko）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 先端機能材料研究部・主任研究員（定常）

研究者番号：90717646

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）：量子ビーム（高精度に制御した各種放射線）を駆使した高分子材料の改質・微細加工技術をバイオマテリアルに応用することで、架橋剤等の薬剤を使わず、生体適合性を保持したままバイオマテリアルの物性や構造を制御する技術を開発した。特に、生体内の細胞周囲に存在する細胞外マトリックス（ECM）の主要成分であるコラーゲンを量子ビームで架橋してゲル化し、その硬さや微細形状を制御することに成功した。これにより、生体内に存在すると考えられる「ECMの柔らかな微細形状」への各種細胞の応答を調査することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞培養は生命現象の謎を解明したり、病気の原因や治療法を探ったりと、広く生命科学・医学を下支えする基盤技術である。しかし、既存のプラスチックやガラス製の培養ディッシュは生体内環境とはかけ離れており、より正確に細胞応答を調査・解明するためには、より生体内環境に近い培養基材を開発する必要がある。本研究では、細胞外マトリックス（ECM）の主要成分であるコラーゲンを、薬剤を一切使わずにゲル化させる量子ビーム架橋技術を開発した。ECMの硬さや形状といった特性も再現することができるこの技術によって、より生体内に近い培養環境を創出することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：Reagent-free functionalization and micro/nanofabrication methods of biomaterials were developed by controlling quantum-beam-induced chemical reactions. These methods were applied to collagen, which is the main constituent of extracellular matrix (ECM). Quantum-beam-induced crosslinking produced collagen hydrogels with precisely controlled elasticity and microtopography. The obtained hydrogels enabled investigating responses of cells to soft topographic cues such as those in vivo.

研究分野：量子ビーム科学

キーワード：生体材料 量子ビーム 微細加工 機能化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は周囲環境からの刺激を感知して、発生・分化・がん化といった様々な機能を発現することが知られている。細胞機能に影響を及ぼす因子として近年注目されているのが、足場からの物理刺激である。足場の硬さ(Engler et al., Cell, 2006)や微細構造(Dalby et al. Nat. Mater., 2007)が分化に影響を及ぼすことが報告されて以降、様々な材料を用いて多くの研究が行われている。一方で、生体内において細胞周囲に存在するのは細胞外マトリックス(ECM)と呼ばれるタンパク質と糖でできたハイドロゲルであり、ECMとかけ離れた環境(例えば、プラスチック製の培養ディッシュ)で培養すると、細胞が本来の機能を失い、変性してしまうことが近年多数報告されている(Brusatin et al., Nat. Mater. 2018など)。

培養環境を生体内環境に近づけるためには、ECMの主要成分であるコラーゲン等をゲル化させ、その硬さや微細形状を正確に制御して、ECMを化学的かつ物理的に再現する必要がある。しかし、コラーゲン等をECM同様の硬さ(約1~数100 kPa)を持つゲル状に調整するには、アルデヒド等の細胞毒性を有する架橋剤が必要となることが問題となっていた。

2. 研究の目的

そこで本研究は、量子ビーム(高度に制御した各種放射線)が高分子中に誘起する化学反応を活用することで、架橋剤等の薬剤を一切用いずにコラーゲン等を架橋・ゲル化して、その硬さや微細形状を制御することを目的とした。具体的には、ECMと同程度の硬さ(約1~数100 kPa)を目標値とし、さらに、柔らかなゲルを精密加工する技術も開発して、細胞が応答するとされる数マイクロメートルの微細形状をゲル表面に加工することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 線照射とゲル化の確認

豚由来のI型コラーゲン、コラーゲンの分解物であるゼラチン、さらに分子量の小さいコラーゲンペプチドの3種を試料として用いた。濃度を調整したこれらの水溶液に対して⁶⁰Co線を5~60 kGy (kGy = J/g)照射し、照射物を37℃のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に浸漬させてゲル化の有無を確認した。ゲル化が確認されたものについては、膨潤状態での重量と乾燥重量から、ゲルのタンパク質濃度を算出した。

(2) ゲルの硬さ制御

(1)で得られたゲルの圧縮弾性率を、インデンターを用いて37℃のPBS中で測定した。照射前の水溶液濃度・照射量・照射時の温度等とゲルの圧縮弾性率の関係を調査し、ゲルの硬さを正確に制御するための試料調製条件を探索した。

(3) ゲルの微細加工

柔らかなゲルを微細加工するため、量子ビーム架橋と成型を同時に行う「量子ビームインプリント技術」を導入した。具体的には、マイクロパターンを加工したフレキシブルなゴム材料・ポリジメチルシロキサンをモールド(型)として、これを水溶液表面に押し当てた状態で線を照射し、架橋・ゲル化後にモールドを剥離することによって、微細形状をゲルに転写した(図1)。



図1. 量子ビームインプリント技術による微細加工ゲルの作製法

(4) 細胞応答の確認

得られた様々な硬さ・様々な微細形状を持つゲルの上で上皮細胞(MDCK、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来)と線維芽細胞(3T3 Swiss albino、マウス胎児由来)を培養し、細胞の接着面積や縦横比などの形態、アクチン骨格の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) コラーゲンの架橋

既にゼラチンについて、乾燥状態で量子ビームを照射すると分解すること、水溶液状態では架橋が起こることを確認していたため(K. Haema, T. G. Oyama, et al., Radiation Physics and Chemistry. 103, 126-130, 2014)本研究では、まずゼラチン、次いでゼラチンよりも分子量が小さいペプチドの架橋・ゲル化を試みた。その結果、低濃度の水溶液に線を照射すると粒子状のゲルが形成して白濁した溶液となるが、数%以上の水溶液では透明なマクロゲルが形成することが分かった。

得られたマクロゲルを構成するI型コラーゲン・ゼラチン・ペプチドの濃度は、約3%~15%であった。なお、I型コラーゲンは中和・昇温によって物理ゲルを形成することが知られているが、

物理ゲルは蜂蜜状で、ゲルを構成するコラーゲン濃度は 1%程度と低い。一方、本手法を用いると、ECM と同様に幅広いタンパク質濃度を持つゲルを形成できることが分かった。

さらに、ゲルが生分解性を保持していることを酵素を用いて確認するとともに、特にゼラチンゲルについてはフーリエ変換赤外分光や高速液体クロマトグラフィーを用いた化学分析を行って、アミノ酸構成比が架橋によりほぼ変化しないことを明らかにした。

(2)ゲルの硬さ制御と微細加工

ゲルの硬さは、水溶液の濃度と 線の照射量によって、I 型コラーゲン・ゼラチン・ペプチドのいずれも生体内軟組織の ECM と同程度となる約 1 kPa から 300 kPa まで、幅広く調整できることが分かった。

硬さの制御に加え、数マイクロメートル幅のライン構造をモールドからゲルへ転写したところ、約 5 kPa 以下のゲルは蜂蜜状で形状を保つことができなかったが、それより硬いゲルは微細形状を保つことができ、2 μm 幅・高さ 2 μm のライン形状を精密に加工できることがわかった。ただし I 型コラーゲンの場合は、線架橋によるゲル化後に、37 $^{\circ}\text{C}$ の PBS 中でさらに物理ゲル化が進行し、微細形状は転写したものより小さくなった。

(3)細胞応答の確認

硬さと微細形状の両方を調整したゼラチンゲルを用いて MDCK と 3T3 をそれぞれ培養した。まず平坦なゲルを用いて培養実験を行ったところ、柔らかいゲル上ではいずれの細胞も接着面積が小さく、細胞同士が寄せ集まって 3 次元的な塊を形成する傾向が見られた (図 2 左)。ゲルが硬くなるにつれて細胞は 2 次的に伸展し、接着面積が増加したが、プラスチックディッシュ上 (硬さはゲルの 100,000 倍以上) で見られる形態とは違いが見られた。線維芽細胞 3T3 は、ゲルが柔らかいほど、ゲル内部に積極的に潜り込む様子が見られた。

次に、5 μm 幅のライン構造を加工した硬さの異なるゲルで細胞を培養したところ、平面の場合は細胞が 3 次元的な塊を作る柔らかさであっても (図 2 左)、微細形状があると細胞が形状に沿って 2 次的に伸展することが分かった (図 2 右)。

細胞の微細形状への応答はこれまで、微細加工が容易なプラスチックなどの硬い材料を用いて調査されてきたが、本研究結果は、生体内に存在すると考えられる非常に柔らかな微細形状であっても、細胞応答に大きな影響を及ぼすことを示唆している。本成果の詳細は、論文にまとめ投稿中である。

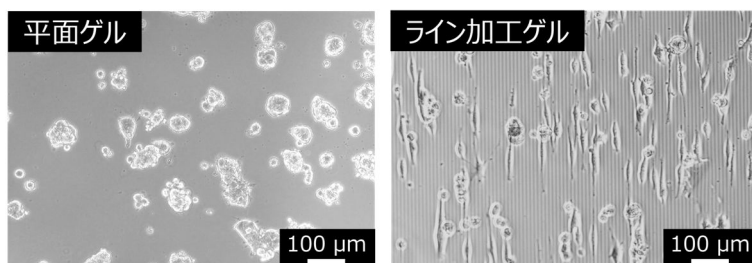


図 2 . 同じ硬さのゲルでも凹凸の有無で細胞応答が大きく変化する様子

(4)まとめと今後の展開

本成果について、2 年間で論文 1 報、招待講演 2 件、学会発表 5 件、特許出願 2 件を行った。また、本研究で開発した技術を他の生体適合性材料に応用し、論文 1 報、特許出願 2 件に結び付いた。

開発したゲルの上では、硬く平坦なディッシュ上では見ることができない、細胞の多様な機能が発現すると期待される。今後、ヒト間葉系幹細胞などを使った研究に発展させていく他、より ECM に近い組成を目指した材料選択と製法の最適化を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oyama Tomoko G., Kimura Atsushi, Nagasawa Naotsugu, Oyama Kotaro, Taguchi Mitsumasa	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of Advanced Biodevices Using Quantum Beam Microfabrication Technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Quantum Beam Science	6. 最初と最後の頁 14 ~ 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/qubs4010014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Gowa Oyama Tomoko, Barba Bin Jeremiah Duenas, Hosaka Yuji, Taguchi Mitsumasa	4. 巻 112
2. 論文標題 Single-step fabrication of polydimethylsiloxane microwell arrays with long-lasting hydrophilic inner surfaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 213704 ~ 213704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5025076	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田口光正、大山智子、木村敦、大山廣太郎
2. 発表標題 量子ビーム架橋技術の先端医療用デバイスへの新展開
3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山智子、大山廣太郎、木村敦、田口光正
2. 発表標題 生体内環境を再現するコラーゲンゲルの開発
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田亮、大山智子、大山廣太郎、田口光正、三好洋美
2. 発表標題 マイクロ構造化ハイドロゲル上の線維芽細胞の移動運動の定量解析
3. 学会等名 日本機械学会 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko G. Oyama, Kotaro Oyama, Atsushi Kimura, Mitumasa Taguchi
2. 発表標題 Radiation-Crosslinked Collagen Hydrogels for Controlling Cell Function and Fate
3. 学会等名 The 8th Asia Pacific Symposium on Radiation Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko G. Oyama, K. Oyama, A. Kimura, M. Taguchi
2. 発表標題 Collagen Hydrogels with Variable Elasticity and Topography for Mimicking In Vivo Soft Topographical Cues
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山智子
2. 発表標題 量子ビーム架橋技術を駆使した「細胞を操る」機能性培養基材の創出
3. 学会等名 高分子学会精密ネットワークポリマー研究会 第12回若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山智子
2. 発表標題 細胞を操るタンパク質ゲル足場の開発
3. 学会等名 第17回放射線プロセスシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 細胞培養用ハイドロゲル、ゲルキット、細胞培養物の製造方法、及び細胞培養用ハイドロゲルの製造方法	発明者 田口光正、大山智子、木村敦、大山廣太郎、他	権利者 量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/025916	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 接合体とその接合方法及びマイクロ流体デバイスとその製造方法	発明者 大山智子、田口光正、他	権利者 量子科学技術研究開発機構、フコク物産(株)
産業財産権の種類、番号 特許、2019-056376	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞培養用ハイドロゲル、細胞培養物の製造方法、細胞培養用ハイドロゲルの製造方法	発明者 田口光正、大山智子、木村敦、大山廣太郎、他	権利者 量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、2018-125164	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 試験用基材、及び試験用基材の製造方法	発明者 大山智子、他	権利者 量子科学技術研究開発機構、岩崎電気(株)
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/019084	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----