

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20701

研究課題名（和文）糖鎖改変細胞を用いた光造形による組織構築

研究課題名（英文）Photoresponsive 3D structure formation using glycoengineered cells

研究代表者

大高 晋之 (Otaka, Akihisa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30739561

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）：光造形タイプの3Dプリンターで用いられるメタクリロイル基を細胞膜表面に導入することで、光照射をきっかけとして懸濁液中の細胞同士が結合する細胞インクを開発した。本手法により、生体組織に近い細胞密度で細胞積層体が構築できること、また複数の細胞集団を複合化した構造が構築できることを明らかにした。また、ここで培った技術によりメタクリロイル基を修飾したアルギニンを合成したところ、コロナワクチンをはじめとしたmRNA医薬に有望な材料であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から立体構造を構築する新たな手法を提案した。本手法で構築した細胞構造体は生体組織に近い細胞密度を有しており、また複数の細胞集団を複合化できる点で画期的である。従来の細胞構造化手法では再現できなかったより複雑な組織構築の手法として応用が期待される。また、この実験を通じて習得した分子修飾法を応用して、核酸との複合化が可能な双性イオン性ポリマーを合成した。このポリマーは、双性イオン性にもかかわらず核酸保持能を有しており、学術的にも興味深い特性を示し、mRNA医薬への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：(1) We proposed a novel method to initiate intracellular adhesion by a photo-responsive cross-linking reaction using glycoengineered cells cultured with methacryloyl mannosamine. Using this method, we can fabricate a high cell density 3D structures composed of variety of cell types, and it will become possible to construct complicated structures like a living tissues. (2) We synthesized zwitterionic methacryloyl arginine using the same reaction scheme used above and found that monomers can capture nucleic acids. These findings indicate the methacryloyl arginine can be used as an mRNA condensation agent and will be a novel composition unit of mRNA carrier.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：組織工学 3Dプリンター 糖鎖改変 高分子化学 DDS mRNA医薬

1. 研究開始当初の背景

メタクリロイル基を有機小分子に修飾することで、有機小分子の生体機能を活用した新たな機能性材料の創製が期待される。本研究では、マンノサミンおよびアルギニンにメタクリロイル基を修飾した分子に着目して、バイオインクおよび核酸送達キャリアとしての応用を検討した。

【光架橋型細胞バイオインク】

組織工学の分野において、任意形状の細胞構造体を構築するための技術革新が求められている。組織再生工学の黎明期から、多孔質足場中に細胞を生着させることで空間配置する研究がすすめられてきた。また近年では、3Dプリンターなどを用いて人工的に細胞積層する取り組みにより、複雑な形状の構築が可能となってきた。しかし、依然として複雑形状の構造物を高細胞密度で造形することには技術的困難がある。

我々の先行研究により、メタクリロイル基を修飾したマンノサミン(ManM)を培地に添加すると、細胞は ManM を取り込み、糖代謝によりメタクリロイル基を細胞膜糖鎖に提示することが分かっている。またこのメタクリロイル基は光活性型チオール-エン反応の反応点として活用でき、細胞膜への機能性分子の標識が可能であることが分かっている。一方で、光活性型チオール-エン反応は光造形方式の3Dプリンターの光硬化インクとして広く活用されている。これらをつまえると、メタクリロイル基を提示させた細胞はそれ自身が光応答性のバイオインクとして活用できる可能性が考えられる。

【双性イオン性核酸送達キャリア】

mRNA 医薬は感染症や難治性疾患治療の新規モダリティとして開発が進められている。mRNA は体内の酵素により容易に分解されるため、標的細胞に効率的に作用させるためにはキャリアにより mRNA を保護する必要がある。双性イオン性キャリアは、タンパク吸着抑制効果により mRNA を保護し血中滞留性を向上期待させる効果が期待される。一方で、キャリアによるステルス性の過度な向上は mRNA の細胞内取り込みやエンドソーム脱出をも阻害し、かえって遺伝子導入効率を低下させる可能性が危惧される。双性イオン性のアルギニンメタクリルアミド(Arg-MA)は、タンパク吸着の抑制効果を持ちつつもエンドサイトーシス非依存的な細胞取り込みを示すことが報告されている。つまり、Arg-MA は mRNA を保護しつつ細胞内取り込みを阻害しない核酸送達キャリアの構成要素としての活用が期待できる。

2. 研究の目的

【光架橋型細胞バイオインク】

光活性型チオール-エン反応を用いてメタクリロイル基を提示させた細胞同士をポリチオールにより架橋させることで、細胞集合体を形成する概念検証を行なった。(1)メタクリロイル基を提示させた線維芽細胞の懸濁液に、チオール末端を有する分岐ポリエチレングリコール(4-arm PEG-SH) と光触媒エオジンYを添加し、照射により細胞を積層させる条件を検討した。(2) 光応答型細胞インクを積層することで高密度細胞構造体の形成を試みた。

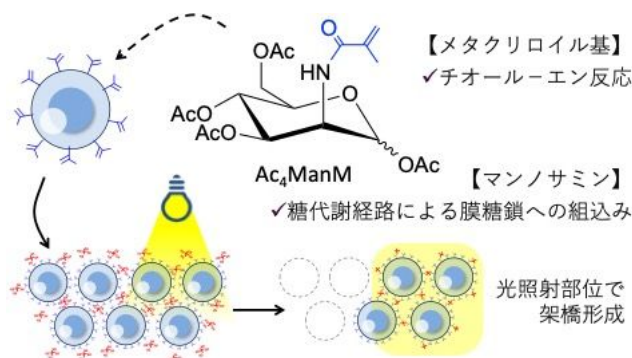


図1 ManMを用いた細胞構造化技術

【双性イオン性核酸送達キャリア】

グアニジル基は生体内のリボ核タンパクが核酸を保持するための駆動力の一端を担うことが知られている。Arg-MA も同じく側鎖末端にグアニジル基を持つことから、Arg-MA を重合することで分子全体は双性イオン性の構造をとりつつも核酸と複合化するキャリアの構成要素として応用できる可能性がある。本研究ではこの仮説検証を目的として、(1) Arg-MA 含有ポリマーの核酸保持能を評価した。また、(2) 双性イオン構造にすることによる細胞毒性軽減効果、および、(3) Arg-MA による細胞膜透過性を評価した。

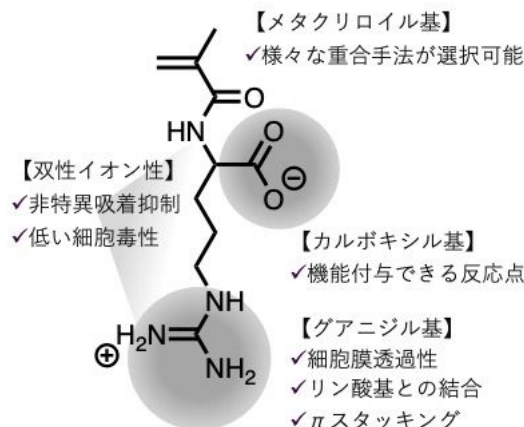


図2 Arg-MAの機能

3. 研究の方法

【光架橋型細胞バイオインク】

細胞への導入効率を亢進するため ManM のヒドロキシル基をアセチル化した Ac₄ManM を合成した。Ac₄ManM を添加した培地でマウス線維芽細胞株 L929 を培養することで、膜表面にメタクリロイル基を有する改変細胞を得た。この改変細胞を、4-arm PEG-SH とエオジン Y を加えたリン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁し、ここに 505 nm 可視光を照射することで細胞間架橋が形成されるか検証した。また、改変細胞を PKH67 (緑)もしくは PKH26 (赤)で膜染色し、これを交互に積層しながら光照射を繰り返すことで層状構造を形成した。

【双性イオン性核酸送達キャリア】

Arg-MA と 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) を可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により共重合することで Arg-MA 含有水溶性ポリマー(PMR)を合成した。(1)ポリマーと核酸の複合化能を評価するために、アガロースゲル電気泳動による遅延アッセイを行なった。また、線維芽細胞株(NIH3T3)を用いて、(2)ポリマーの細胞毒性と(3)細胞内取り込み挙動を評価した。

4. 研究成果

【光架橋型細胞バイオインク】

(1) 4-arm PEG-SH、エオジン Y を添加した PBS に改変細胞を懸濁した。ここに 10 分間の可視光照射を行なったところ、細胞凝集体が形成された。一方、4-arm PEG-SH、エオジン Y、光照射のいずれかの要素を欠いた条件では同様の細胞凝集体は形成されなかった。このことから、想定していた光応答性チオール・エン反応による細胞間架橋が形成できることが分かった。

(2) 上記の細胞懸濁液を遠心することで、高密度細胞懸濁液(>10⁷ cells/mL)を得た。この懸濁液に光を照射したところ、懸濁液表面に~100 μm の細胞層が形成された(図 3)。また Live/Dead 染色の結果、構造体内部の細胞は全て生存していた。このことから、糖鎖改変細胞を用いて高密度の細胞構造体が形成可能であることが分かった。

(3) 構造体のスケールアップを目指して、赤と緑 2 色の蛍光色素で標識した細胞を交互積層したところ、層構造を維持した細胞構造体が形成できた(図 4)。細胞積層法により、構造体のスケールアップと複数の細胞集団を複合化させた構造化が可能であることが分かった。

(4) 改変細胞を用いて立体的な細胞構造体ができることは分かったが、細胞と PEG のみでは力学強度が脆弱であった。今後、マトリックス成分の添加等で力学強度を補う方が必要である。

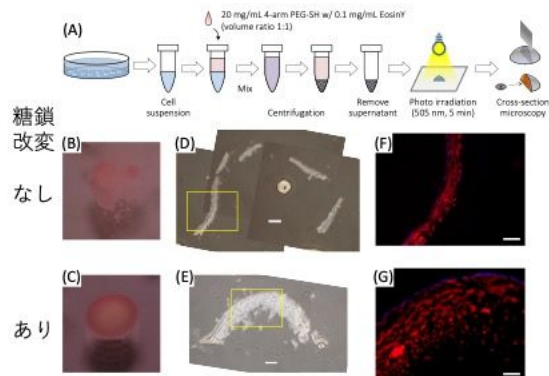


図3 改変細胞を用いた細胞構造化 (F, Gは生細胞を赤、死細胞を青で表示)

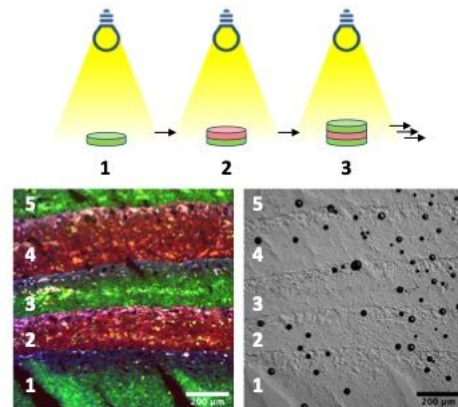


図4 改変細胞の積層化

【双性イオン性核酸送達キャリア】

(1) Arg-MA 含有水溶性ポリマー(PMR)と核酸の混合溶液をアガロースゲル電気泳動したところ(図 5)、核酸に対する PMR の相対濃度(N/P 比)の増加に伴って、核酸がウェル内に滞留するようになった。一方で Poly(MPC)では同様のウェル内の核酸滞留は起こらなかった。以上の結果から、Arg-MA は核酸と濃度依存的に相互作用していることが分かった。

(2) NIH3T3 に対する PMR の半数阻害濃度は 1 mg/mL であった。これは、同じく側鎖のグアニジル基を介して核酸と複合化するポリアルギニンの半数阻害濃度の<2%であった。このことから、PMR は双性イオン性構造によりグアニジル基に起因する細胞毒性を有意に低減



図5 Arg-MA含有ポリマーとDNAの複合化 (N/PはPMRのグアニジル基とDNAのリン酸基の比)

- であることが示唆される。
- (3) 蛍光標識した PMR を添加した PBS 中で細胞培養したところ、接触 15 分で細胞質内に PMR が取り込まれた(図 6)。また、取り込まれた PMR は細胞質に均一に分布した。この PMR の細胞内移行は 4°C 環境下でも同様に観察されたことから、PMR はエンドサイトーシスを介さずに細胞内に取り込まれることが示唆される。
- (4) Arg-MA 含有ポリマーはエンドサイトーシス非依存的な細胞取り込みを誘起し、さらに双性イオン性でありながら核酸保持能を持つことから、mRNA 送達キャリアの構成素子として有用であると考えられる。今後は、様々な組成の Arg-MA 含有ポリマーを合成し、細胞への遺伝子導入効率の高いポリマーをスクリーニングすることで、mRNA 送達キャリアのポリマー構造の最適化を進める必要がある。

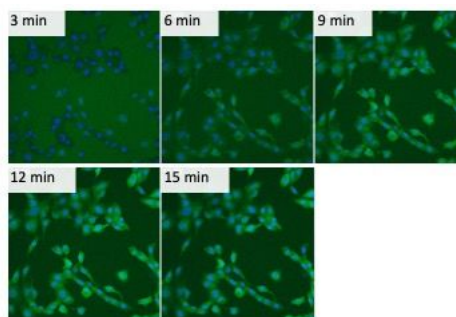


図6 PMRの細胞内取り込み

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大高晋之, 高橋功次, 清野 謙二郎, 岩崎泰彦
2. 発表標題 ポリリン酸エステルを用いた二相性骨粗鬆症治療薬の開発
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 Akihisa OTAKA, Tomoki YAMAGUCHI, Ryoya SAISHO, Toru HIRAGA, Yasuhiko IWASAKI
2. 発表標題 Bone targeting phospholipid polymers to solubilize lipophilic anticancer drugs
3. 学会等名 11th WORLD BIOMATERIALS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大高晋之, 廣田泰佑, 岩崎泰彦
2. 発表標題 光を用いて糖鎖改変細胞を立体積層する技術の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大高晋之, 岩崎泰彦
2. 発表標題 糖鎖改変細胞を用いた光応答性の細胞構造体構築
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Otaka, Yusuke Kambe, Ken Kuwahara, Takahiko Nakaoki, Mitsuru Sato, Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 Navigator bearing single-chain variable fragment switched beta 2-microglobulin methabolism to liver
3. 学会等名 2022 Hawaii - Joint Symposium - SFB + JSB (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口直樹、大高晋之、平野義明、山岡哲二
2. 発表標題 双性イオン性アルギニンメタクリルアミドを用いたmRNA送達キャリア
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口直樹・大高晋之・平野義明・山岡哲二
2. 発表標題 アルギニン側鎖を有する双性イオン性mRNA送達キャリア
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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