

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22680042

研究課題名（和文）“スマート”ナノファイバーを用いた多能性幹細胞の胚様体作製と分化誘導制御

研究課題名（英文） Smart nanofibers that control cell functions

研究代表者

荏原 充宏（EBARA MITSUHIRO）

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA 研究者

研究者番号：10452393

研究成果の概要（和文）：本研究では、外部刺激に応答してその構造を変化させる“スマート”高分子を用いて、“スマート”ナノファイバーネットを作製し、そのユニークな伸縮変化を利用した細胞のトラップと薬物の放出を同時に行うことで、細胞のマニピュレーションと機能制御を簡便かつ効率的に行う新規培養システムの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：We prepared smart nanofibers and demonstrate the ability to capture, encapsulate, and release cells or drugs by dynamically transforming the fibrous structure of the nanofibers into hydrogel-like structures by wrapping, swelling, and deswelling processes in response to alternations of external temperature.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2012年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	18,500,000	5,550,000	24,050,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノ材料、細胞・組織、再生医学、生体材料

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな細胞に分化する能力がある多能性幹細胞が注目を集めているが、その中でも人工多能性幹(iPS)細胞の樹立は再生医療の分野のみならず、創薬スクリーニングなどの研究にも大きなインパクトを与えた。一方で、その幹細胞の分化過程を高精度に制御する技術の確立は再生医療の鍵であり、実際に臨床応用で利用できる純度と形状を持った細胞塊（胚様体）や組織を得ることは難しい。

2. 研究の目的

そこで本研究課題は、多能性幹細胞の新たな分化誘導法として、温度や pH、光などの外部の刺激に応答してその性質を変える“スマート”高分子を用いてナノファイバーネットを作製し、細胞のトラップと分化誘導因子の放出を同時に行うことで、簡便な胚様体形成および効率的な分化誘導を行う新規培養システムの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 目的のナノファイバーネットの作製のため、細胞接着性や光架橋性など新たに機能付加可能な新規機能性“スマート”高分子を合

成する。特に本研究課題では温度応答性の PNIPAAm 誘導体をモノマーレベルから設計し、温度に対する応答性、細胞接着性、架橋性、溶媒親和性などの最適条件を明らかにする。

(2) ナノファイバーの形状を決めるパラメーターとして、溶媒の種類、ポリマーの濃度、電圧、噴出速度、電極間の距離などを検討する。これらの条件とナノファイバーネットの物性との相関を明らかにし、本研究の目的にあった最適の不織布を作製する。

(3) 細胞懸濁液にナノファイバーネットを加え、37°Cにてネットを収縮させることで細胞を捕捉・凝集させる。

(4) 薬物の放出

様々な分子量の薬物をナノファイバー内に含有し、温度に応答した薬物の放出を観察する。

4. 研究成果

平成 22 年度には、N-イソプロピルアクリルアミド(以下 NIPAAm と略す)と官能基を有する 2-カルボキシイソプロピルアクリルアミド(以下 CIPAAm と略す)の共重合体を用いて、電解紡糸法によってナノファイバーメッシュを作製した。さらに、CIPAAm のカルボキシル基を介して光架橋をするベンゾフェノン(BP)を導入することで、ナノファイバーメッシュを光架橋することに成功した。

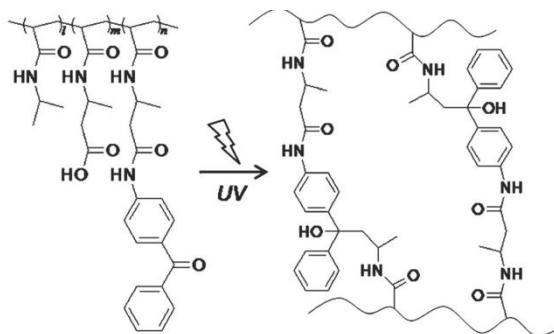


図 1. 新規温度応答性ナノファイバーの構造

平成 23 年度には、その機械的強度などの物性を評価するとともに、他の架橋法として熱架橋を試みた。平成 24 年度にはこのナノファイバーメッシュを用いて細胞の補足・放出効率を定量的に評価した。具体的には細胞をこのナノファイバーメッシュ上に播種し、温度を上昇させることで細胞をメッシュ内にトラップした。この際、ナノファイバーの径が機械的強度、収縮速度、細胞の補足効率などに与える影響を調べた。またナノファイバーの温度に応答したサイズ変化に関しては、原子間力顕微鏡を用いて調べた。また、温度変化を繰り返すことで、メッシュからの細胞

の放出にも成功した。通常、細胞をゲル内に封入する際、有毒なゲル化剤などの使用が懸念されるが、本提案メッシュを用いることで、細胞をメッシュ内に低侵襲に封入できるのみならず、外部刺激で放出させることも可能なため、様々な細胞マニピュレーションのツールとしての可能性が期待できる。同時に平成 24 年度にはこのファイバーからの薬物放出制御にも成功しており、内部に封入した細胞の分化誘導制御などにも本提案ファイバーが有用であることが強く示唆された。

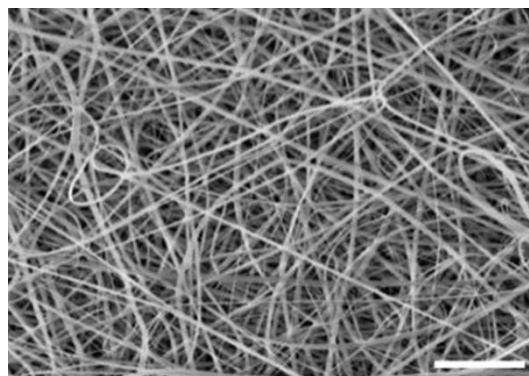


図 2. 作製したナノファイバーの電子顕微鏡写真 (bar:10um)

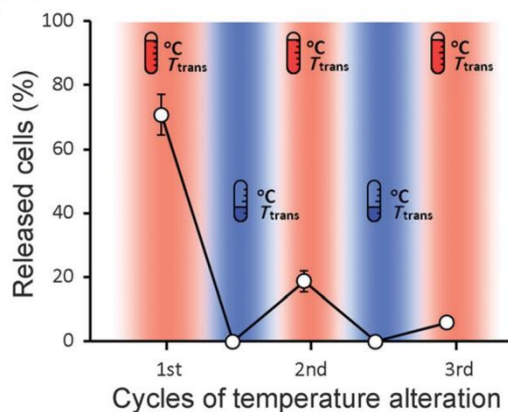


図 3. ファイバーを用いた細胞のキャッチ&リリース

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- ① Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, “A Smart Hyperthermia Nanofiber with Switchable Drug Release for Inducing Cancer Apoptosis.” *Advanced Functional Materials*, in press. 査読有
- ② M. Ebara, J. M. Hoffman, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, J. J. Lai “A photo-induced nanoparticle separation in microchannels via pH-sensitive surface traps.”

Langmuir, 29, 5388-5393 (2013). DOI: 10.1021/la400347r 査読有

③ M. Ebara, K. Uto, N. Idota, J. M. Hoffman, T. Aoyagi “Shape-memory surface with dynamically tunable nano-geometry activated by body heat.” Advanced Materials, 24, 273-278 (2012). DOI: 10.1002/adma.201102181 査読有

④ Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, “A smart nanofiber web that captures and release cells.” Angewandte Chemie International Edition, 51, 10537-10541 (2012). DOI:10.1002/anie.201204139 査読有

⑤ P. Techawanitchai, M. Ebara, N. Idota, T.-A. Asoh, A. Kikuchi, T. Aoyagi “Photo-switchable control of pH-responsive actuators via pH jump reaction.” Soft Matter, 8, 2844-2851 (2012). DOI:10.1039/C2SM07277G 査読有

⑥ P. Techawanitchai, M. Ebara, N. Idota, T. Aoyagi “Light-induced spatial control of pH-jump reaction at smart gel interface.” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 99, 53-59 (2012). DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.09.039 査読有

⑦ Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain, “Fabrication of dual-responsive polymer functionalized silica nanoparticles via a simple thiol-ene click chemistry.” Polymer Chemistry, 3, 2545-2550 (2012). DOI:10.1039/C2PY20333B 査読有

⑧ P. Techawanitchai, N. Idota, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi “A smart hydrogel-based time bomb triggers drug release mediated by pH-jump reaction.” Science and Technology of Advanced Materials, 13, 064203 (2012). DOI:10.1088/1468-6996/13/6/064202 査読有

⑨ Y.-J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi “Temperature-responsive electrospun nanofibers for “on-off” controlled dextran release.” Science and Technology of Advanced Materials, 13, 064203 (2012). DOI:0.1088/1468-6996/13/6/064203 査読有

⑩ Y. Kotsuchibashi, Y. Zhang, M. Ahmed, M. Ebara, T. Aoyagi, R. Narain, “Fabrication of FITC-doped silica nanoparticles and study of their cellular uptake in the presence of lectins.” Journal of Biomedical Materials Research: Part A, accepted. DOI:10.1088/1468-6996/13/6/064207 査読有

⑪ N. Idota, M. Ebara, Y. Kotsuchibashi, R. Narain, T. Aoyagi “Novel

temperature-responsive polymer brushes with carbohydrate residues facilitate selective adhesion and collection of hepatocytes.” Science and Technology of Advanced Materials, 13, 064206 (2012). DOI:0.1088/1468-6996/13/6/064206 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① 荻原充宏, 金榮鎮, 青柳隆夫 : “自己発熱に応答して薬物を放出するハイパーサーミアナノファイバーの作製” 第 62 回高分子学会年次大会、2013/05/29-31, 京都。

② M. Ebara, Y. Kim, T. Aoyagi : “Smart Nanofiber Webs for “On-off” Release of Cells and Drugs” 2013 Annual Meeting of the Society For Biomaterials, 2013/04/10-13, Boston, USA.

③ Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “A Smart Hyperthermia Nanofiber with Controlled Drug Release for Improved Cancer Therapy” 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba, 2013/03/19-22, Japan.

④ Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “Smart nanofibers for “on-off” switchable release of cell/drug” つくば医工連携フォーラム 2013 医工連携の Hub 化～つくば、2013/01/29、つくば。

⑤ 金榮鎮, 荻原充宏, 青柳隆夫 : “On-demand Encapsulation and Release of Cells using On-off Switchable Fibrous Hydrogels” 第 24 回高分子ゲル研究討論会、2013/01/16-17、東京。

⑥ 金榮鎮, 荻原充宏, 青柳隆夫 : “温度応答性ナノファイバーを用いた薬物の “On-Off” 放出制御” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012/11/26-27、仙台。

⑦ T. Aoyagi, Y. Kim, M. Ebara : “Smart Biomaterials Design for Nano-biotechnology” 6th International Workshop on Advanced Materials Science, 2012/10/30 - 2012/11/02, Ha Long City, Vietnam.

⑧ Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “A New Class of Smart Fibrous-Hydrogel that Cell Capture and Release” 7th International Symposium on Stimuli-Responsive Materials, 2012/10/21-23, Santa Rosa, USA.

⑨ Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi : “Thermo-crosslinkable and temperature-responsive fibrous hydrogel via electrospinning for “on-off” controlled dextran release” ゲルワークショップイン名古屋, 2012/09/21-22

⑩ 荻原充宏, 青柳隆夫 : “光架橋点を有するスマートナノファイバーの設計と細胞のキャッチ&リリース” 第 61 回高分子討論会、

2012/09/19-21、名古屋.

⑪ Y. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi :
“Photo-crosslinkable and
Thermo-Responsive Nanofiber Webs for
‘On-Off’ Switches of Cell
Capture/Release” NanoBio Seattle2012,
2012/07/23-26, Seattle, USA.

⑫ 金榮鎮, 荻原充宏, 青柳隆夫 : “Design
of photo-crosslinkable and
thermo-responsive nanofiber mats for cell
manipulations” 第 61 回高分子学会年次大
会、2012/05/29-31、横浜.

[図書] (計 9 件)

① Giancarlo Forte, Stefania Pagliari,
Francesca Pagliari, Mitsuhiro Ebara, Paolo
Di Nardo, Takao Aoyagi “Toward the
generation of patient-specific patches for
cardiac repair.” Stem Cell Reviews and
Reports, in press
DOI:10.1007/s12015-011-9325-8

② 荻原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫 ‘生分解
性高分子’ 再生医療叢書 2 組織工学、岡
野光夫、大和雅之編集、朝倉書店、1-24 (2013).
分担執筆

③ 荻原充宏, 齋藤充弘, ‘免疫反応を制御可
能な未来型バイオマテリアルの設計—
Immunobioengineering’ — Drug Delivery
System、日本 DDS 学会、28-2, 135-148
(2013).

④ 荻原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫 ‘基材の
構造力学的性質による細胞機能の制御’ 特
集 細胞接着の制御 生体の科学、64(3),
194-198 (2013).

⑤ Kohsaku Kawakami and Mitsuhiro
Ebara. “Chapter 10 Nanotechnology in
Drug Delivery Systems” Manipulation of
Nanoscale Materials, 242-258, (2012).
DOI:10.1039/9781849735124-00242

⑥ 荻原充宏, 青柳隆夫, ‘スマートバイオマ
テリアルの応用’ — ケミカルエンジニアリ
ング、化学工業社、57(4), 31-36 (2012).

⑦ Kohsaku Kawakami, Mitsuhiro Ebara,
Hironori Izawa, Noelia M.
Sanchez-Ballester, Jonathan P. Hill, and
Katsuhiko Ariga. “Supramolecular
approaches for drug development” Current
Medicinal Chemistry, 19(15), 2388-2398
(2012). ISSN: 0929-8673

⑧ 荻原充宏, ‘スマートゲル表面’ 特集スマ
ートゲルの最新動向— 機能材料、シーエム
シー出版、32(3), 6-12 (2012).

⑨ 荻原充宏, ‘形状記憶インターフェイスを
用いた細胞運命の時間・空間操作’ Colloid
& Interface Communication、日本化学会、
36(4), 23-24(2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

①
名称: アジド基又はアルキン基を有するイソ
プロピルアクリルアミド誘導体およびその
重合体

発明者: ジョンホフマン、青柳隆夫、荻原充
宏

権利者: 物質材料研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2011-067969

出願年月日: 2011 年 3 月 25 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/smartbiomaterials/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 充宏 (EBARA MITSUHIRO)

物質材料研究機構・国際ナノアーキテクトニ
クス研究拠点・MANA 研究者

研究者番号: 10452393

(2) 研究分担者

(なし)

(3) 連携研究者

(なし)