

人工材料(有機)

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所有機生体材料学分野

田村 篤志

Atsushi TAMURA



1. はじめに

人工材料による臓器の機能的代替物である人工臓器の設計において、合成高分子を中心とした有機材料が必須の材料であることは周知のとおりである。高分子材料を用いた人工臓器は長年研究開発が進められてきており、人工血管、人工透析用のフォローファイバー、歯科用レジン、金属製材料の表面コーティングなど様々な製品が開発され今日の医療に貢献している。現在も人工臓器のための高分子材料に関する研究は進められているが、一方で細胞を用いて臓器の機能的修復を行う再生医療・組織工学に対する期待度は非常に高い。特に、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立した山中伸弥教授(京都大学)のノーベル生理学・医学賞の受賞や、高橋政代プロジェクトリーダー(理化学研究所)を中心としたiPS由来細胞を用いた世界初の臨床応用などにより一般注目度、認知度も高い研究分野である。

再生医療に対する期待度が高まった背景には細胞生物学や関連分野の発展があるが、その実現には医学、細胞生物学、工学など様々な分野の要素技術が必要となる。再生医療に関連する技術の中でも、高分子材料は細胞を移植するためのスキヤフォールドや、移植用細胞の培養基材などとして研究開発が進められている。高分子バイオマテリアルに関する研究動向を俯瞰してみると、人工臓器に関する研究から再生医療・組織工学に関連した研究へと変遷を遂げていることは明らかである。そこで本稿では、再生医療やそれに関連した細胞培養技術の基盤となる高分子材料に関する近年の研究動向について概説する。

■ 著者連絡先

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所有機生体材料学分野
(〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10)

E-mail. tamura.org@tmd.ac.jp

2. 多能性細胞の培養における高分子基材の利用

多能性細胞である胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞は分化能を維持したまま無限に増殖できることから、再生医療で用いられる細胞ソースとして最も期待されている細胞である。ヒト由来多能性細胞の培養ではマウス胚性線維芽細胞(MEF)を用いたフィーダー培養が未分化状態を維持するための培養法として広く行われている。しかしながら、フィーダー細胞を用いることによる操作の煩雑化や異種細胞の混入に対する懸念から、フィーダー細胞を使用しない培養法が望まれている。これまでもフィーダーフリーな培養方法が検討されており、細胞の接着を向上させる目的でMatrigel, laminin, E-cadherinなどのタンパク質をコートしたディッシュ上でヒトES細胞の接着と未分化状態を維持したフィーダーフリー培養が報告されている^{1),2)}。

一方、培養基材表面に合成高分子を固定することで多能性細胞の接着、増殖、未分化状態の維持が可能であることが報告されている。図1はこれまでに報告された多能性細胞の培養を可能とする合成高分子表面の一例である。Villa-Diazらはポリスチレン上に数種類のポリマーを固定し、ヒトES細胞の接着、増殖、未分化状態の維持について検討した結果、図1Aの化学式で表されるpoly[2-(methacryloyloxy) ethyl dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide] (PMEDSAH)が優れた接着性を示すことを報告している³⁾。また、Meiらはコンビナトリアルケミストリーとハイスループットスクリーニングの手法により約500種類のポリマー表面を作成し、表面の粗さ、濡れ性、弾性率、細胞塊形成を網羅的に評価した⁴⁾。その結果、図1Bに示すmonomer 15とmonomer Aを70:30の比率で調製した表面上で長期間のフィーダーフリー培養が可能であることを報告した。また近年、Zhangらは同様

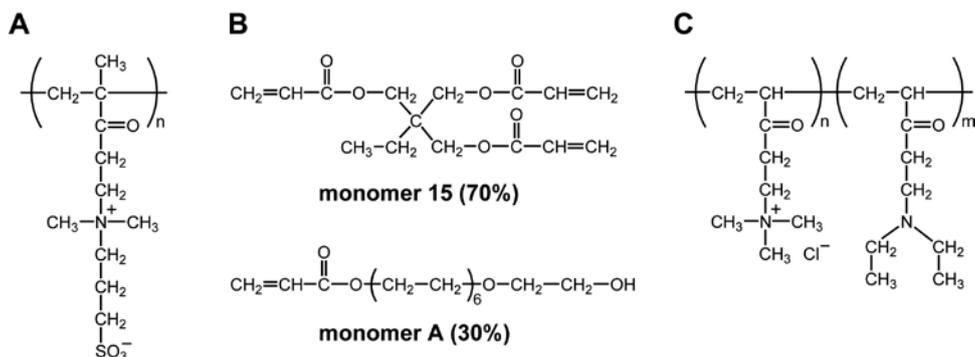


図1 多能性細胞の接着，増殖，未分化状態を維持した培養に有効な合成高分子表面の構造式

の網羅的手法により約600種類の温度応答性ヒドロゲルをスクリーニングし，図1Cに示す2-(acryloyloxyethyl) trimethylammonium chlorideと2-(diethylamino) ethyl acrylateの共重合体からなるヒドロゲル上でヒトES細胞の培養について報告している⁵⁾。本ヒドロゲルは温度応答性を示すといった特徴を有するが，Okanoら東京女子医科大学の研究グループは温度応答性表面を利用することで細胞の接着-脱着を温度変化により制御できることを報告している⁶⁾。本ヒドロゲル上で培養したES細胞も温度を15℃に下げることにより基材表面から回収することが可能であり，酵素や化学物質による細胞回収による細胞へのダメージを回避できると述べている。また，Corning Inc.はbone sialoprotein (BSP)，laminin，vitronectin，fibronectinといった細胞外マトリックスに由来する細胞接着ドメインのペプチド断片を2-hydroxyethyl methacrylate，2-carboxyethyl acrylate，tetra(ethylene glycol) dimethacrylateからなるポリマー表面上に固定化し，ヒトES細胞の増殖，未分化状態，心筋細胞への分化について検討を行った⁷⁾。特に，BSPとvitronectin由来ペプチドを固定した表面上で長期間増殖性と未分化状態を維持できることを明らかとした。

ヒト多能性細胞の接着効率はlamininをはじめとする天然由来基質が優れており，利用例も多いが，製品の安定供給や製造コストという点では合成高分子を用いた培養基材が優れている。現段階では多能性細胞の培養を可能とする高分子材料の因子や物性については完全には明らかにはなっていないことから，材料の物性ととの相関性に関する知見や天然由来基質を凌駕する材料の開発が望まれる。

3. 培養基材の物性が細胞分化へ与える影響

2006年にDischerの研究グループは弾性率の異なるポリアクリルアミドゲル上で間葉系幹細胞を培養すると，基材

の弾性率に応じて分化系列が変化することを報告した⁸⁾。本結果は，脂肪などの柔組織と骨などの硬組織を形成する過程で細胞が足場の機械的性質を認識し，分化の方向性を決定していることを示唆している。近年，Discherの研究グループは，細胞核内に局在し核膜構造の維持と転写の調節を行うlamin Aの発現量が組織の弾性率と相関することを示し，足場の弾性率がlamin Aの発現を規定する上流因子であることを明らかとした⁹⁾。すなわち，幹細胞が弾性率の低い足場上にあるときはlamin Aの発現量は低く脂肪など柔組織への分化が有意となるが，弾性率の高い足場上ではlamin Aの発現量が高く，骨などの硬組織へと分化する。本研究は，足場の弾性率による幹細胞の分化に対し細胞生物学的なメカニズムを実証した研究であるが，材料設計や評価において基材の性質がどのように細胞の挙動に影響するか分子生物学的に理解することは重要な視点の一つである。

Trappmannらは弾性率が0.1 kPaから2.3 MPaのポリジメチルシロキサン (PDMS) とポリアクリルアミドゲルを調製し，コラーゲンを共有結合的に表面修飾した後にヒト表皮幹細胞の培養を行った¹⁰⁾。PDMS表面上ではヒト表皮角化細胞の面積や分化効率が弾性率により変化することはなかったが，ポリアクリルアミドゲル上では弾性率の低い表面上で細胞の接着面積が小さく進展しない状態であり，分化マーカーのタンパク質発現量が増加する傾向が認められた。ヒト間葉系幹細胞を培養した場合も同様な材質による違いが認められており，PDMS上では弾性率の影響はなかったが，弾性率の低いポリアクリルアミドゲル上では脂肪細胞への分化効率が上昇した。走査型電子顕微鏡観察の結果，弾性率の低いポリアクリルアミドゲル中には大きな空孔が開いており，細胞接着性のコラーゲンの結合点間距離が離れていることが予想された。すなわち，細胞が接着する基材表面とその間に介在する細胞外マトリックス

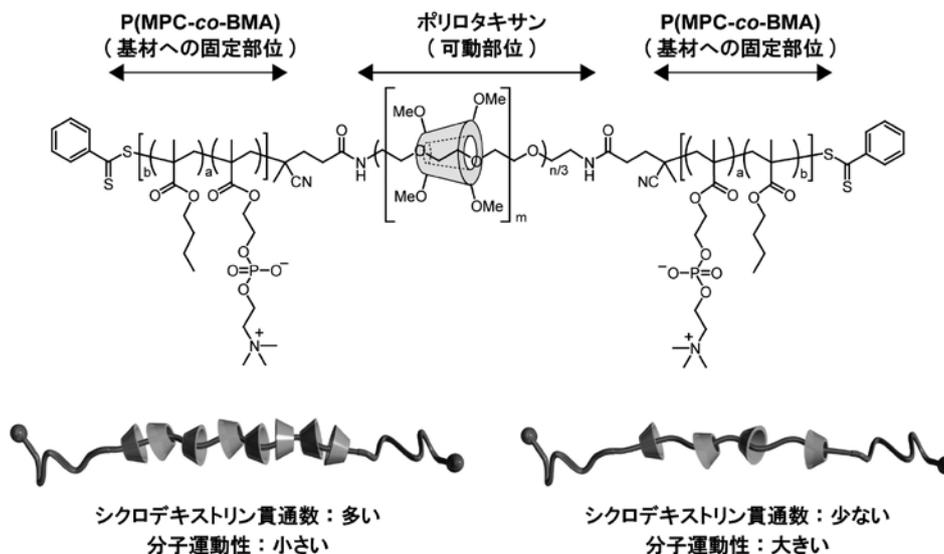


図2 分子運動性を有するポリロタキサン含有トリブロック共重合体の化学構造

が基材の材質によって変化することを本研究では示しており、基材の弾性率で一義的に幹細胞の分化が規定されているわけではないことを示唆している。

Khetanらは、光架橋可能メタクリロイル基を有するヒアルロン酸をマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)により切断されるペプチドを用いた二重架橋ゲル内で、ヒト間葉系幹細胞の培養を行った際の分化系列について検討した¹¹⁾。本ゲル内で培養した細胞は、培養時間の経過とともに自らが産生するMMPによりゲルの架橋点を分解し、細胞内を動き回る自由度が増加する設計である。照射による2段階目の架橋を行うタイミングを変化させた際の細胞の形状と分化を調べた。培養直後に照射により架橋した場合はゲル内での動きが制限され細胞は丸く伸展しない形状となったが、光未照射の場合は細胞が伸展した形状となった。培養7日後から骨分化培地と脂肪分化培地の混合培地で培養した結果、初期に光架橋したゲル内では細胞は脂肪へと分化し、光架橋を施していないゲル内の細胞は骨へと分化する傾向が認められた。培養7日後に照射を行うとゲル内の細胞形状に変化はなかったが、分化の方向性は逆転し骨細胞から脂肪細胞へと分化の方向が変化することが明らかとなった。本研究では二次元平面で培養した場合とは異なり、三次元ゲル内で培養した際は細胞の形状やゲルの力学的特性だけでなく、ゲルの分解特性が分化に影響することを示している。

このように基材の力学特性や分解性など様々なパラメーターが組織幹細胞の分化に影響することが明らかとされ現在も議論が続いている。上述以外にも表面の物性として表面自由エネルギー、電荷、粗さなど様々なパラメーターが

存在し、細胞の接着や生体応答に影響することは古くから議論されている。Yuiらの研究グループは基材表面の分子運動性(粘弾性)が細胞の形状や分化に及ぼす影響を検討した。運動性の異なる表面を構築するための手段として、線状高分子上に多数の環状分子シクロデキストリンが連なったネックレス状の超分子ポリロタキサンを一成分子とするトリブロック共重合体を設計した(図2)¹²⁾。ポリロタキサン中に貫通する環状分子(シクロデキストリン)の貫通数を変えることにより環状分子の可動域が異なるため運動性が変化する(図2)。水晶振動子エネルギー散逸量(QCM-D)によりブロック共重合体表面の運動性を評価すると、環状分子貫通数の少ない場合に大きな分子運動性を示した。本表面上で線維芽細胞の培養を行った結果、細胞の伸展が表面の分子運動性と相関することを明らかとした¹²⁾。また、分子運動性の異なる表面上でマウス間葉系幹細胞の分化特性について評価した結果、運動性の大きい表面上では脂肪細胞への分化が促進され、運動性の小さい表面上では骨細胞へと分化することが明らかとなった¹³⁾。運動性の大きい表面上ではRho結合キナーゼ(ROCK)の活性が低下しており、分化系列の決定メカニズムは過去の研究と現象的には共通していることが明らかとなった¹⁴⁾。これまで様々な検討がされている弾性率だけでなく、水和表面の分子運動性が幹細胞の分化系列を規定するパラメーターとなり得ることを示している。

4. おわりに

本稿では、再生医療での利用が期待されている多能性幹細胞や組織幹細胞の培養のための高分子基材の設計やその

影響について近年の研究を紹介した。本研究領域はバイオマテリアルとしての高分子材料の中心的内容であり、本稿では紹介しきれなかった研究が世界中で展開されている。また、本稿では誌面の都合で二次元平面上での培養に関して限局して紹介したが、細胞を使った三次元的な組織の構築に関しても精力的に研究が進められており再生医療としての実現が期待されている。古くから人工臓器として利用されてきた高分子材料であるが、再生医療やその関連分野でも様々な形で高分子材料の利用がブレイクスルーとなることが期待される。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al: Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**: 971-4, 2001
- 2) Nagaoka M, Koshimizu U, Yuasa S, et al: E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS ONE* **1**: e15, 2006
- 3) Villa-Diaz LG, Nandivada H, Ding J, et al: Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **28**: 581-3, 2010
- 4) Mei Y, Saha K, Bogatyrev SR, et al: Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. *Nat Mater* **9**: 768-78, 2010
- 5) Zhang R, Mjoseng HK, Hove MA, et al: A thermo-responsive and chemically defined hydrogel for long-term culture of human embryonic stem cells. *Nat Commun* **4**: 1335, 2013
- 6) Yamada N, Okano T, Sakai H, et al: Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem, Rapid Commun* **11**: 571-6, 1990
- 7) Melkounian Z, Weber JL, Weber DM, et al: Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **28**: 606-10, 2010
- 8) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**: 677-89, 2006
- 9) Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, et al: Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**: 1240104, 2013.
- 10) Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, et al: Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat Mater* **11**: 642-9, 2012
- 11) Khetan S, Guvendiren M, Legant WR, et al: Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nat Mater* **12**: 458-65, 2013
- 12) Seo JH, Kakinoki S, Inoue Y, et al: The significance of hydrated surface molecular mobility in the control of the morphology of adhering fibroblasts. *Biomaterials* **34**: 3206-14, 2013
- 13) Seo JH, Kakinoki S, Yamaoka T, et al: Directing stem cell differentiation by changing the molecular mobility of supramolecular surfaces. *Adv Healthc Mater* **4**: 215-22, 2015
- 14) McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al: Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* **6**: 483-95, 2004