

(Mw~90000) : Sigma-Aldrich

- ・ 過ヨウ素酸ナトリウム Sodium periodate (M=213.89) : 和光純薬
- ・ エチレングリコール Ethylene glycol (M=62.07) : 和光純薬
- ・ ゼラチン Gelatin from porcine skin typeA : Sigma-Aldrich
- ・ 1-エチル-3-カルボジイミド 1-ethyl-3-carbodiimido (M=191.7) : 和光純薬
- ・ 1-hydroxybenzotriazole (M=135.12) : 和光純薬
- ・ アジポヒドラジド Adipohydrazide (M=174.20) : 和光純薬
- ・ ジメチルスルホキシド Dimethyl sulfoxide (M=78.14) : 和光純薬
- ・ 塩酸 : 和光純薬
- ・ 水酸化ナトリウム : 和光純薬
- ・ 塩化ナトリウム sodium chloride (NaCl) (M=58.44) : 和光純薬
- ・ エタノール ethanol (M=46.07) : 和光純薬
- ・ トリニトロベンゼンスルホン酸 : 和光純薬
- ・ t-BC : 和光純薬

[装置]

- ・ 透析膜 MWCO 6-8000 : ThermoFisher
- ・ 凍結乾燥機 : EYELA , FDU-1200
- ・ 紫外可視光吸光度計 UVmini1240 : SHIMAZU ,
- ・ ダブルシリンジ : ニプロ
- ・ 物性試験機 Texture analyzer : EKO
- ・ 走査型電子顕微鏡 Miniscope : HITACHI

1.2 実験手順

1.2.1 CMC-CHOの合成 (Fig. 1)

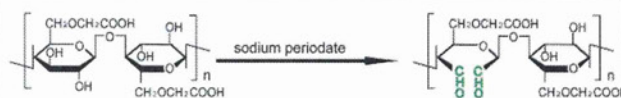


Fig. 1 CMC-CHOの合成スキーム

1) カルボキシメチルセルロース (CMC)の溶解

300 mlナスフラスコに1.5 gのCMCを加え、150 mlのmilliQ水で常温で1晩攪拌した。

2) 過ヨウ素酸ナトリウム溶液の滴下による開環反応

過ヨウ素酸ナトリウムを0.8038 g (1等量)を10 mlのmilliQ水に溶解させ、これをフラスコに滴下し、加えた。遮光のため、アルミホイルでフラスコを包み、2時間攪拌を行った。2時間後、未反応物除去のためにエチレングリコール 0.2 mlを加え、15分攪拌した。

3) 透析

MWCO=6-8000の透析膜で7日間透析を行った。(1日2回透析水を交換した)

4) 凍結乾燥

溶液を分注したのち凍結乾燥機を用いて、7日間凍結乾燥を行った。

5) NMRでの測定

核磁気共鳴装置を用いて¹HNMRスペクトルを測った。

6) CMC-CHOの保存

4 °Cのフリーザーで保存した。

1.2.2 Gelatin-ADHの合成 (Fig. 2)

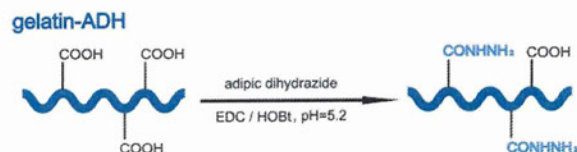


Fig. 2 Gelatin-ADHの合成スキーム

1) Gelatinの溶解

300 mlナスフラスコに1.0034 gのGelatin type-Aを加え、100 mlのmilliQ水で1晩攪拌して溶解させた。

2) ADHとSchiff-base reaction

Gelatin溶液にアジポアルデヒド1.41718 gを入れ、透明になるまで1時間攪拌した。

3) EDC試薬による反応

1時間後、NaOH, HClを用いて、pHを7程度に調整し、HOBt溶液 (HOBt 0.15 gにDMSO 1.4 ml, milliQ 1.0 mlを混合)をパスツールピペットで全量滴下した。その後、同様にEDC溶液 (EDC 0.15 gにDMSO 0.6 ml, H₂O 0.6 mlを混合)をパスツールピペットで全量滴下し、pHを5~6の間に調整した。(以後、4時間、30分おきにpH調整を行った)さらに、1晩攪拌を行った。

4) 透析

翌日から、透析膜 (MWCO=6-8000)で7日間透析を行った。

5) 凍結乾燥

溶液を分注したのち凍結乾燥機を用いて、7日間凍結乾燥を行った。

6) Gelatin-ADHの溶解

凍結乾燥をしたものを5 wt%のNaCl溶液に溶かした。(Gelatin-ADH濃度5-10 mg/ml)

7) エタノール再沈殿

Ethanol 1 L中にNaClに溶解したGelatin-ADH溶液を攪拌しながら滴下し、Gelatin-ADHを再沈殿させた。30分攪拌させたのち、これを遠心分離機で2500回転、4分間遠心分離することでGelatin-ADH再沈殿を回収した。

8) 透析

回収したGelatin-ADHを100 mlのmilliQ水に加え2時間攪拌及び溶解したのち、再度、7日間透析を行った。

9) 濾過

透析後 (透析開始7日目)、ろ紙による沈殿の濾過を行った。

10) 凍結乾燥

50 ml遠心管に移し、7日間凍結乾燥を行った。

11) NMRでの測定

核磁気共鳴装置を用いて¹HNMRスペクトルを測った。

12) Gelatin-ADHの保存

4°Cのフリーザーで保存した。

13) TNBS溶液の調整

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 63.06 mgを1 mlのmilliQ水に溶解し5 wt%のTNBS溶液 (179.57 mM)を作製した。この5 wt%のTNBS溶液200 mlを800 mlのmilliQ水に溶解し、1 wt%のTNBS溶液を作製し、さらに、この1 wt%のTNBS溶液200 mlを9.8 mlのmilliQ水に加え、0.02 wt%のTNBS溶液 (0.72 mM)を作製した。

14) t-BC溶液の調整

t-BC 132.16 mgを10 mlのmilliQに加える (100 mM)。この100 mMの t-BC 溶液0.1 mlを9.9mlのmilliQ水に溶解し、1 mMのt-BC溶液を作製した。

15) Gelatin溶液の調整

Gelatin 40 mgを2 mlのmilliQ水に溶解し、2 wt%のGelatin溶液を作製した。

16) Gelatin-ADH溶液の調整

Gelatin-ADH 40mgを2 mlのmilliQ水に溶解し、2 wt%のGelatin-ADH溶液を作製した。

17) サンプルの調整

24wellプレートにt-BC溶液100 wt%、50 wt%、25 wt%、12.5 wt%、6.3 wt%、3.2 wt%、1.0 wt%、0.5 wt%、0.25 wt%、0.125 wt%、0.063 wt%、0.032 wt%をそれぞれのwellに1 mlずつ加えた。同様に、Gelatin溶液および

Gelatin-ADH溶液においても、0.6 wt%、0.5 wt%、0.4 wt%、0.25 wt%、0.2 wt%、0.125 wt%、0.1 wt%、0.062 wt%、0.05 wt%をそれぞれのwellに1 mlずつ加えた。

18) TNBS試薬との反応

それぞれのwellにTNBS溶液を1 mlずつ加え、37°Cのインキュベータで半日間、反応させた。

19) 吸光度測定

334 nmの吸光波長で吸光度測定を行った。この時、Gelatin-ADH溶液は同じ濃度のGelatin溶液を0点補正に用いた。

1.2.3 Gelatin-ADHとCMC-CHOのゲル化 (Fig. 3)

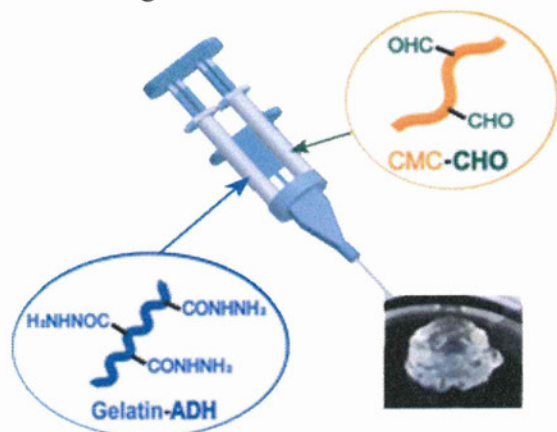


Fig. 3 ダブルシリンジを用いたゲル化

1) Gelatin-ADH, CMC-CHOの溶解

Gelatin-ADHを2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%の濃度になるようPBSに溶解した。同様にCMC-CHOを2 wt%、4 wt%、6 wt%の濃度になるようにPBSに溶解した。

2) Gelatin-ADHとCMC-CHOのゲル化

これら2つの原料をGelatin-ADH 2.5 wt% - CMC-CHO 2.0 wt%、Gelatin-ADH 5.0 wt% - CMC-CHO 4.0 wt%、Gelatin-ADH 7.5 wt% - CMC-CHO 6.0 wt%の組み合わせでダブルシリンジを使ってゲル化させた。

3) Gelatin-CMCハイドロゲルのヤング率評

価

得られた3種類の濃度のGelatin-CMCハイドロゲルの破壊強度を物性試験機により測定し、ヤング率を評価した。

1.2.4 Gelatin-CMCハイドロゲルの孔径評価

1) Gelatin-CMCハイドロゲルの凍結乾燥

作製した3種類の濃度のGelatin-CMCハイドロゲルを液体窒素で急冷させ、凍結乾燥を行った。

2) SEMによる観察

得られた凍結乾燥ゲルの切片を切断し走査型顕微鏡によりゲルの孔径を評価した。

1.2.5 Gelatin- CMCハイドロゲルの生分解性評価

1) Gelatin- CMCハイドロゲルの分解評価

作製した3種類の濃度のGelatin-CMCハイドロゲルを培養培地中に浸漬させ、ゲル重量から生分解性を評価した。

2.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- ・ ヒト臍帯由来血管内皮細胞
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地 EBM-2・添加因子セット：三光純薬
- ・ リン酸緩衝生理食塩水 Phosphate Buffered Saline：GIBCO.
- ・ フルオロセインジアセテート fluorescent diacetate：和光純薬
- ・ 臭化エチジウム ethidium bromide：和光純薬
- ・ ローダミン Rhodamine:
- ・ DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole：Sigma Aldrich

[装置]

- ・ 位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.

- ・ クリーンベンチ：三洋電機
- ・ 遠心分離機：三洋電機製
- ・ インキュベータ：三洋電機製
- ・ 超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10)：MILLIPORE
- ・ ダブルシリンジ：ニプロ
- ・ 48wellプレート
- ・ スパッタデポジション装置 CFS-4ES-231：Shibaura Electec.
- ・ ポテンシオスタット／ガルバノスタットHA-151：Hokuto denko.
- ・ Ag/AgCl参照電極#2080A：HORIBA.

2.2 実験手順

2.2.1 ハイドロゲル原料の細胞毒性評価

1) GFP-HUVEC播種

GFP-HUVECを48wellプレートに 1×10^4 cells/dishで播種し、1日間培養した。

2) CMC-CHO, Gelatin-ADH溶液の調整

凍結乾燥したCMC-CHO、Gelatin-ADHをPBSでCMC-CHO 2.0 wt%、4.0 wt%、6.0 wt%、Gelatin-ADH 2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%となるように希釈した。

3) CMC-CHO, Gelatin-ADHの混濁

溶解したゲル溶液(CMC-CHO 2.0 wt%、4.0 wt%、6.0 wt%、Gelatin-ADH 2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%)をそれぞれwell内に0.5 mlずつ加え、CO₂ インキュベータ内で培養を行った。

4) 臭化エチジウムによる死細胞染色

臭化エチジウムによって死細胞染色を行った。

2.2.2 CMC-Gelatinハイドロゲルの細胞接着評価

1) CMC-CHO, Gelatin-ADH溶液の調整

凍結乾燥したCMC-CHO、Gelatin-ADHをPBSでCMC-CHO 2.0 wt%、4.0 wt%、6.0

wt%、Gelatin-ADH 2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%となるように希釈した。

2) CMC-CHO, Gelatin-ADHゲルの作製

溶解した2液をダブルシリンジを用いて混合することでゲル化させ、φ35 mm dishをコーティングした。

3) GFP-HUVEC播種

GFP-HUVECを 3×10^4 cells/dishで播種した。

4) 生/死細胞染色

フルオロセインジアセテートと臭化エチジウムによって生/死細胞染色を行った。

5) 細胞接着性の観察

1日おきに観察を行った。(培地交換は24 hごとに行い、PBSで1回washしたのち、EBM-1を2 mlずつ加えた)

2.2.3 CMC-Gelatinハイドロゲルの血管新生評価

1) CMC-CHO, Gelatin-ADH溶液の調整

凍結乾燥したCMC-CHO、Gelatin-ADHをPBSでCMC-CHO 4.0 wt%、Gelatin-ADH 5.0 wt%となるように希釈した。

2) CMC-Gelatinハイドロゲル内への包埋

GFP-HUVECを 1×10^5 cells/mlで混合したGelatin-ADH溶液とCMC-CHO溶液をダブルシリンジを用いて混合することでゲル化させた。

3) 細胞増殖の観察

2日おきに観察を行った。(培地交換は24 hごとに行い、PBSで1回washしたのち、EBM-1を2 mlずつ加えた)

4) 組織の固定

培養7日目にサンプルの培地を捨て、基盤をPBS-で洗浄し、2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒドPBS-溶液中に室温で1時間浸漬させた後、PBS-で洗浄した。

2.2.3 電気化学を用いた細胞転写 (Fig. 4)

1) 基板洗浄

ガラス基板を25%アンモニア水：30%過酸化水素水：純水=1：1：4の沸騰水溶液に5分間浸漬させ、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

2) Au/Cr層のスパッタリング

Au/Cr層のスパッタリングを行った。(出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCr：1分間、Au：2分間)

3) 金表面へのRGDペプチドの修飾

RGDペプチドを表面に修飾するために、純水を用いて1.0 mMに希釈したRGDペプチド溶液に、予めアセトンで洗浄した金ガラス基板をそれぞれ一晩浸漬させた後、純水で洗浄した。更にクリーンベンチ内で70%エタノール内に5分間浸漬を二回行い、滅菌した純水でよくすすいだ。

4) 細胞播種

5×10^5 cells/mlの細胞懸濁液1 mlを金ガラス基板上に垂らし、インキュベータ内で1日間培養を行った。

5) ハイドロゲルの作製

培養後、基板上的細胞混濁液を吸い取り、すぐにPDMSで作った囲いをガラス基板にセットし、ダブルシリンジを用いて、HA-CHO 2 wt%、Gelatin-ADH 5 wt%の化学架橋ハイドロゲルを作製した。

6) 負電位印加

対極に白金、参照極に銀-塩化銀電極を接続し、この金ガラス基板にポテンシオスタットを用いて-1.0 Vの負電位を5分間印加後、ゲルをゆっくり金ガラス基板からはがし、φ35 mm dishに培養液を加え培養した。

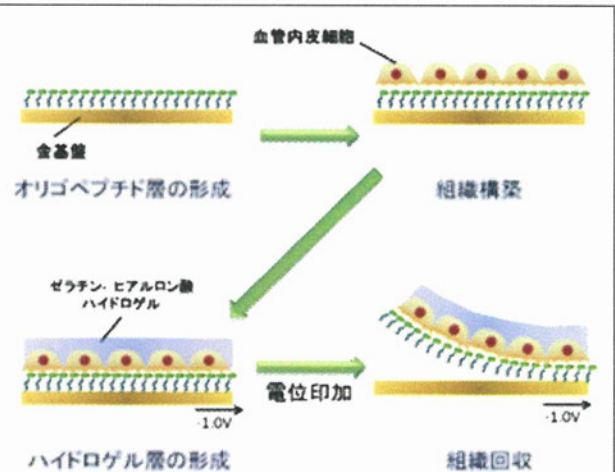


Fig. 4 ハイドロゲルへの細胞転写

C. 研究結果と考察

3. ハイドロゲルの合成と評価

3.1 CMC-CHOの合成

カルボキシメチルセルロース (CMC)と合成したCMC-CHOの ^1H NMRスペクトルの結果を比較しアルデヒド基の修飾が確認され、修飾率は80%であると見積もった。

3.2 Gelatin-ADHの合成

HA-CHOの場合と異なり、 ^1H NMRスペクトルの解析では判断が困難であったため、TNBSアッセイを用いた。このTNBSアッセイにより、ゼラチンのカルボキシル基へのアジポヒドラジドの修飾率は27%と見積もられた。この値は一般に高くないが、ゼラチンの細胞接着配列である、R (Arg)-G (Glu)-D (Asp)のD (Asp) はカルボキシル基を側鎖に持っているため、すべて反応してしまうとRGD配列が少なくなり、細胞接着率の低下につながる。そのため、この程度の修飾率が適当であると判断した。

3.3 Gelatin-ADHとCMC-CHOのゲル化

ダブルシリンジを用いて、Gelatin-ADHとCMC-CHOを混合させることによって、

常温下において10秒程度でゲル化する様子が確認された(Table 1, Fig. 5)。さらに、物性試験機で強度の指標であるヤング率をハイドロゲルの濃度を変化させながら測定したところ、ゲルの濃度が増加するに従ってヤング率は増加する傾向があることが示された(Fig. 6)。

Table 1 Gelatin-ADHとCMC-CHOの混合濃度とゲル化時間の関係

| ゲル濃度 (wt%) | ゲル化時間 (s) |
|-------------------|-----------|
| CMC2.0-Gelatin2.5 | 166±6 |
| CMC4.0-Gelatin5.0 | 28±3 |
| CMC6.0-Gelatin7.5 | 13±1 |

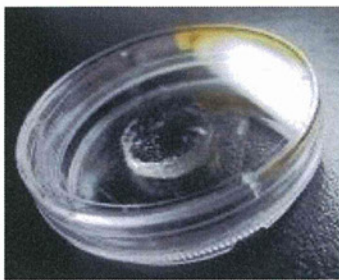


Fig. 5 Gelatin-ADHとCMC-CHOの混合ゲル

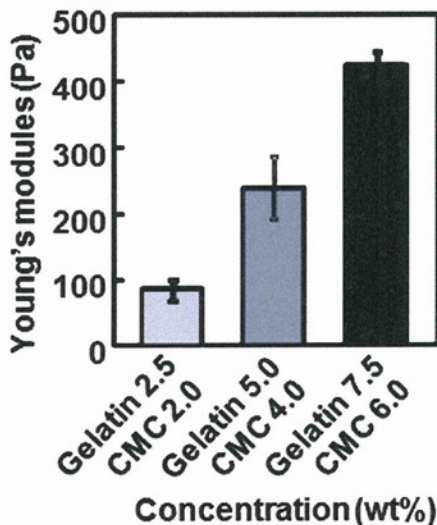


Fig. 6 Gelatin-CMCハイドロゲルのヤング率評価

3.4 Gelatin-CMCハイドロゲルの孔径評価

凍結乾燥したゲルの孔径は細胞の遊走や血管内皮細胞の血管新生に大きく関わっている。この孔径を評価したところゲルの濃度が増加するに従って孔径が小さくなる傾向が見られた(Fig. 7)。これらより、Gelatin-ADHとCMC-CHOの濃度を変化させることで容易にゲル強度の変更が可能であることを示した。

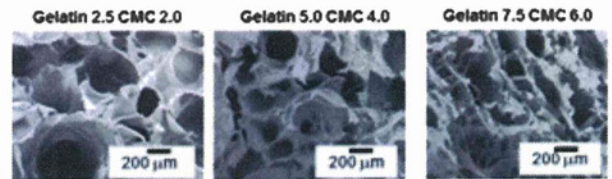
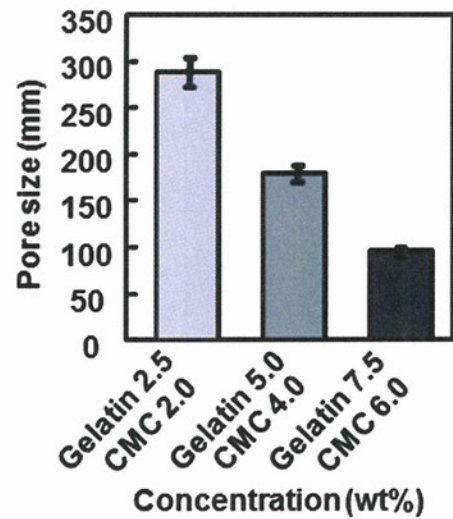


Fig. 7 Gelatin-CMCハイドロゲルの孔径評価

3.5 Gelatin-CMCハイドロゲルの生分解性評価

CMC2.0wt%-Gelatin2.5wt%ではネットワーク強度が弱く培養5日目に分解した(Fig. 8)。また、CMC6.0 wt%-Gelatin7.5 wt%では大きな膨潤が見られ、最大時には1.6倍の膨潤が認められた。そのため分解も早くに生じる傾向が認められた。CMC4.0wt%-Gelatin5.0 wt%では、さほど大

きな膨潤もなく、少なくとも2週間は構造を維持した。

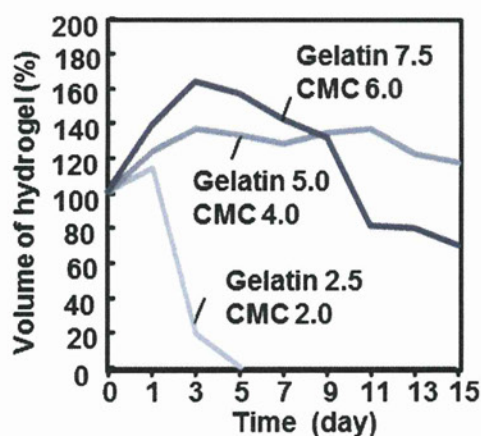


Fig. 8 Gelatin-CMCハイドロゲルの生分解性評価

4. ハイドロゲルへの細胞転写

4.1 ハイドロゲル原料の細胞毒性評価

ゲル原料の細胞毒性を調べたところ、Gelatin-ADHでは、すべての濃度で90%程度の生存率を示したが、CMC-CHOでは、濃度を増加させるに従って生存率は大きく減少した (Fig. 9、Fig. 10)。これは、架橋の反応基として用いているアルデヒドが高濃度になると細胞に影響を与えていることが考えられるが、この多くがゲル化の際に架橋に用いられるためCMC-CHOとGelatin-ADHを混合したゲルでは細胞毒性は少なく (Fig. 11)、細胞の足場材料としての利用が可能であると示された。

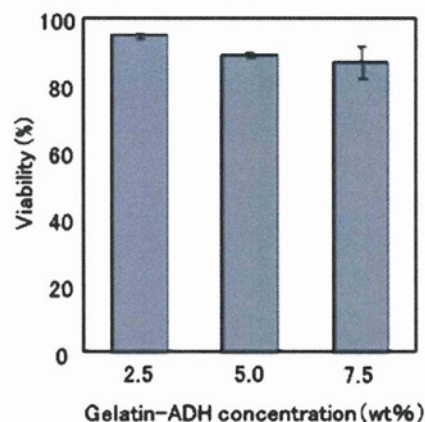


Fig. 9 Gelatin-ADHの細胞毒性

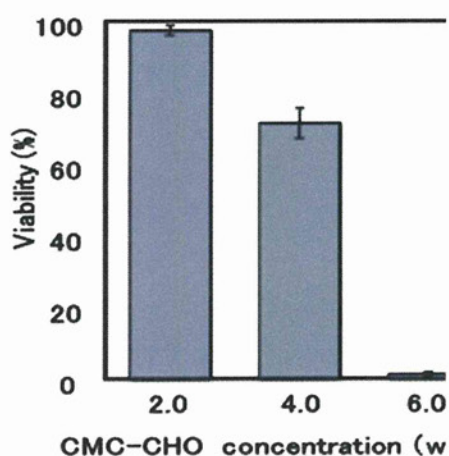


Fig. 10 CMC-CHOの細胞毒性

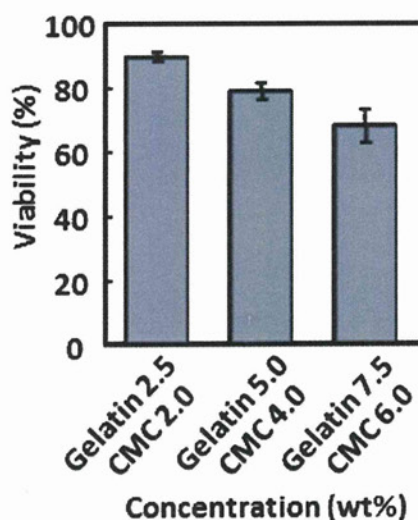


Fig. 11 CMC-Gelatinハイドロゲルの細胞毒性

4.2 HA-CHO、Gelatin-ADHゲルの細胞接着評価

細胞接着評価を行ったところ、混合比は変化させずに濃度を上げていくと、細胞接着の形態が変化した(Fig. 12)。これは、ゼラチンに含まれる細胞接着因子の量の増加、ゲルの強度、ゲルの膨潤度が大きく関係しているためと考えられる。また、濃度を上げていくと、ゲル化時間も早くなり、強度も強くなるが、ハイドロゲルの膨潤が大きくなり、より早く分解した。このことから、長期的な培養では、他の要素も踏まえて最適なゲル濃度を決定する必要があることが分かった。

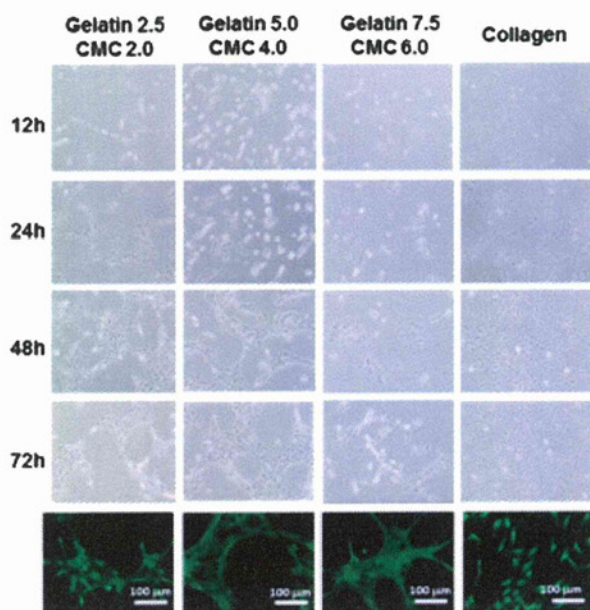


Fig. 12 ゲル上への細胞接着

4.3 CMC-Gelatinハイドロゲルの血管新生評価

これまでの評価で最適と考えられたGelatin 5.0wt%-CMC 4.0wt%のものを使用して、血管内皮細胞包埋による血管新生能の評価を行った。培養により、ゲル内での細胞増殖が認められ(Fig. 13)、血管内皮細胞の血管新生が認められた(Fig. 14)。

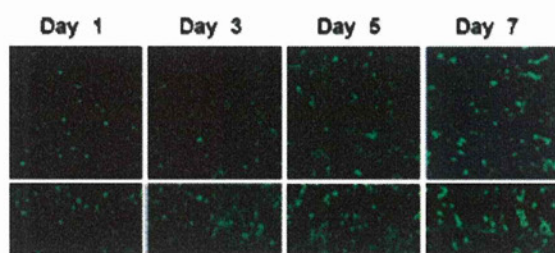


Fig. 13 ゲル内での細胞増殖

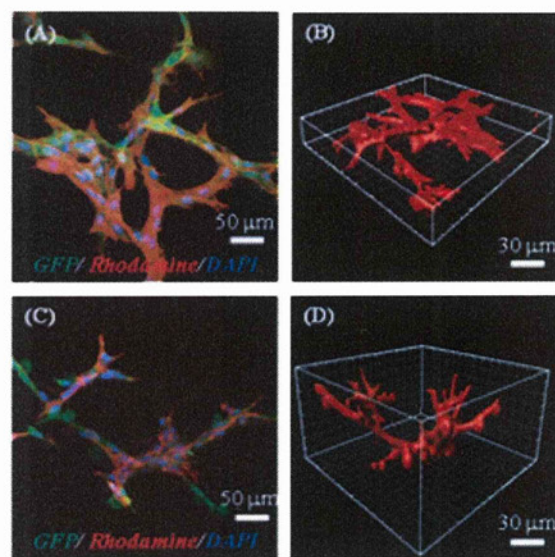


Fig. 14 構築した血管ネットワーク

(A)、(B) ゲル上での培養 (培養3日目)
(C)、(D) ゲル内での培養 (培養7日目)

4.4 電気化学を用いた細胞転写

電位印加によって細胞はCMC-CHO、Gelatin-ADHゲルに転写され、蛍光写真での生存も確認された(Fig. 15)。また、電位印加後の生存状態は良好で転写した細胞は増殖し、ゲル上を覆っていった。さらに、細胞脱離を電位印加時間やペプチドの有無によって評価したところ、5分間の電位印加によってペプチドを用いた場合のみ、ほとんどの細胞が回収できることが示された。

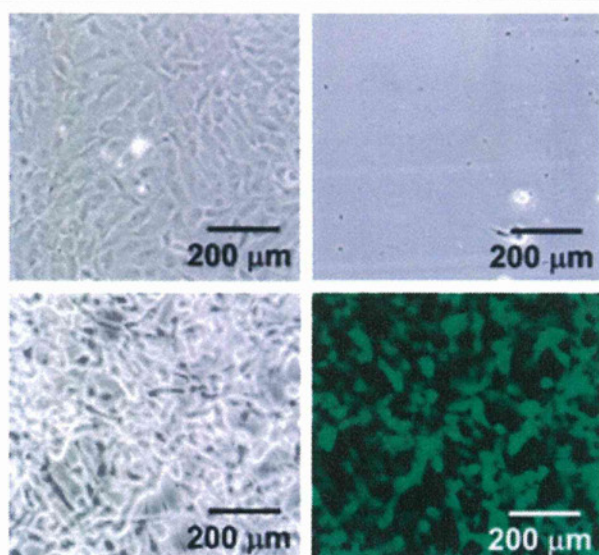


Fig. 15 CMC-Gelatinハイドロゲルへの電気化学細胞脱離を用いた細胞転写。

左上：電位印加前の金基板、
 右上：電位印加後の金基板、
 左下：電位印加後のゲル、
 右下：電位印加後の蛍光写真

D. 結論

カルボキシメチルセルロースとゼラチンを用いて2液混合型化学修飾ハイドロゲルを作製した。細胞接着評価により、2液の混合濃度を変更することによって、容易に分解性を適度に抑えた強度のあるハイドロゲルを得られることを示した。さらに、ゲル化時間が10秒以内ということも示された。細胞毒性評価及び、細胞接着性評価を行い、HA-Gelatinハイドロゲルが高い生体適合性を持つことを示した。さらに、オリゴペプチドを修飾した金基板上に接着した細胞を電気化学的に脱離させハイドロゲルへ転写可能であった。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Emoto, H. Yamaguchi, T. Kamei, H. Ishigami, T. Suhara, Y. Suzuki, T. Ito, J. Kitayama, T. Watanabe, Intraperitoneal administration of cisplatin via an in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogel for peritoneal dissemination of gastric cancer, *Surgery Today* (in press)
- 2) A. Shimizu, T. Suhara, T. Ito, K. Omichi, K. Naruse, K. Hasegawa, N. Kokudo, A New Hepatectomy-Induced Postoperative Adhesion Model in Rats and Evaluation of Anti-adhesion Material Efficacy, *Surgery Today* (in press)
- 3) Y. Sugawara, H. Kuroki, T. Tamaki, H. Ohashi, T. Ito, T. Yamaguchi, Conversion of a molecular signal into a visual color based on the permeation of nanoparticles through a biomolecule-recognition gating membrane, *Anal. Methods*, 4(9), 2635-2637 (2012)

2. 学会発表

国際学会

- 1) An ion-crosslinked hydrogel composed of dendritic copolymers Y. Nakagawa, S. Nakasako, T. Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012年12月10日 38
- 2) An in situ crosslinked hydrogel of hyaluronan produced via copper-free click chemistry, A. Takahashi, T. Suhara, Y. Suzuki, K. Omichi, A. Shimizu, K. Hasegawa, N. Kokudo, T. Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012年12月10日 37
- 3) Preparation of uniformly-sized microspheres of hemoglobin and albumin as oxygen carriers by the Shirasu porous glass membrane emulsification technique, Y. Lai, M.

Sato, Y. Suzuki, K. Akamatsu, S. Nakao, S. Yasuyuki, T. Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012年12月10日 36

- 4) A New Hepatectomy-Induced Postoperative Adhesion Model in Rats and Effects of Anti-adhesion Materials, A. Shimizu T. Ito, T. Sahara, K. Omichi, K. Hasegawa, N. Kokudo, American College of Surgeons the 98th Clinical Congress, マコーミックプレイス シカゴ 2012年10月1日
- 5) In situ crosslinkable hydrogel for rapid engineering of vascular-like structures by using electrochemical detachment of cells, T. Kageyama, T. Ito, H. Suzuki, J. Fukuda, 2012 MRS FALL MEETING, Boston, Massachusetts, 2012年11月25-30日

国内学会

- 1) 新規イオン応答性 dendritic ポリマーの創製 山田真理子・伊藤大知 化学工学会 第78年会 大阪大学 豊中キャンパス 大阪 2013年3月17-19日 E320
- 2) Copper-free click chemistry を用いた再生医療用マイクロカプセルの創製 高橋彬・酒井康行・伊藤大知 化学工学会 第78年会 大阪大学 豊中キャンパス 大阪 2013年3月17-19日 F207
- 3) キトサン / ポリアクリル酸グラフト樹状高分子を用いた新規 in situ 架橋ポリイオンコンプレックスゲルの開発 迫田龍・中浴聡・伊藤大知・市村重俊 化学工学会 第78年会 大阪大学 豊中キャンパス 大阪 2013年3月17-19日 D120
- 4) グラフト樹状高分子を用いた生体内イオン架橋ハイドロゲルの創製 中川慶之・中浴聡・伊藤大知 化学工学会 第

78年会 大阪大学 豊中キャンパス 大阪 2013年3月17-19日 D119

- 5) キトサン/ポリアクリル酸グラフト樹状高分子を用いた新規 in situ 架橋ゲルの開発 迫田龍・中浴聡・伊藤大知・市村重俊 第15回化学工学会学生発表会(米沢大会) 山形大学工学部 山形 2013年3月2日 A22
- 6) スタティックミキサーを用いた医療用 in situ 架橋ハイドロゲルの反応混合プロセスの研究 穂積卓朗・伊藤大知 東京大学先端医療シーズ開発フォーラム 東京 2013年1月25日 H3
- 7) 腹膜播種治療のための in situ ゲルナノゲルハイブリッドシステムの開発 平本翔大・江本成伸・山口博紀・石上浩徳・北山丈二・伊藤大知 東京大学先端医療シーズ開発フォーラム 東京 2013年1月25日 H1
- 8) 止血効果を有する癒着防止材料開発のためのヒアルロン酸/ポリリン酸 in situ 架橋ハイドロゲルの創製 青木照夫・大道清彦・清水篤志・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知 東京大学先端医療シーズ開発フォーラム 東京 2013年1月25日 F7
- 9) injectable な医用ハイドロゲルの材料開発ー腹膜癒着・腹膜播種・がん免疫療法・再生医療への応用 伊藤大知 情報協会招待講演 秋葉原 2012年12月18日
- 10) カルボキシメチルデキストランを用いたクリック反応架橋ゲルの開発 高橋彬・須原宜史・鈴木幸光・大道清彦・清水篤志・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター 宮城 2012年11月26-27日 PH24
- 11) 肝臓切除癒着における in situ 架橋ヒアルロン酸ハイドロゲル癒着防止材の開発 須原宜史・青木照夫・大道清彦・清水篤志・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター

宮城 2012年11月26-27日 PB14

- 12) ヘモグロビンを用いた SPG 膜乳化法による新規人工酸素運搬体の開発 Yao-Tong Lai・佐藤真優・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター 宮城 2012年11月26-27日 PY31
- 13) カッパーフリークリックハイドロゲルの開発と *in vivo* 生体適合性の評価 高橋彬・須原宜史・伊藤大知 膜シンポジウム 2012 神戸大学 六甲台第2キャンパス 兵庫 2012年11月6-7日 221
- 14) 腹膜播種に対するシスプラチン担持 *in situ* 架橋ゲルを用いた腹腔内化学療法 江本成伸・山口博紀・亀井隆雄・須原宜史・鈴木幸光・伊藤大知・石神浩徳・北山丈二・渡邊聡明 日本癌治療学会 パシフィコ横浜 神奈川 2012年10月25-27日
- 15) 電気化学的細胞脱離とスマートバイオマテリアルを用いたティッシュエンジニアリング 景山達斗・伊藤大知・鈴木博章・福田淳二 第64回日本生物工学会 第44回秋季大会 神戸国際会議場 兵庫 2012年10月24-26日 (口頭)
- 16) 電気化学的細胞脱離と *in situ* ゲル化スマートバイオマテリアルを用いた血管様構造の構築 景山達斗・掛川貴弘・大崎達哉・伊藤大知・鈴木博章・福田淳二 化学工学会 第44回秋季大会 東北大学 川内北キャンパス 宮城 2012年9月19-21日 D206
- 17) ポリアクリル酸グラフトヒアルロン酸を用いた生体内イオン架橋ゲルの創製 中浴聡・伊藤大知 化学工学会 第44回秋季大会 東北大学 川内北キャンパス 宮城 2012年9月19-21日 V303
- 18) Preparation of monodispersed poly(Methacryloxypropyl tris(trimethylsiloxy) silane) microspheres via SPG membrane

emulsification technique Yao-Tong Lai, Kazuki Akamatsu, Shin-ichi Nakao, Yasuyuki Sakai, Taichi Ito 化学工学会 第44回秋季大会 東北大学 川内北キャンパス 宮城 2012年9月19-21日

- 19) ラット肝切除術後癒着モデルを用いた癒着防止材料の有効性の比較研究 大道清彦・清水篤志・須原宜史・宮田陽一・青木琢・阪本良弘・菅原寧彦・伊藤大知・長谷川潔・國土典宏 第67回日本消化器外科学会総会 富山国際会議場 富山 2012年7月18-20日
- 20) SPG膜乳化法によるヘモグロビンベース新規人工酸素運搬体の開発 Lai Yao-Tong、佐藤真優・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 第11回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 2012年6月14日 D-5-71
- 21) Copper-free click chemistry を用いた医用 *in situ* 架橋ゲルの創製 高橋彬・鈴木幸光・伊藤大知 第11回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 2012年6月14日 O-27-5
- 22) ダブル *in situ* 架橋を可能にするフィブリン-ヒアルロン酸クリックハイドロゲルの創製 須原宜史・伊藤大知 第11回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 2012年6月13日 A-7-37
- 23) Development of hemoglobin-based oxygen carriers via SPG membrane emulsification technique Yao-Tong Lai, Mayu Sato, Kazuki Akamatsu, Shin-ichi Nakao, Yasuyuki Sakai, Taichi Ito 日本膜学会第34年会 早稲田大学西早稲田キャンパス 63号館 2012年5月9日
- 24) 新規イオン応答性 dendrolic ポリマーの創製 山田真理子・伊藤大知 日本膜学会第34年会 早稲田大学西早稲田キャンパス 63号館 2012年5月9日
- 25) ポリリン酸修飾ヒアルロン酸イオン

架橋ゲルの創製 青木照夫・伊藤大知
日本膜学会第 34 年会 早稲田大学西早
稲田キャンパス 63 号館 2012 年 5 月 9
日

26) イオン認識ゲート膜の開発 伊藤大
知 日本膜学会第 34 年会早稲田大学
西早稲田キャンパス 63 号館 2012 年
5 月 9 日

27) ラット肝切除による新たな腹腔内癒
着モデルの開発と癒着防止材料の有効
性に関する検討 清水篤志・伊藤大
知・須原宜史・長谷川潔・国土典宏 第
112 回日本外科学会定期学術集会 幕
張メッセホテルニューオータニ幕張
千葉 2012 年 4 月 12-14 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

PCT 出願へ移行

伊藤大知、鈴木幸光、高橋彬、清水篤志、
発明の名称:ハイドロゲル及びその製造方
法、特願 2011-122183

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|-----------------------------|-----------|---------------------|--------------|-----|------|---------|
| 福田淳二 | 自己組織化単分子膜の電気化学的な脱離と再生医療への応用 | | Membrane | 膜学会 | | 2012 | 113-118 |
| 福田淳二 | 電気化学を用いた再生医療用培養皿の開発 | | バイオサイエンスとバイオインダストリー | バイオインダストリー協会 | | 2012 | 142-143 |
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------|---------|-------|------|
| T. Kakegawa, N. Mochizuki, N. Sadr, H. Suzuki, J. Fukuda* | Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells | Tissue Engineering | 19(1-2) | 290-8 | 2013 |

自己組織化単分子膜の電気化学的な脱離と再生医療への応用

福田淳二

筑波大学大学院 数理物質科学研究科
〒305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1

Electrochemical Desorption of Self-assembled Monolayers and Its Application for Regenerative Medicine

Junji Fukuda

Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
1-1-1, Tennoudai, 3F528, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

Regenerative medicine aims to regenerate damaged tissues and organs by replacing them with tissue substitutes grown and reconstructed in the laboratory. One of the potential methods for reconstructing well-organized tissues *in vitro* is the use of cellular building blocks, such as cell sheets and spheroids. The fabrication and manipulation of such building blocks rely on innovative strategies for noninvasive cleavage of cell-to-culture substrate connections while preserving cell-to-cell connections. Several examples toward this end including our electrochemical approach have been presented. In our approach, cells are cultured on self-assembled monolayers (SAMs) of alkanethiols or oligopeptides adsorbed on a gold surface. The SAM was then reductively desorbed from the gold substrate by the application of a negative electrical potential. This caused the cells to detach from the gold surface in a rapid and reliable manner while maintaining cell-cell connections. This technology can be used to fabricate cell sheets, spheroids, and vascular-like structures.

Key words : self-assembled monolayer / electrochemistry / regenerative medicine / tissue engineering / cell sheet / spheroid

1. はじめに

再生医療とは細胞そのものを利用する新しい治療法であり、従来では治療できなかった患者を救命できる可能性があるため、大きな期待が寄せられている。特にこの分野は、日本発のiPS細胞作製技術の発見などもあり、近年国内でも注目が集まっている。ただし、たとえ免疫的に適合する細胞であっても、生体内へ単に細胞をインジェクションするだけでは、

ごく一部の細胞しか生着せず十分な治療効果が得られないことが分かっている。つまり、iPS細胞などから必要な細胞が得られるようになるとしても、生体外であらかじめ組織体を構築する技術がなければ、より重要かつ複雑な臓器の再生医療は実現できない。

そこでこれまでに、耳や鼻などの比較的単純な組織は、生分解性多孔質ポリマーやハイドロゲルなどを必要な形状に加工し、これに細胞を播種して移植するアプローチが試みられてきた¹⁾。この方法は、すでに膀胱の再生医療などに臨床応用されている²⁾。しかし、この方法は、移植後の細胞の増殖と自発的な組織化に大きく依存しており、生分解に伴う局所的なpHの低下など、いくつかの問題を抱えている。そのため、対象臓器によっては、細胞のみからなるよ

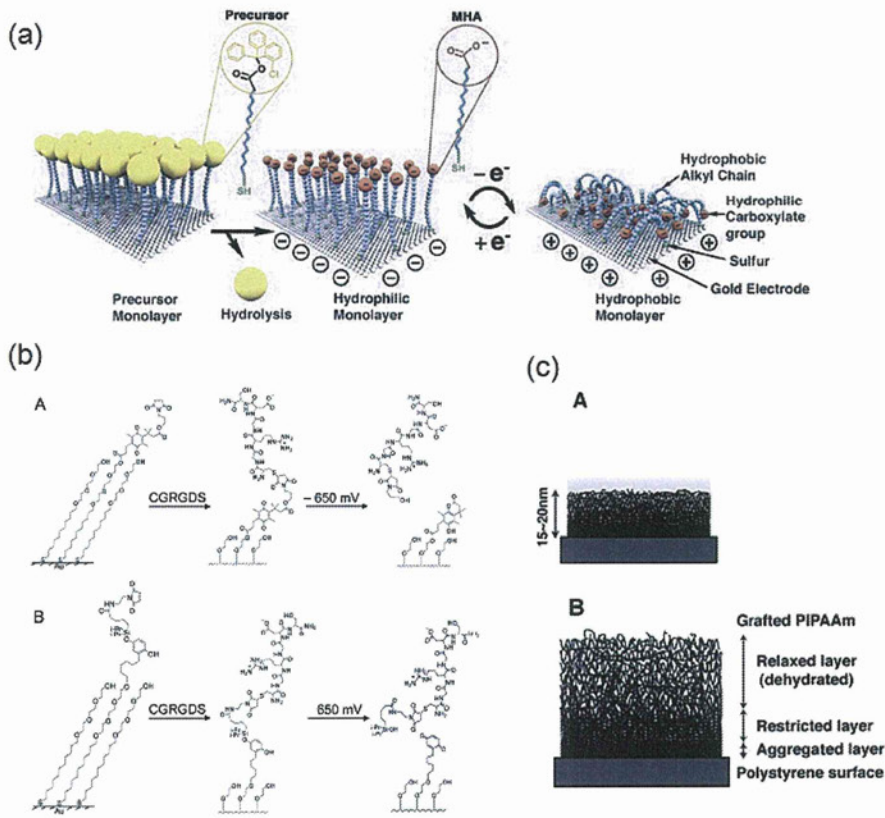


Fig. 1 Stimulus responsive film layers. (a) Electrically responsive monolayers⁷⁾. (b) Electrically cleavable monolayer⁸⁾. (c) Thermally responsive polymer film¹⁶⁾.

り生体組織に類似した組織体を作製する技術が求められている。例えば、伸縮が必要な心筋、透明性が
必要な角膜、細胞同士の密な相互作用や立体構造が
重要な肝臓や膵臓などでは、多孔質ポリマーを含ま
ないアプローチがより適切と考えられる。

このような細胞のみの組織を構築するアプローチ
の1つとして、細胞シートや球状の細胞凝集体（スフ
ェロイド）を作製し、これらを **building blocks** とみ
なして適切に組み立てる方法論が提案されている³⁾。
文字通り、積み木やレゴの要領である。このような
アプローチを実現するためのキーテクノロジーとなる
のが、外部刺激に応答して表面の性質を大きく変
化させる「膜」である。つまり、細胞-細胞間の接
着（組織構造）は維持したまま、細胞-培養表面間
の接着のみを切断する機能性の分子膜が必要である。
これまでに、単分子膜やポリマー薄膜を形成した培
養表面などが報告されている。これらの膜は、厚み
は数十 nm、広さは cm オーダーという特徴的なサイ
ズを持ち、電気、熱、光などに応答して膜構成分子
のコンフォメーション変化を起こし、細胞を表面か
ら脱離させるものである。本稿では、これら種々の
刺激応答性膜コート表面と再生医療への応用につい
て紹介する。

2. 刺激応答性分子膜

2.1 電気刺激

電気的な刺激を利用して表面の特性を大きく変化
させるアプローチには、いくつか異なる手法がある
^{4~6)}。これらは、単分子膜の構造変化を利用する
もの、電気化学的な反応を利用するものにと大別で
きる。前者は、例えば J. Lahann らの報告している静
電的な相互作用を利用する方法である (Fig. 1 (a))。
彼らは、嵩高いヘッドを持つアルカンチオール自己
組織化単分子膜 (self-assembled monolayer, SAM)
を金表面に形成し、その後、ヘッドを除去すること
で低密度 SAM を作製した。この分子膜では、電極表
面に負電位を印加するとカルボキシル末端が表面に
露出する (直立状態)。一方、正電位を印加するとカ
ルボキシル末端が表面に引き寄せられアルキル鎖が
表面に露出する。この変化により、表面の親水/疎
水性およびインピーダンスをスイッチできることを
報告している⁷⁾。また後者には、例えば M. Mrksich
らのグループの電気化学反応を利用する方法がある
(Fig. 1 (b))。彼らは、2種類の quinone 類を含む
SAM を利用し、それぞれが正または負の電位印加で

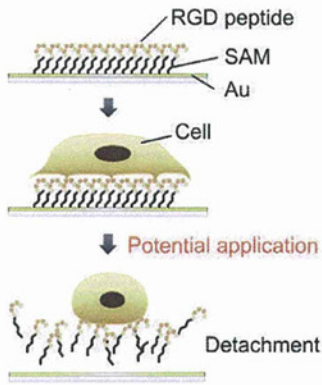


Fig. 2 Detachment of cells along with the electrochemical desorption of a SAM¹⁸⁾.

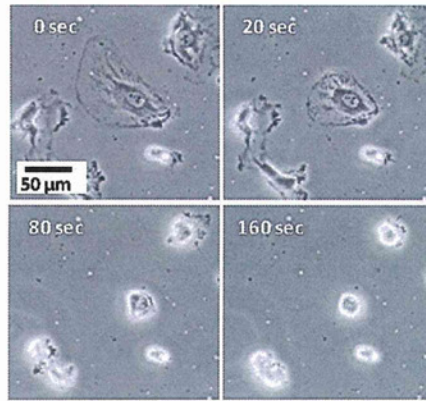


Fig. 3 Change in cell morphology after the application of the electrical potential.

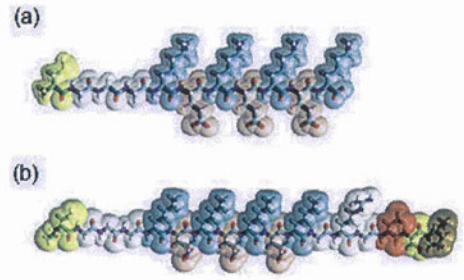


Fig. 4 Zwitterionic oligopeptides¹⁹⁾.

酸化または還元され、切断される反応を利用している⁸⁾。これら以外にも電気化学反応によるpH変化を利用してポリオンコンプレックス膜を解離させる方法などが報告されている⁹⁾。

2.2 光刺激

光刺激に反応して分子構造を変化させ、表面の細胞接着性を変化させる方法も報告されている。これらのアプローチでは、**azobenzen**や**spiropyran**など、光の波長に応じてシストランスの異性体変化を引き起こす分子を含む単分子膜が利用されている^{10,11)}。例えば、**J. Auernheimer**らは、中央に**azobenzen**を、片末端に**RGD**ペプチドを備えた分子を用いている。この分子層で覆った表面に紫外光を照射することで、細胞の接着性を制御できることを示している¹²⁾。また、**A. Higuchi**ら¹³⁾や**J. Edahiro**ら¹⁴⁾は、**spiropyran**を利用して、同様に細胞の接着性を制御できることを報告している。光刺激を利用する利点は、高い空間分解能で表面の特性をスイッチできることである。

2.3 温度刺激

温度変化により表面の細胞接着性を制御する方法は、**T. Okano**らのグループにより精力的な研究および臨床応用がなされている^{15,16)}。彼らは、**Poly (N-isopropylacrylamide)**のグラフト重合膜を利用して、細胞接着性を制御している。この膜は、37℃では細胞接着性であるものの、20℃程度に低下させると水和して細胞非付着性になるという特徴がある (Fig. 1 (c))。特に、細胞同士が二次元的に接着した細胞シートをこの表面で作製し、これを温度変化によって脱離・回収し、再生医療へ適用している。

3. 自己組織化単分子膜の還元脱離を利用した細胞脱離

3.1 細胞脱離

著者らは、上述した刺激応答性分子膜の中でも、電気刺激を利用したアプローチを検討してきた。刺激応答性分子膜を、空間分解能、時間分解能、可逆性の観点で比較すると、電気刺激を利用する方法は可逆性、空間分解能には劣るものの、時間分解能が高いと言える。なぜなら、電気刺激では、表面から数ナノメートルまでの局所的な領域に強力なエネルギー場を作ることができるためである¹⁷⁾。これにより素早いスイッチングが期待できる。この電気化学エネルギーについて考えてみる。例えば、通常の化学反応では、熱運動によって活性化エネルギーの峠を越え反応が生じる。この熱運動エネルギーは温度 T の時は、 $(3/2)RT$ で表わされるため、仮に37℃とすると3.9 kJ/molに過ぎない。一方、1 Vの電圧は、電子1個のエネルギーで1 eV、よって97 kJ/molである。そして、語弊はあるものの $(3/2)RT$ から逆に T に換算すると、7500℃もの高温に相当する。つまり、この局所的な強いエネルギーを表面反応、ここでは細胞脱離に、利用することで高い時間分解能が得られると考えられる。

著者らは、**alkanethiol SAM**を介して金電極表面に細胞を接着させ、**gold-thiolate**結合を電気化学的に切断することで、細胞を脱離させる手法を考案した (Fig. 2)¹⁸⁾。この方法では細胞は培養表面から5分以内に脱離する (Fig. 3)。2.3に示した温度刺激による細胞脱離では30分~1時間を要するのと比較すると、素早い脱離法であると言える。

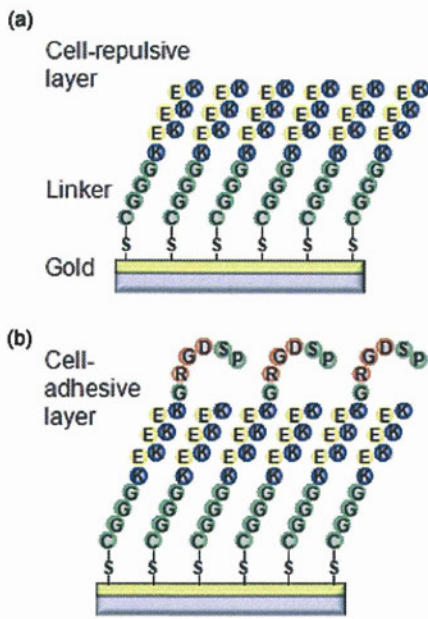


Fig. 5 Formation of self-assembled monolayers. Cell-repulsive (a) and adhesive (b) surfaces¹⁹⁾.

ところで、alkanethiolなどの分子は生体内に存在しないため、再生医療への応用を考えると、これらの分子の使用は将来の臨床応用において安全上の問題を引き起こす可能性がある。そこで、より生体適合性が高いと考えられるペプチドの利用を検討した¹⁹⁾。つまり自己組織化能を有するオリゴペプチドをデザインし、電気化学細胞脱離への効果を検討した (Fig. 4)。このペプチドでは、片末端にチオール基を有するシステインを配置し、金表面との結合に用いる。中央にはポジティブおよびネガティブにチャージしたリジン (K) およびグルタミン酸 (E) の繰り返し配列を導入し、金表面に末端を結合させた状態で、静電的な相互作用により密な分子層を形成するよう設計している (Figs. 4 (a), 5 (a))。これまでの予備検討で、当該細胞脱離には、このようなタンパクの非特異吸着が生じない密な分子層の形成が重要であることが分かっている。さらに逆末端に細胞接着配列である RGD を加えた細胞接着性のオリゴペプチドも設計した (Figs. 4 (b), 5 (b))。この新しく設計したペプチドを用いて細胞脱離試験を行ったところ、alkanethiol SAM よりさらに短い、電位印加 2 分間でほぼすべての細胞が脱離することが示された (Fig. 6)。著者らの調べた範囲では、これまでにこのような短時間の細胞脱離は報告されていない。

3.2 オンデマンド細胞脱離

顕微鏡下で観察している興味ある特定の細胞を、その場で回収しオンデマンドに解析可能となれば、

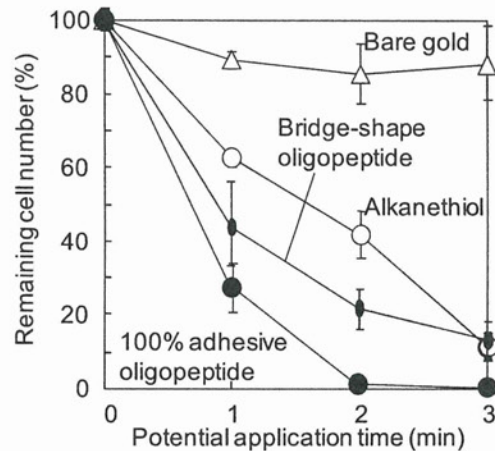


Fig. 6 Electrochemical cell detachment¹⁹⁾.

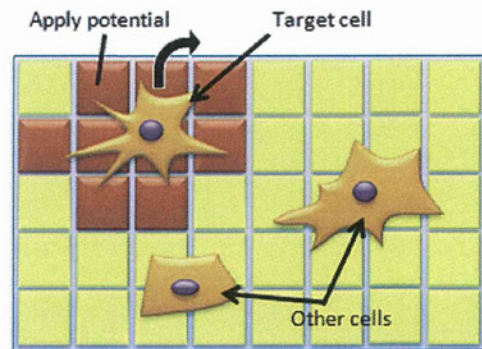


Fig. 7 Electrode arrays for selective cell detachment²⁰⁾.

再生医療分野に限らず培養細胞を利用する様々な分野において有効なツールとなりうる。しかし、電気化学を利用した細胞脱離は、上述したように光を用いる場合と比較して空間分解能が低いと言える。つまり、光であれば、局所的に照射して細胞サイズ以下のスケールで細胞-培養表面間の接着を切断することは容易であるが、この目的に電気刺激を利用するのは困難である。一方、光による細胞脱離には一般に紫外光が利用されるため、脱離させた細胞をさらに研究や医療応用する場合には適切とは言えない。

そこで空間分解能の高い電気化学的な細胞脱離法を確立するために、フォトリソグラフィーなどの微細加工技術を用いて、マイクロアレイ電極を作製した (Fig. 7)²⁰⁾。ただし、これまでのように金電極を利用すると、微小電極と電極間隙における光透過性の違いから、光学顕微鏡下ではハレーションが生じて電極上の細胞の観察が困難となる。そこで、透明電極として広く知られている ITO 電極 (tin-doped indium oxide) を利用した微小電極アレイを作製した。すでに、ITO 電極表面に alkanethiol SAM が形成されること、さらに負電位の印加によって表面から脱離

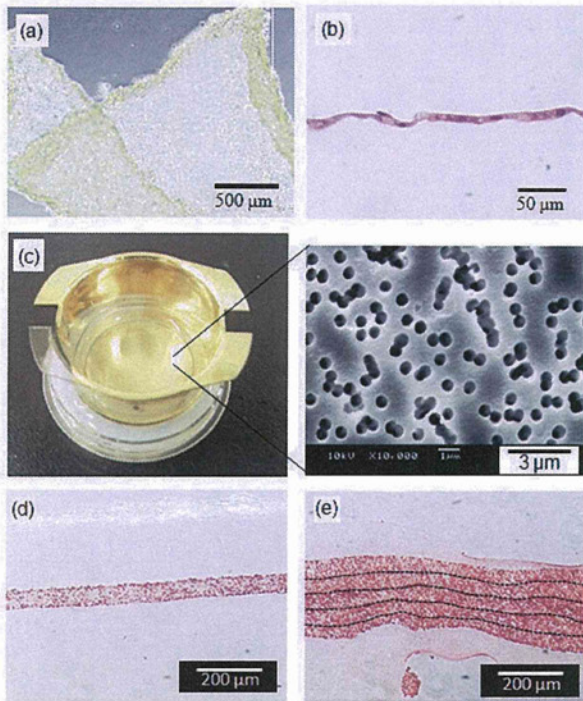


Fig. 8 Cell sheets formed on membrane substrates^{18, 22)}.

可能であることは報告されている²¹⁾。我々は、接着細胞と同等スケールの微小電極をアレイし、5分間の電位印加でシングル細胞サイズの解像度で、特定の細胞を回収可能であることを示した。

3.3 細胞シートの脱離と積層化

上述した電気化学を用いた細胞脱離法は、二次元的に細胞同士が接着した細胞シートの脱離にも適用可能であった (Fig. 8 (a))¹⁸⁾。脱離させた細胞シートを別の細胞シートへ重ねて接着させ、再び脱離させるという操作を繰り返すことで、細胞シートを積層化することも可能であることを示した。ただし、細胞シートのサイズが大きくなるに従って、脱離に要する時間は延長する傾向が見られた。この一つの原因は、細胞シート自体が電気抵抗となり大きな電圧降下を引き起こしているためと考えられる。また、培養ディッシュ底面で細胞を重層化させた場合、簡単な拡散方程式から酸素不足が容易に生じることが導かれる²²⁾。

そこでこれらの状況を改善し、より大きくかつ厚みのある細胞シートを作製するために、多孔質膜に当該電気化学細胞脱離を応用した²³⁾。使用した多孔質膜はいわゆるトラックエッチング膜であり、400 nmの均一な孔が形成されている (Fig. 8 (c))。この膜は、一般にセルインサートという名称で市販されており、細胞培養ディッシュ内に入れ、上下に培養培地を導入できるようになっている。これを利用す

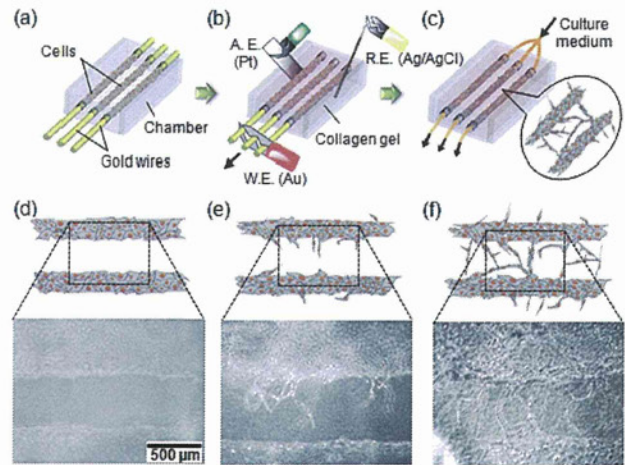


Fig. 9 Fabrication of capillary-like structures through the electrochemical cell detachment²²⁾.

ることで、培地の気液界面から細胞培養面までの距離を短縮し、酸素供給速度を向上することができる。また、孔の存在によって細胞シートによる電気的抵抗の及ぼす影響を回避できると考えられる。実際にこの多孔質膜上では、細胞の増殖速度は向上し、14日間の培養で厚み50 μmの線維芽細胞シートが形成された (Fig. 8 (d))。さらに、このシートを5枚積層化することで、ピンセットで操作できるほどの厚みのある細胞シートを作製することが可能であった (Fig. 8 (e))。

3.4 血管様構造作製への応用

上述したように細胞シートを積層化することで、厚みのある細胞シートが作製可能である。しかしながら、これ以上厚みを増加させると内部に壊死層が生じる。これは細胞組織内の酸素拡散を考えると当然のことであり、細胞シート表層を飽和酸素濃度に維持しても、生存限界厚みは、たかだか150~300 μm程度である。生体内の重要な臓器はいずれもcmオーダーであることを考えると、現状の技術レベルは、サイズにして何桁も低いと言える。生体外でmm~cmスケールの細胞組織・臓器を構築するには、送液可能な血管ネットワーク構造を構築する技術が必要である。

我々の電気化学細胞脱離技術は、平面のみならず円柱などの様々な形状に応用可能である。そこで、細胞脱離技術を金ロッドに適用し、コラーゲンゲルへ細胞を転写することで、内表面が血管内皮細胞に覆われた血管様構造を作製した (Fig. 9)^{22, 23)}。血管内皮細胞は、適切な成長因子などの存在下で、コラーゲンゲル内において管腔構造を形成することが知られている (Fig. 9 (c))。したがって、直径500 μm

の金ロッドを500 μm 間隔で配置し、これ以下の血管ネットワーク構造の形成は細胞の管腔形成能に委ねるようにデバイスを設計した。このようなある程度荒い配置は、cmサイズへのスケールアップを考慮すると重要であると思われる。このデバイス内で14日間還流培養したところ、それぞれの血管様構造から伸長した管腔構造が互いに接続されることが示された (Fig. 9 (d) ~ (f))。コラーゲンゲル内に増殖性の臓器幹細胞などをあらかじめ導入しておくことで、血管の伸長とともに組織化させ、送液可能な血管ネットワーク構造を備えた三次元組織を作製できるものと期待している。

5. おわりに

本稿では、単分子膜を形成した培養表面を利用した細胞接着性の制御技術とその再生医療への応用について解説した。特に著者らの単分子膜の電気化学的脱着反応を利用した細胞脱離技術について紹介した。ドナー不足のために治療できない患者に、自らの細胞を用いて移植可能な臓器を作り出す。これが再生医療の究極の目標である。そのためには、工学的なものづくり技術をますます取り入れる必要があり、中でも多孔質膜、単分子膜などの膜技術の果たす役割は非常に重要である。

文 献

- 1) Langer R and Vacanti JP : *Science*, **260**, (5110), 920-926 (1993)
- 2) Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB : *Lancet*, **367**, 1241-1246 (2006)
- 3) Yamato M, Akiyama Y, Kobayashi J, Yang J, Kikuchi A, Okano T : *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 1123 (2007)
- 4) Abbott NL, Gorman CB, Whitesides GM : *Langmuir*, **11**, 1, 16-18 (1995)
- 5) Chan EW, Park S, Yousaf MN : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 33, 6267-6271 (2008)
- 6) Kim M, Lee JY, Shah S, Tae G, Revzin A : *Chem. Comm.*, **39**, 5865-5867 (2009)
- 7) Lahann J, Mitragotri S, Tran TN, Kaido H, Sundaram J, Choi IS, Hoffer S, Somorjai GA, Langer R : *Science*, **299**, (5605), 371-374 (2003)
- 8) Yeo WS, Mrksich M : *Langmuir*, **22**, 25, 10816-10820 (2006)
- 9) Guillaume-Gentil O, Akiyama Y, Schuler M, Tang C, Textor M, Yamato M, Okano T, and Vörös J : *Adv. Mater.*, **20**, 3, 560-565 (2008)
- 10) Ichimura K, Oh SK, Nakagawa M : *Science*, **288**, (5471), 1624-1626 (2000)
- 11) Hayashi G, Hagihara M, Dohno C, Nakatani K : *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 28, 8678-8679 (2007)
- 12) Auernheimer J, Dahmen C, Hersel U, Bausch A, Kessler H : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 46, 16107-16110 (2005)
- 13) Higuchi A, Hamamura A, Shindo Y, Kitamura H, Yoon BO, Mori T, Uyama T, Umezawa A : *Biomacromolecules*, **5**, 1770-1774 (2004)
- 14) Edahiro J, Sumaru K, Tada Y, Ohi K, Takagi T, Kameda M, Shinbo T, Kanamori T, Yoshimi Y : *Biomacromolecules*, **6**, 970-974 (2005)
- 15) Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Kanzaki M, Ohki T, Nishida K, Okano T : *Biomaterials*, **28**, 34, 5033-5043 (2007)
- 16) Matsuda N, Shimizu T, Yamato M, Okano T : *Adv. Mat.*, **19**, 20, 3089-3099 (2007)
- 17) 渡辺 正, 金村聖志, 益田秀樹, 渡辺正義 : 「電気化学」, p.61, 丸善株式会社 (2005)
- 18) Inaba R, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J : *Biomaterials*, **30**, 21, 3573-3579 (2009)
- 19) Kakegawa T, Mochizuki N, Sadr N, Suzuki H, Fukuda J : *Tissue Eng.*, submitted.
- 20) Fukuda J, Kameoka Y, Suzuki H : *Biomaterials*, **32**, 28, 6663-6669 (2011)
- 21) Yan C, Zharnikov M, Golzhauser A, Grunze M : *Langmuir*, **16**, 15, 6208-6215 (2000)
- 22) Evenou F, Fujii T, Sakai Y : *Tissue Eng.*, **16**, 2, 311-318 (2010)
- 23) Mochizuki N, Kakegawa T, Osaki T, Sadr N, Kachouie NN, Suzuki H, Fukuda J : *J. Tissue Eng. Regen. M.*, Doi : 10.1002/term.519 (2012)
- 24) Seto Y, Inaba R, Okuyama T, Sassa F, Suzuki H, Fukuda J : *Biomaterials*, **31**, 2209-2215 (2010)
- 25) Sadr N, Zhu M, Osaki T, Kakegawa T, Yang Y, Moretti M, Fukuda J, Khademhosseini A : *Biomaterials*, **32**, 30, 7479-7490 (2011)

(Received 8 March 2012 ;

Accepted 11 March 2012)

著者略歴

福田 淳二 (ふくだ じゅんじ)



2003年3月 九州大学大学院工学府博士課程修了, 博士 (工学)

2003年4月 文部科学省知的クラスター創成事業 招聘研究員, 北九州市立大学

2004年4月 日本学術振興会 特別研究員 (PD)

2005年4月 Postdoctoral fellow, MIT, USA

2006年より現職

TOPICS

Culture dishes using electrochemistry
for regenerative medicine

電気化学を用いた 再生医療用培養皿の開発

福田淳二

キーワード 電気化学、自己組織化単分子膜、細胞シート、ティッシュ・エンジニアリング

はじめに

次世代の治療法として、再生医療への期待が高まっている。現在の医療技術では、重篤な患者を救命する最後の切り札は臓器移植である。しかし、移植には圧倒的なドナー不足という問題があり、また運よく移植を受けてもその後一生涯、免疫抑制剤を飲み続けなければならない問題がある。一方、再生医療では、患者自身の細胞から移植に利用できる臓器を作り出すことにより、これらの問題を解決できると考えられている。この分野では、患者の皮膚細胞などから万能性を持つ細胞(iPS細胞)を作り出す手法が、日本発の技術として近年発表され、脚光を浴びている。研究の進展は非常に早く、国内においても、すでに臨床試験の申請がなされている。また、再生医療は次世代大型産業としても注目されている。治療装置や培養器具なども含め、数年後には世界で数兆円規模に達すると予想されている。

1. 再生医療に用いる培養皿

免疫的に適合する細胞であっても、生体内へ単に細胞懸濁液を注入するだけでは、ごく一部の細胞しか生着せず、十分な治療効果が得られないことがよく知られている。つまり、万能細胞から必要な細胞が得られるとしても、生体外で組織・臓器を作製する技術が再

生医療の実現には必要である。これまで、例えば耳や鼻などの組織は、生分解性多孔質ポリマーなどを必要な形状に加工し、これに細胞を播種して移植する方法が採られてきた。この方法は、すでに膀胱の再生医療などに臨床応用されている。ただし、移植後の細胞の増殖と自発的な組織化に依存するアプローチであり、生分解に伴って局所的にpHが低下したり、ポリマーの分解速度と細胞の増殖速度が釣り合わないなどの問題がある。そのため、対象臓器によっては、細胞のみからなるより生体類似の組織体を生体外で構築する技術が提案されている。例えば、伸縮が必要な心筋、透明性が必要な角膜などでは、多孔質ポリマーを含まない細胞のみからなる組織がより適切と考えられている。このアプローチの1つとして、温度応答性培養皿を用いた細胞シート技術がある。この培養皿は、細胞を増殖させてシート状態としたのちに、培養温度を20℃程度に低下させることで、細胞をシート状態のまま培養皿から剥離させることができるものである。この技術も日本発であり、すでに心筋の治療など臨床試験が実施され、新しい手法として注目されている。

2. 電気化学を利用した細胞シート作製

筆者らは、電気化学的な原理で細胞シートを作製する技術を近年報告した¹⁾。細胞シートを移植する際は、実は細胞シートは一層ではなく積層化したものを用いる。つまり、脱離させた細胞シートを別の細胞シートに重ね、さらに脱離させるという操作を複数回繰り返すことで、厚みのある積層化細胞シートを作製する。このとき、前述の温度応答性培養皿では1回の細胞脱離に30分以上を要するが、電気化学を利用する方法では約5分程度で脱離が可能であり、積層化に要する時間を短縮することができる。

この細胞脱離法の原理は、まずアルカンチオールまたはオリゴペプチド(図1)を金の表面に金-チオール結合で結合させ、自己組織化単分子膜を形成させる²⁾。そして、この分子層を介して細胞を接着させる。金電極に-1.0 V (vs. Ag/AgCl)の電位を印加することで金-チオール結合を切断し、このときの分子層の脱離に伴って細胞も脱離させるものである。実際に細胞脱離の様子を観察すると、細胞は周辺から脱離して次

筆者紹介：ふくだ・じゅんじ (FUKUDA, Junji) 筑波大学大学院数理工学物質科学研究科物性・分子工学専攻 (Grad. Sch. of Pure and Appl. Sciences, Univ. of Tsukuba) 講師 2003年九州大学大学院工学府博士後期課程修了 博士(工学) 専門：生物工学 連絡先：〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1 E-mail fukuda@ims.tsukuba.ac.jp (勤務先)