

研究種目：共同研究

研究期間：平成 29 年 10 月～平成 31 年 9 月

研究課題名：力学特性を時空間的に制御可能な高分子を基盤とした革新的メカノバイオマテリアルの創成

ラボ長

所属：物質創成専攻化学工学領域

氏名：中畑雅樹

研究成果

本研究では、主に材料科学的な視点からメカノバイオロジーにアプローチし、特異な力学的性質を有する材料を基盤として生体内のモデル系を構築しその応用を目指す。具体的には、生体内の力を感じ取るメカノセンサー分子特異的に応答する材料を開発し、その材料表面での細胞の動態を詳細に明らかにし、更にそれを応用して生体内異種材料界面のモデルを構築する。

平成 29 年度の研究目的は以下のものであった。

1. 要素技術の開発

- ・研究代表者（中畑）：応力緩和機構を組み込んだ高分子材料の開発

様々なタイムスケールの応力緩和機構を付与した高分子材料を開発する。分子長の揃った高分子を精密重合により合成し、生体適合性・細胞接着性を有する高分子にグラフトさせる。これを分子間相互作用や化学結合により架橋することで、ヒドロゲルを形成する。

- ・共同研究者（松井）：標的とするメカノセンサー分子の決定

力学的シグナル伝達に関わる分子のネットワークの中で、シグナルのセンシング・コントロール・プロセス・アウトプット等の役割を担う分子から標的とするメカノセンサー分子を選び出す。力が起点となるシグナル応答と正の相関が高いものを本課題の標的メカノセンサーとする。

2. 要素技術の統合

様々な緩和の時定数を有する材料上で筋芽細胞や線維芽細胞などの接着細胞を培養する。細胞の接着・伸展・成長を蛍光イメージングなどによって解析する。材料の力学特性とターゲットとするメカノセンサー分子の活性の関係を調査し、分子生物学、細胞生物学的手法も駆使して総合的に解析を行う。これにより、メカノセンサーとリンクした材料設計の一般的な指針を構築する。

本年度は、以上の目的に照らし合わせて、実際に応力緩和機構を組み込んだ細胞接着性ヒドロゲルの開発を試み、実際に材料の性質に応じて細胞の伸展に違いが見られることを見出した。細胞形態は細胞-材料間に形成される接着構造の成熟度と密接な関係があるため、ゲルの応力緩和特性の違いがメカノセンサーの出力関係に影響を与えたものと考えられた。以下に詳細を述べる。

本年度の検討では、これまでに報告されてきた (Chaudhuri *et al. Nat. Commun.* 2016; *Nat. Mater.* 2016) 応力緩和材料の時定数である $10^2 \sim 10^3$ 秒オーダーよりもずっと短く、一般に分子量数万程度

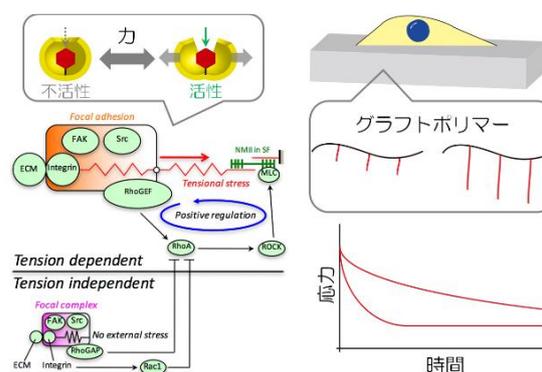


図1 力学的シグナル伝達の模式図と本研究の材料設計指針

の高分子が示すと言われている1秒以下のタイムスケールでの速い緩和の影響に着目した。これは、メカノセンサータンパク質も同程度の分子量であり、分子レベルでの応答のタイムスケールはずっと短いという予想に基づいている。細胞接着性を有する生体高分子であるゼラチンを主骨格とし、そこにグラフト鎖としてメカノバイオロジー研究に最もよく用いられている合成高分子であるポリアクリルアミド (pAAm) を可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により合成し、導入した (図2)。この楕円形ポリマーを化学架橋することによりヒドロゲル材料として用いた。

今回は、未修飾ゼラチン (Gela)、ゼラチンに平均分子量 5 kDa の pAAm をグラフトしたもの (Gela-pAAmS)、および分子量 20 kDa の pAAm をグラフトしたもの (Gela-pAAmL) の三種類をグルタルアルデヒドにより架橋したゲルを用いて比較を行った。そもそもの基材の硬さによる違いの影響を排除するため、ゲルの平坦弾性率を 0.5 kPa 程度に揃えた。作製したゲル上にマウス横紋筋由来筋芽細胞 C2C12 あるいはヒト間葉系幹細胞 hMSC を播種したところ、いずれの場合も高い生存率を保持したまま接着・伸展・増殖が観察され、細胞培養足場として適していることが分かった。C2C12 について、播種2日後の細胞を蛍光染色し、画像解析により形態を評価したところ、Gela-pAAmS ゲル上で最も細胞がよく伸展することが明らかになった (図3)。これにより、少なくとも本研究の材料設計が有効であり、細胞レベルで応答の違いを与える可能性が示唆された。一方で、今回の結果は未だ現象論的な記述に留まっているため、より詳細なメカニズムを明らかにし、材料設計へとフィードバックすることが次へのステップである。

全体として、本年度の達成目標はおおむね達成できたものと考えられる。次年度に向けた課題として、以下の事柄を挙げる。

- ・応力緩和の時定数の正確な決定と材料設計へのフィードバック：高周波数 (=短い時間スケール) 領域まで正確に測定可能な光散乱型レオメータ (既に測定に向けて調整中) を用いて、本年度で得られた材料の応力緩和現象のタイムスケールを正確に決定する。材料調製に関わる細かい条件をさらに検討し、幅広いタイムスケールで緩和を示す材料のバリエーションを増やす。
- ・応力緩和現象特異的メカノセンサーの発見：分子生物学、細胞生物学的手法、ライブイメージングなどを駆使して総合的に解析を行い、メカノセンサーの詳細な特性に対する理解を深めると共に、応力緩和現象特異的に発現するメカノセンサーの発見を目指す。
- ・二次元界面、三次元材料中でのメカノバイオロジーへの展開：本年度に開発した材料について、応力緩和に勾配を持たせた二次元表面や異種材料の界面における細胞動態を観察することにより、材料表面だけでなく材料界面での細胞の振る舞いに関する知見を蓄積し、応用へ繋げる。

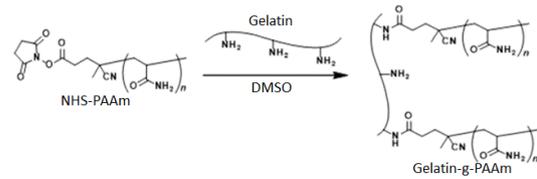


図2 Gela-pAAm の合成

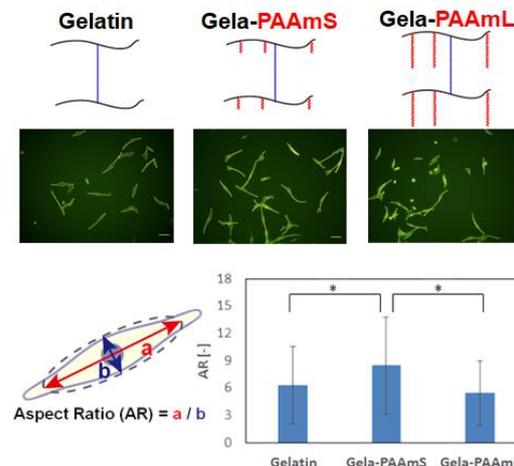


図3 各ゲル上で伸展した細胞の画像と画像解析 (アスペクト比) の比較

キーワード：メカノバイオロジー、バイオマテリアル、高分子ゲル、応力緩和

研究経費（H29年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0円	1,061,957円	0円	0円	108,043円	1,170,000円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

松井翼（機能創成専攻生体工学領域）

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

山際祐輝（化学応用科学科・B4）

発表論文等（平成30年3月31日現在）

研究代表者および主な共同研究者の研究業績のうち、本研究課題に関連するもののみを、現在から順に発表年次を過去に遡って記入してください。

〔雑誌論文〕 なし

〔著書〕 なし

〔学会発表〕 なし

〔その他〕

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

研究代表者：中畑雅樹

申請中

平成30年度 若手研究「迅速な三次元組織体の構築を実現するための形状記憶造形法の開発」

共同研究者：松井翼

申請中

平成30年度 挑戦的研究（萌芽）「非筋細胞間に形成されるアクトミオシン束の抽出方法の確立と力学特性計測」

参考となるHP等

なし