

研究種目：共同研究

研究期間：平成 29 年 10 月～令和元年 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技術として、生体内のモデル系を構築し応用することを大きな目的としてスタートした。細胞内のメカノセンサー分子に特異的にはたらきかける可能性のある新規材料の開発（研究代表者・中畑）、および細胞の力学的シグナル伝達機構の解析と遺伝子操作（共同研究者・松井）をそれぞれ担う研究者から構成された研究組織により、新しく開発した材料上での細胞動態制御のための材料設計指針を確立するとともに、培養基材としての応用を目指した（図 1）。

以下に、研究期間内で得られた主な成果を述べる。

### 1. 細胞動態の制御を目指したゼラチン-合成高分子ハイブリッドポリマーの分子設計

再生医療分野においては、より生体内に近い環境での生体外培養の基盤としてヒドロゲルが注目されている。ヒドロゲル上の細胞動態に影響を及ぼす原因としてこれまでに様々なものが提唱されてきた。ヒドロゲルの力学特性や親水性・疎水性、電荷などの様々な性質が細胞動態に影響を与えることが報告されてきたが、物理化学的な側面から議論されているものが多く、ヒドロゲルを構成する高分子の分子構造に着目したアプローチは少なかった。近年、主鎖ポリマーの側鎖に別のポリマー（グラフト鎖）を導入するというアプローチにより、側鎖ポリマーの分子量や導入率によってゲルの力学特性を制御できることが報告された（Cuthbert *et al. Macromolecules* **2018**, *51*, 9184-9191.）。このようなグラフト構造は生体内の軟骨の主成分であるプロテオグリカンなどでも見られ、その構造に由来する特徴的な機能を持つことが知られている。そこでここでは、細胞足場として汎用的に用いられる高分子を用いて、特徴的な分子構造を有するヒドロゲルを設計し、その構造が及ぼす力学特性への影響や細胞動態制御への可能性を検討した。

Gelatin の側鎖に 2 種類の分子量の合成高分子ポリアクリルアミド (PAAm) を 3 種類の導入率で導入した計 6 種の高分子を合成した（図 2）。これらの高分子から成るヒドロゲルの材料特性、およびヒドロゲル上での細胞動態を評価した。それにより、細胞動態の制御に向けた新しい分子設計指針を提案することを目指した。

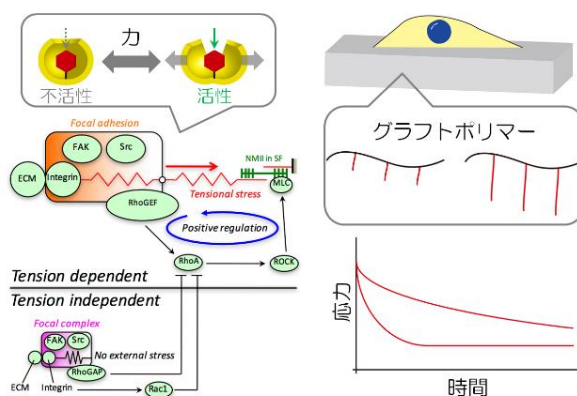


図 1. 力学的シグナル伝達の模式図と本研究の材料設計指針

## 【実験】

### 1) Gela-PAAm の合成

活性エステルを末端に有する重合開始剤である V-501-NHS ester、可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 剤である 2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methyl propionic acid (DDMAT) を用いてアクリルアミドの重合を行った。得られた PAAm の末端を Gelatin のアミノ基と反応させ、Gela-PAAm を合成した。

### 2) ゲルの形成とキャラクタリゼーション

Gela-PAAm のカルボキシル基を PBS 中でアジピン酸ジヒドラジド (AAD) によって架橋し、ヒドロゲルを形成した。このゲルの弾性率、表面へのタンパク質吸着量を測定した。

### 3) ゲル上での細胞培養と増殖率測定

作製したゲル上にマウス由来筋芽細胞 C2C12、マウス由来繊維芽細胞 10T1/2、ヒト子宮頸癌由来細胞 HeLa を播種し、細胞の動態を観察した。

## 【結果と考察】

### 1) Gela-PAAm の合成

合成した 2 種類の PAAm の分子量を HPLC を用いて決定した。また  $^1\text{H}$  NMR スペクトルより PAAm 導入量を定量した結果、混合比によって導入量が制御可能であることが確認された (図 2)。

### 2) ゲルの形成とキャラクタリゼーション

AAD による架橋によってゲルが形成された。粘弾性測定から安定したゲルであることが確認された。圧縮試験によってゲルの硬さを測定したところ、いずれも 5-10 kPa 程度の値を示した (図 3)。また、ゲル表面へのタンパク質吸着量を評価し、PAAm 修飾量による差異を確認した。

### 3) ゲル上での細胞培養と増殖率測定

ゲル上で C2C12、10T1/2、HeLa を培養したところ、ゲルへの接着と増殖が確認された。ゲル上での増殖に注目したところ、分子量の小さい PAAm を有するゲル上では細胞の接着・増殖が抑制され、分子量の大きい PAAm を有するゲル上では増殖が促進されるという傾向があることが分かった (図 4)。また、PAAm の導入量に応じて、動態が異なることも示唆された。細胞の様子を詳しく観察したところ、細胞の接着性に違いがあることが示唆され

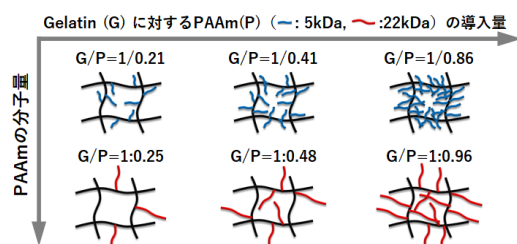


図 2. Gela-PAAm の模式図、PAAm の分子量 ( $M_w$ ) と導入重量比 (Gela/PAAm)

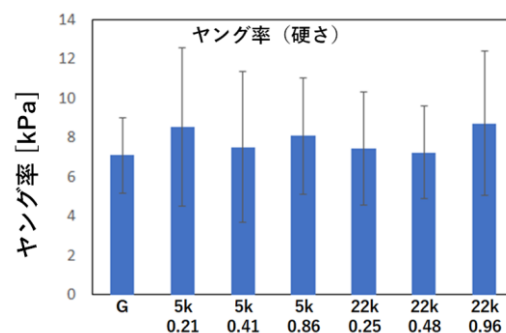


図 3. 調製した各ゲルのヤング率

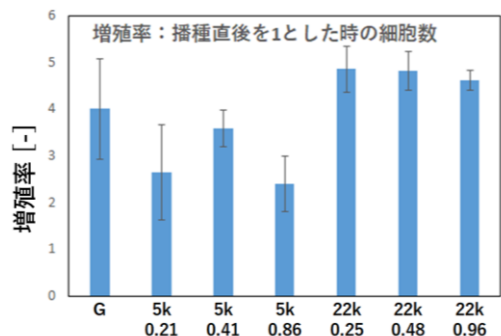


図 4. ゲル上に播種した C2C12 細胞の播種 3 日後の増殖率

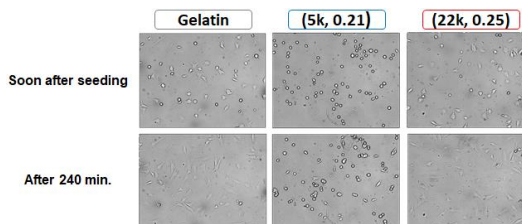


図 5. 各ゲル上に播種した C2C12 細胞の播種直後と播種 4 時間後の様子

# 令和元年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

(図 5)、この接着性の違いが増殖の違いを生んでいるのではないかと現時点では考えている。

ゲルのどのような性質がこの違いを生んでいるのかを細部まで明らかにすることは今回の研究期間内で細部まで明らかにすることはできなかったが、一般的に議論されている親水性・疎水性、電荷、ゲル内の物質拡散係数などの測定結果のトレンドと今回の細胞増殖性のトレンドは必ずしも一致しておらず (data not shown)、複合的な要因が絡んでいるものと思われる。

## 2. ゲル粘弾性と細胞接着の形成、および核内移行シグナル応答を探るための蛍光分子融合タンパク質発現細胞の作製

本研究課題で作製したゲル上における細胞応答を調べるべく、これまでに基質硬さ応答に関与している接着構造タンパク質タリンと、硬さや細胞密度、力に応答し核内へと移行する転写共役分子 YAP1 の蛍光タンパク質融合遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。タリンは複数のビンキュリン結合部位・アクチン結合部位を有しており、力依存的にビンキュリン結合数を増やすことが知られている。そこで接着構造の形成や細胞移動能との関連を明らかにすべく、ビンキュリン結合部位を欠損させたタリン変異体遺伝子を作製し、これらの変異体遺伝子を恒常的に発現する U2OS 細胞株を樹立した。今後、これらの細胞株をゲル上に播種し、蛍光ライブイメージングにより細胞動態機能解析を行っていく。

以上をまとめると、本研究課題では、汎用的な高分子の組み合わせによる新しい高分子構造設計に基づいたヒドロゲルを設計・合成し、グラフトポリマーの分子設計に応じて細胞の動態を制御できる可能性を示した。また、基質の力学特性に応答するタンパク質の動態解析を行うためのツールとして、蛍光タンパク質融合標的分子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。

今後の課題としては、

- ・材料のより詳細なキャラクタリゼーション（表面・バルクの違いも含め）を行い、細胞動態の決定因子を明らかにする。
- ・材料の力学特性を（動的な側面も含めて）より詳細に測定し、メカノセンサー発現遺伝子に変異を加えた細胞の動態との関連性を探る。

以上の二点を中心的に取り組んでいきたいと考えている。

全体としてみると、当初の研究全体計画の通りには必ずしも進まなかったが、高分子の「かたち」という新たな視座を取り入れた材料設計を取り入れ、実際にそれが細胞の動態に違いを及ぼすことを実証することができた。そして何よりも、本未来ラボシステムをきっかけとした連携により、材料科学と生体工学の融合による新分野創出のための共同研究の礎を築くことができた。

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、細胞動態制御

研究経費（R1 年度）の内訳

## 令和元年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

| 備品費 | 消耗品費      | 旅費  | 謝金  | その他 | 合計        |
|-----|-----------|-----|-----|-----|-----------|
| 0 円 | 210,000 円 | 0 円 | 0 円 | 0 円 | 210,000 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（物質創成専攻化学工学領域・M2）

### 発表論文等（令和2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〕

1. 中畑雅樹, 境慎司, 田谷正仁, 「細胞や生体に穏和なゲル形成とその利用法」, 『ケミカルエンジニアリング』, 化学工業社, 64, 1-7 (2019).
2. M. Nakahata, and S. Sakai, “Cross-linking building blocks using a “boronate bridge” to build functional hybrid materials”, ChemNanoMat, 5, 141-151 (2018). [Selected as Cover Feature]
3. 中畑雅樹, 「機能性ヒドロゲルの最前線」, 『生物工学会誌』, 日本生物工学会, 96, 271 (2018).

〔著書〕

なし

〔学会発表〕

1. 中畑雅樹. “分子間相互作用を利用した高分子材料の機能創発”, 材料化学システム工学討論会 2018, 東京, 2018 年 8 月 29 日. [口頭発表/招待講演]

〔その他〕

1. 中畑雅樹, “高分子の「かたち」によって細胞を制御する”, 第 4 回豊中地区研究交流会, 大阪, 2019 年 12 月 17 日. [ポスター発表]
2. 中畑雅樹, “硬さを自在に制御できる材料を用いて細胞の形を制御する”, 第 2 回豊中地区研究交流会, 大阪, 2018 年 1 月 10 日. [ポスター発表]

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

獲得済

## 令和元年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

平成 30-令和元年度 若手研究（代表）「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」

令和元-令和 5 年度 新学術領域研究（分担）「水圏機能材料の電子・イオン機能開拓」  
申請中

令和 2-令和 4 年度 基盤研究 (B)「糖タンパク質と合成高分子の融合により実現するバイオ医薬品デリバリーシステムの構築」

令和 2-令和 3 年度 若手研究（上記と重複申請）「バイオ医薬品デリバリーシステムに向けた糖タンパク質と人工高分子の融合材料の開発」

### 共同研究者：松井翼

申請中

令和 2-令和 4 年度 基盤研究 (C)（代表）「細胞浸潤を担う細胞内ナノアクチュエーターの機能発現メカニズムの解明

令和 2-令和 4 年度 学術変革領域研究 (B)（計画班）「筋収縮力を増強するマイオカインのハイスループット探索」

### 参考となるHP等

なし