

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655181

研究課題名(和文)新規低分子ハイドロゲル化剤の開発と細胞培養基材への応用

研究課題名(英文)Development of New Low-molecular-weight Hydrogelators and Their applications to Cell Culture Materials

研究代表者

鈴木 正浩 (SUZUKI, Masahiro)

信州大学・総合工学系研究科・准教授

研究者番号：30334915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：低分子ゲル化剤のバイオマテリアルへの応用の一つとして、細胞培養基材としての有用性について検討した。当研究室で合成されたL-アミノ酸型低分子ゲル化剤について、アミノ酸の種類、電荷、濃度等の条件を変えて、マウス線維芽細胞の細胞培養の基礎研究を行った。合成したほとんどのゲル化剤が、ハイドロゲル化剤として機能できることがわかった。さらに、マウス線維芽細胞を使って細胞培養基材としての性能を調査したところ、負電荷をもつL-リシン型ハイドロゲル化剤が細胞培養に有効であることがわかった。さらに、骨芽細胞について同様な検討を行ったところ、ゲルへの細胞の接着が弱く、培養基材としては有効ではないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this work (two years), as one of the applications of low-molecular-weight hydrogelators to biomaterials, we studied the application to the cell culture materials. Using our many hydrogelators, the fundamental researches were performed under the different conditions (such as kinds of amino acids, charge of gelators, and concentrations). The L-lysine-based hydrogelators with a negative charge functioned as the most effective cell culture materials when culturing the fibroblast of mouse; especially, L-lysine-based hydrogelators having a sulfonate and a sulfate were very effective. On the other hand, the cultivation of osteoblast on the hydrogels based on the L-lysine hydrogelators was failed.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料科学・有機工業材料

キーワード：超分子ハイドロゲル 細胞培養基材 L-アミノ酸 超分子化学 ナノファイバー

1. 研究開始当初の背景

再生医療では、目的の組織・臓器によって、細胞・細胞の足場・細胞増殖因子を組み合わせることで生体組織の再生を誘導する。細胞は何らかの表面に接着することで分裂することができるため、細胞増殖には接着できる足場が必要不可欠である。生体組織由来の足場は細胞自身が作る細胞外マトリックスであるが、組織が欠損している場合にはこの細胞外マトリックスも欠損している。そのため、細胞外マトリックスを産生するまでの間、人工の細胞外マトリックスを使って足場を確保する必要がある。一方、水溶液や有機溶媒中において、自己組織化にともない超分子構造を形成し溶媒をゲル化する低分子ゲル化剤の開発が多く行われている。このようなゲル化剤は低分子化合物であるにもかかわらず、ゲル中で、超分子ポリマーを形成し、3次元網目構造を構築する。このような超分子ポリマーは、ゲル化剤の構造や溶媒によって、ヘリックス構造、ナノファイバー、ナノリボン、ナノシート、ナノ粒子のような種々のナノ構造制御が可能であるため、このような3次元網目構造の構築を利用し、新規細胞培養基材への応用を目的としている。

2. 研究の目的

本研究では、新規L-アミノ酸系低分子ハイドロゲル化剤の開発とそれらによって作製された超分子ハイドロゲルの再生医療における細胞培養基材として利用することを目的とする。特に、純水・生理食塩水・リン酸緩衝生理食塩水・細胞の培養液等を効率よくゲル化できるL-アミノ酸系ゲル化剤を開発する。また、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの培養を行い、新規人工足場材料を創製した。

3. 研究の方法

①ゲル化剤の合成  
L-アミノ酸型の低分子ゲル化剤として、L-リシン、L-バリン、L-イソロイシン、L-アラニンおよびL-フェニルアラニン誘導体を利用する。ここで、2種類の低分子ゲル化剤を合成する：末端に負電荷を有するL-アミノ酸誘導体(カルボン酸塩、スルホン酸塩、リン酸塩)。末端に両性イオンを有するL-アミノ酸誘導体、特に末端に負電荷あるような両性イオンを持つゲル化剤を合成した。

②ゲル化特性評価  
合成した化合物は、各種水溶液(特に、純水・生理食塩水・PBS・培養液等)に対する超分子ゲルの形成状況、ゲルの物性(ゲル-ゾル相転移温度、ゲル強度、透明性、ゲル化機構、ナノ構造)などの検討を行った。特に、新規低分子ハイドロゲル化剤であるため、基礎的な物性評価も詳細に行った。

③細胞培養試験  
今回、超分子ハイドロゲル上での細胞培養

(二次元培養)について、培養ディッシュ上にハイドロゲル基材を作製し、その上で細胞培養を行った。3次元培養に関しては、データ不足のためここでは、割愛する。

④有効性の評価(細胞、光学顕微鏡・SEM・レーザー顕微鏡・蛍光顕微鏡使用)

低分子ゲル化剤を用いて作製した細胞培養ディッシュの有効性は骨芽細胞および線維芽細胞を用いて実験した。所定日数培養後における以下の評価を行った：(1)顕微鏡による細胞形態観察および(2)細胞増殖率の測定である。

4. 研究成果

(1)ゲル化剤の合成とゲル化能ならびに細胞培養実験

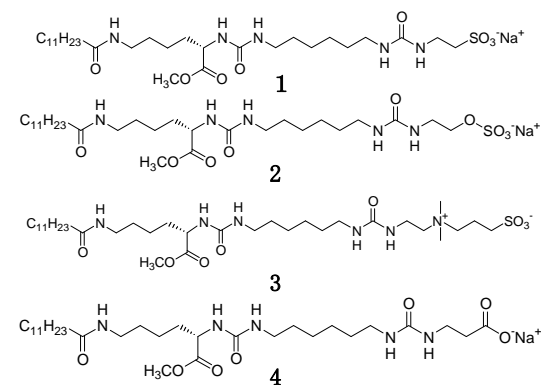
今回、数種類のL-アミノ酸を基盤として、それぞれ、負電荷や両性イオン性を持つ化合物を合成した。合成は、ほぼ既報に従って合成した。また、今回合成したL-アミノ酸誘導体の純水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、培養液に対するゲル化テストを行ったところ、ほとんどの化合物が、ゲル化能を持ち、比較的少量の添加で水溶液をゲル化した。

Table 1に代表的なゲル化剤1-4のゲル化テストの結果を示した。ゲル化剤3は、非常に優れたゲル化能を持つことがわかった。また、ゲル化剤4は、純水や培養液に対するゲル化能がなかったものの、PBSや生理食塩水に対してはゲル化能を示した。

Table 1 Gelation tests of 1-4 in aqueous solutions

	1	2	3	4
H <sub>2</sub> O	GTL(40)	GO(40)	GTL(4)	P
PBS	GTL(8)	GTL(8)	GTL(2)	GO(8)
Saline	GO(8)	GTL(8)	GTL(4)	GO(10)
MEM	GO(4)	GO(10)	GTL(4)	P

Values mean minimum gel concentration (MGC, mg/ml); PBS: Phosphate buffered saline (pH 7.4); Saline: Containing NaCl 8.6 g/L, KCl 0.3 g/L and CaCl<sub>2</sub> 0.33 g/L, MEM: Minimum Essential Medium (pH 7.4); GO: Opaque gel, GTL: Translucent gel, P: Precipitate.



ゲル中のナノ構造は原子力間顕微鏡像(DFM像)より観察し、ゲル化するすべてのゲル化剤は、それぞれほぼ一定の太さ(数十ナノメートル)のナノファイバーを形成していることが観察された。図1はゲル化剤1の

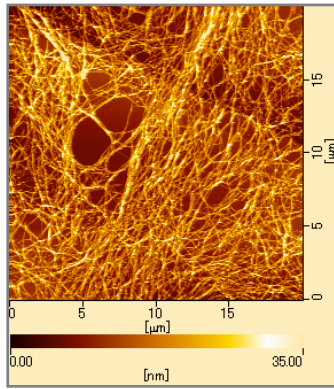


Figure 1 DFM image of the sample prepared from PBS hydrogel of 1.

PBS ゲルから調製したサンプルの DFM 像を示す。

次に、これらのゲル化剤を用いて細胞培養を行なったところ、多くのゲル化剤が、細胞培養基材として不相当であったが、L-リシンを基盤としたゲル化剤は比較的優れた培養基材となる可能性が示唆された。そこで、L-リシン基盤のハイドロゲル化剤 1-4 についての比較検討を行った。

## (2) L-リシン誘導体による細胞培養基材

4 から成る基材は培養液を添加してインキュベーター内に静置した後、ゲル中に析出が見られゲル自体が崩壊してしまった。これは 4 のカルボキシレート基が培養液中に豊富な  $Mg^{2+}$  や  $Ca^{2+}$  と塩を作り析出したと考えられる。ゲル化剤の濃度を調製することで利用は可能となった。その他のゲル基材には変化が見られなかったことから、ゲルと培養液が相互に影響することなく、またインキュベーター内の温度に対しても安定であったため培養基材として用いることが可能であった。

次に、細胞数を調整した細胞懸濁液を基材上に添加して培養し、所定時間培養後、培養液中の非接着細胞を回収しカウントすることによって接着率を算出した。両性イオン基であるスルホベタイン基を持つ 3 を用いた場合、約半数の細胞が浮遊したままであることがわかった。したがって、3 のゲルと細胞間の親和性は低いことが示唆された。これに対して 1, 2, 4 のゲルには培

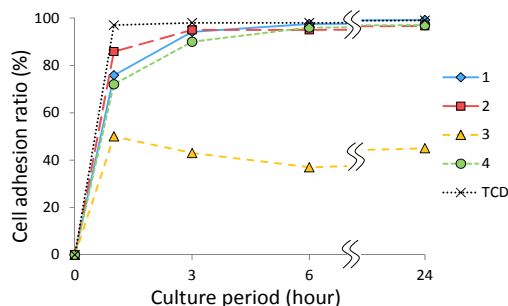


Figure 2. Adhesion ratio of L929 cultured on hydrogels and TCD at several culture periods.

養 1 時間後から 75%以上の細胞が接着し、培養時間が進むにつれて接着率は伸び、細胞培養用 Dish に匹敵するほどの接着率となった。さらに、所定時間培養後の形態観察を行なったところ、1, 3 時間目までは丸いままに接着していた細胞は 6 時間目より徐々に伸展し始める様子が観察された。培養初期にこのような観察結果が得られたことは、1, 2, 4 のゲルと細胞の間には高い基材上に細胞を播種してから 24 時間後の接着率は 95%以上であった。

また、位相差顕微鏡を用いて播種から 24 時間後の細胞の形態観察を行なうと、1 の基材上では細胞が基材に接着し伸展している様子が観察された。丸いままの細胞も混在していたが、コントロールに用いた TCD に接着した細胞のような高アスペクト比の伸展形態をとっていた。一方、3, 4 の基材上では細胞は丸いまま接着しており伸展は見られなかった。一般的に細胞と細胞外マトリクスの間は接着タンパクを介して接着が起るため 1 では接着タンパクと良好な相互作用が働き、細胞は接着・伸展したと考えられる。また 3, 4 ではゲル化剤の正電荷と細胞表面の負電荷による静電的作用によって強く引き付けられるため伸展しなかったと考えられる。以上より、低分子ゲル化剤から成る基材上においても、細胞は接着・伸展し、中でも負電荷で末端にスルホン酸基を有するゲル

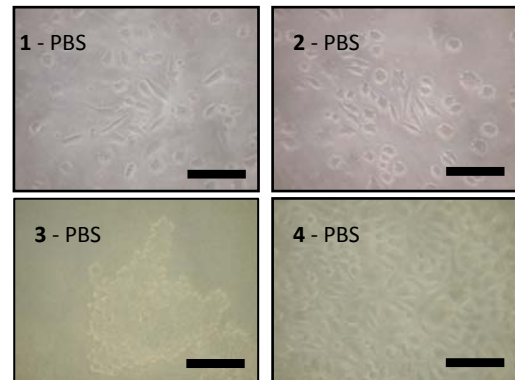
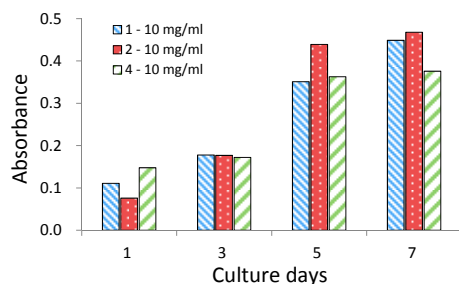


Figure 3. Cell morphology of L929 cultured on hydrogels after 24h. The gelator concentrations are 10 mg/ml, and scale bar is 100  $\mu$ m.

化剤の基材では良好な結果が得られた。

良好な接着を示した基材を用いて 1 週間の培養を行なうことで細胞増殖を観察した。測定には Tetra Color ONE 試薬を用いて増殖活性を調査した。所定日数培養後の吸光度測定の結果から、1, 2, 4 の基材上では培養日数が進むにつれて吸光度の上昇が見られ、細胞が増殖し細胞数が増加していることを示す。また顕微鏡を用いて培養期間中の形態観察を続けたところ、目視での観察からも細胞数が増加していく様子が見られた。最終的な細胞数は一週間で 20~25 万程度まで増加し、播種時の 4 から 5 倍に増殖した結果が得られた。



**Figure 4.** Proliferation activity of L929 cultured on hydrogel scaffolds

以上より低分子ゲル化剤が形成する超分子ゲルで細胞培養が可能であることがわかった。

一方で、マウス骨芽細胞を用いて同様な実験を行ったが、骨芽細胞の接着率が低いことがわかった。これは、超分子ゲルの強度が小さいことが原因であると考えられる。したがって、骨芽細胞への応用では、ゲル強度が大きくなるゲル化剤の分子設計が必要であることがわかった。

#### 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 1 件)

- ① 査読有  
H. Hoshizawa, Y. Minemura, K. Yoshiawa, M. Suzuki, and K. Hanabusa, Langmuir 2013, 29, 14666-14673. “Thixotropic Hydrogelators Based on a Cyclo(dipeptide) Derivative”

[学会発表] (計 6 件)

- ① The international Union of Materials Research Society (IUMRS) International Conference in Asia (IUMRS-ICA) 2014, August 24-30 in Fukuoka, Japan (Fukuoka University). “Application of Supramolecular Hydrogels Based on L-Lysine Hydrogelators to Cell Culture Materials” by M. Suzuki, M. Nasu, K. Hanabusa.
- ② CEMS International Symposium on Supramolecular Chemistry and Functional Materials 2013 in Tokyo, Japan (Takeda Hall, The University of Tokyo), December 15-17, 2013. “Thixotropic Supramolecular Hydrogels based on Cyclodipeptide Derivatives” M. Suzuki, H. Hoshizawa, S. Oi, and K. Hanabusa. P-16.(2013年12月16日、東京大学武田記念ホール).
- ③ 鈴木正浩・那須将樹・寺本 彰・阿部康次・英 謙二 “低分子ハイドロゲル化剤の細胞培養基材への有用性” 第64回コロイドおよび界面化学討論会(2013年9月20日、名古屋工業大学).

- ④ 近藤萌美・鈴木正浩・英 謙二 “L-アミノ酸を基盤とした新規両性イオン性低分子ハイドロゲル化剤のゲル化特性” 第62回高分子討論会(2013年9月11日、金沢大学角間キャンパス).
- ⑤ 植松 悠・鈴木正浩・英 謙二 “フィトスフィンゴシンを基盤とする低分子ゲル化剤の開発” 平成25年繊維学会年次大会(2013年6月12日、タワーホール船堀).
- ⑥ 鈴木正浩・那須将樹・寺本 彰・阿部康次・英 謙二 “低分子ハイドロゲル化剤の細胞培養足場基材への応用” 日本化学会第93春季年会(2013年3月22日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス).

[図書] (計 1 件)

- ① 鈴木正浩・英 謙二、ゲルの安定化と機能性付与・次世代への応用開発 第2章ゲル化剤の開発、第1節「L-リシン誘導体による2成分系低分子ハイドロゲル化剤の開発」p105-109. 技術情報協会 2013年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 正浩 (SUZUKI, Masahiro)  
信州大学・総合工学系研究科・准教授  
研究者番号：30334915