

補助事業番号 2023M-290
補助事業名 2023年度 光照射により細胞あるいは細胞シートを剥離可能な新規樹脂補助事業
補助事業者名 名古屋工業大学 工学専攻 生命・応用化学系プログラム 水野研究室

1 研究の概要

シェラックは「高い生体安全性」と「生体親和性」、「優れた成形性（ $T_g \sim 80^\circ\text{C}$ の熱可塑性）」を有する天然樹脂として、主に錠剤やチョコレート菓子などへの可食性コーティング材などに産業利用されている。しかし哺乳類細胞に対する接着・増殖性を全く持たないため、「高い生体安全性」を持ちながらも医用材料を志向した「細胞接着性を持ったバイオマテリアル」としての利用検討・製品開発は、これまで全くなされていなかった。しかし最近我々のグループにおいて、ごく僅かな化学修飾を施すことで、シェラックに対して哺乳類細胞に対する接着・増殖性を付与できることを発見した。そこで本研究では、この化学修飾する置換基を光照射により脱離可能な置換基とすることで、光照射により元の細胞接着性のないシェラックに戻すことができ、結果細胞接着性を失うシェラックの開発が可能か検討した。またこれを細胞培養材料として用いることで、この表面で培養された細胞、細胞シートを光により剥離可能となるか検証した。その結果、種々の光脱離性置換基について検討を行うことで、光照射により完全に細胞接着性を失わせるシェラックの開発に成功した。これにより、このシェラックのフィルム上で培養した細胞の光による効率良い回収が可能となった。



図1 精製シェラックの外観（左）と表面コートされたチョコレート菓子の例（右）

2 研究の目的と背景

低分子医薬品、バイオ医薬品に加え、細胞そのもの、あるいは細胞シートを医薬品として利用する（再生医療に基づく）新たな治療法の発展が予見されており、これらを安価に大量培養できる要素技術へのニーズが高まっている。現状ポリスチレン製の培養ディッシュなどで培養した細胞を回収する際には、加水分解酵素トリプシンによる処理が主に用いられている。しかしこの方法は、プラントレベルでの大量培養技術としては操作性が悪く、更に細胞シートの生産まで考えた場合には、酵素処理が細胞間接着に関する蛋白質まで分解しシートが崩壊してしまうため、この利用には向かない。一方で温度変化により細胞接着性の変化するポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を用いた培養材料が開発され、細胞シートであっても培養後回収可能な技術開発は進んでいる。従ってトリプシンフリーで細胞を簡単に回収可能な新技術の発展は、細胞や細胞シートのプラントレベルでの大量培養技術の発展において魅力的である。

一方最近我々は、高い生体安全性を持ち食品にも用いられている天然樹脂シェラックに着目し、ここから新たな細胞接着性のバイオマテリアル開発が可能か検討を進めていた。その結果、シェラックの化学構造にわずかな化学修飾を導入することで、哺乳類細胞に対する接着・増殖性を付与できることを発見した。元々のシェラックは細胞接着性を全く持たないため、この結果はここで導入する置換基を光脱離性のものに置き換えることで、光照射により細胞接着性を失う培養材料が設計可能であることを予見させた。光により細胞を接着しにくくする培養材料開発に関する報告は多々あるが、その材料表面で培養した細胞を光により回収するまで可能な培養材料は、実はその成功例は現在においても限られている。特に塗ることも可能な樹脂製材料であれば、プラントレベルでの細胞生産における要素技術としても魅力的である。

3 研究内容

(1) 光照射により細胞接着性を失うシェラック樹脂の開発

シェラックは樹脂酸とヒドロキシ脂肪酸の交互オリゴエステルからなるため、我々はこのポリマー鎖末端のカルボキシ基を化学修飾の導入位置として着目した。以前の我々の研究において、ここへ種々の置換基を導入することで、哺乳類細胞に対する接着・増殖性が付与可能とわかっている。そこで本研究では、ニトロベンジル系、クマリン系の光脱離性置換基を用いて検討を行ったところ、クマリン系置換基の1つを用いることで、光照射前は優れた細胞接着・増殖性を保持する一方で、光照射後は完全に細胞接着・増殖性を失う性質が得られることがわかった。また光照射前後のシェラックに関して質量分析を行うことで、当初の想定どおりに光の照射後には置換基が脱離し、元の精製シェラックに化学構造が戻っていることも確認され、この脱離割合は光の照射時間が長いほど高まることもわかった。以上のことから、光の照射により細胞接着性を失うセラック樹脂の開発に成功した。

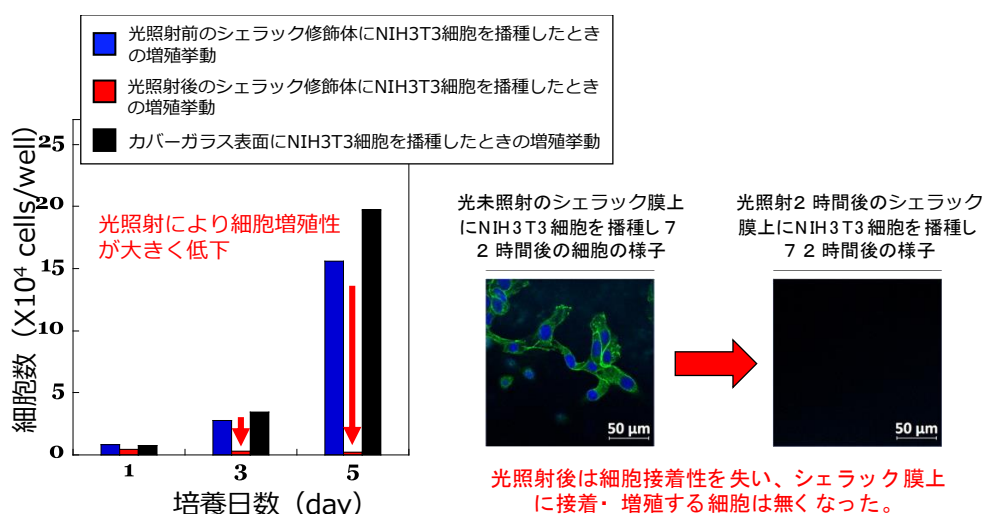


図2 クマリン系置換基を導入したシェラックのスピコート膜上でNIH3T3細胞を培養した場合の接着・増殖挙動。左のグラフは培養日数の増加による細胞数の増加挙動を示し、光照射後のシェラックでは全く細胞が増殖しないことが分かる。右の蛍光顕微鏡写真は光未照射のシェラック膜上で培養された細胞の様子と光を2時間照射後のシェラック膜上で培養した細胞を比較した結果となる。光照射後のサンプルでは細胞が接着増殖しないため、細胞の存在が確認されなかった。

(2) 光照射による細胞あるいは細胞シートの回収

クマリン系置換基を導入したシェラックのスピコート膜に対して、NIH3T3細胞を播種して3日間培養後、光照射による細胞回収実験を行った。該当する光を0.5、1.0、2.0時間照射後、培養液の上清を集め、スピコート膜から剥がれてきた細胞数を血球計算盤にてカウントした。その結果、光の照射時間の上昇に伴い回収できる細胞数に上昇が見られ、15mmφのスピコート膜で培養した場合で、2.0時間の光照射により1.0×10⁴個の細胞回収が可能であった。一方で細胞シートの回収にもこのシェラックベースの培養材料が利用可能か、Caco-2細胞を用いて評価を行った。Caco-2細胞はコンフル後も継続して培養を行うことでシート化することが知られており、シート形成後に光照射を行い剥がすことが可能か検討を行った。しかしシェラックのスピコート膜が脆いことで、剥がす途上で膜が割れてしまい、細胞シートを剥がすまでは成功しなかった。しかしこれは、今後他の樹脂を混合しフィルムにしなやかさを付与することで、問題解決が可能と考えている。

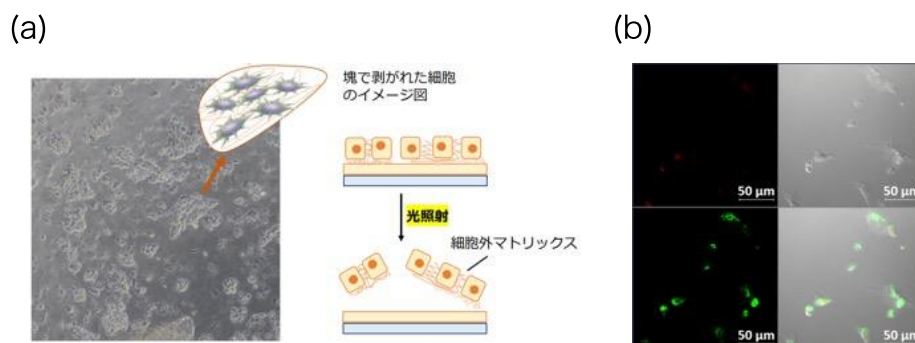


図3 クマリン系置換基を導入したシェラックのスピンコート膜上でNIH3T3細胞を3日間培養した後の光照射による細胞回収挙動。(a)は光照射によりシェラック膜上から剥がれてきた細胞の様子。細胞外マトリックスを壊すことなく細胞が剥がれてきているため、複数の細胞がフィルム状に剥がれてきている。(b)は剥がれてきたNIH3T3細胞に対してLive-Deadアッセイを行った結果を示す。生きている細胞は緑色蛍光を示し、死んでいる細胞は赤色蛍光を示すが、剥がれてきた細胞はほぼ生きてまま回収できていることが分かる。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

細胞そのもの、あるいは細胞シートを医薬品として利用する（再生医療に基づく）新たな治療法の発展が予見されており、これらを安価に大量培養できる要素技術へのニーズが高まっている。セラックはもともと生体安全性の高い天然樹脂として知られており、さらに価格も非常に廉価である（5円/g）。治療に用いることが可能な細胞、細胞シートなどは、安価に生産できると共に、安全性も求められる。化学修飾を一部導入しているため、生体安全性に関する公的機関での調査は慎重に行う必要があるが、ここがクリアできれば、実験室レベルでの研究試薬から工場レベルでの細胞や細胞シート生産における要素技術として、社会実装が期待される。また一方で、現在世界的な人口増加に伴い、将来の世界的な食糧不足が危惧されている。これに対する解決策の一つとして培養肉のような人工食品に関する研究開発が進められている状況にあるが、食べられる細胞培養材料であるシェラックは、人工食品分野での将来的なニーズも期待される。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

再生医療の一つの目標に、iPS細胞などの幹細胞から、人工的に生体外で、組織や臓器の構築を目指すという大目標があるが、現状、大きなサイズの組織や臓器の構築には至っていない。この問題解決のためには、細胞の分化や増殖の制御に関わる様々な生理活性蛋白質を予め3次元的に配置し、未分化細胞に対して効率よく働かせつつ目的の組織や臓器構造への誘導を行うというのが、一つの方法として提案されている。このような社会的要請を鑑み、本申請者は2012年辺りから、蛋白質機能を活かした生理活性材料開発とこれを再生医療分野に応用する研究に取り組み始めた。種々の研究予算のサポートをもとに研究を進めることで、蛋白質徐放性を保持した不織布型の細胞培養基材の開発と細胞増殖性のコントロールまで、これまでに成功している。しかしこれらの研究を通して感じてきたことは、「生体吸収性」と「細胞接着・増殖性」を保持しつつ、世にまだ知られていない新規バイオマテリアルの開発を行うことが、この分野の研究進展においては非常に重要であることに気づき、天然樹脂であるシェラックをベースとした新規バイオマテリアル開発に取り組みはじめたというのが、本研究に取り組むようになった経緯である。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

<学術論文投稿>

“Design of Cell Adhesive Shellac derivatives and endowment of photo-switchable cell-adhesion properties”

Yurino Sunakawa, Mai Kondo, Yasushi Yamamoto, Tomohiko Inomata, Yasumichi Inoue,
Daisuke Mori, Toshihisa Mizuno*
ACS Applied Bio Materials, **6**, 5493–5501 (2023).

<書籍への原稿投稿>

書籍名「タンパク質、細胞の吸着制御技術」 技術情報協会編
第7章 タンパク質、細胞の吸着促進をさせる表面処理技術と材料の開発
「8節 セラックへの細胞接着性の付与、水野 稔久」
(2024年6月7日に原稿を寄稿)

<知財出願>

「セラック修飾化物」
森大輔、安藤優花、水野稔久、砂川祐莉乃、近藤麻衣
特願2023-223235、令和5年12月28日出願

7 補助事業に係る成果物

(1) 補助事業により作成したもの

本事業の研究目的となる、光照射により細胞接着性を失う光応答性セラック樹脂の開発を行ったため、これが本事業の成果物となる。写真は、比較となる元々の精製セラック（中央上）、光により細胞接着性は変化しないものの細胞接着性の付与されたセラック（下段左）、光により細胞接着性を失うセラック（下段右）を示す。



精製セラック



細胞接着性の付与された
セラック



光照射により細胞接着性
を失うセラック

(2) (1) 以外で当事業において作成したもの

今後これらを用いた製品化の検討は進めていく予定ですが、現状はラボスケールでの樹脂開発のみとなります。

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 名古屋工業大学 工学部
(ナゴヤコウギョウダイガク コウガクブ)
住 所： 〒466-8555
愛知県名古屋市昭和区御器所町
担 当 者： 准教授 水野 稔久 (ミズノ トシヒサ)
担 当 部 署： 生命・応用化学科 (セイメイ・オウヨウカガクカ)
E-mail: toshitcm@nitech.ac.jp
U R L : <https://www.nitech-mizuno.com>