

光によって瞬間にゲル化する天然由来機能性高分子の開発と3D細胞組織の形成制御

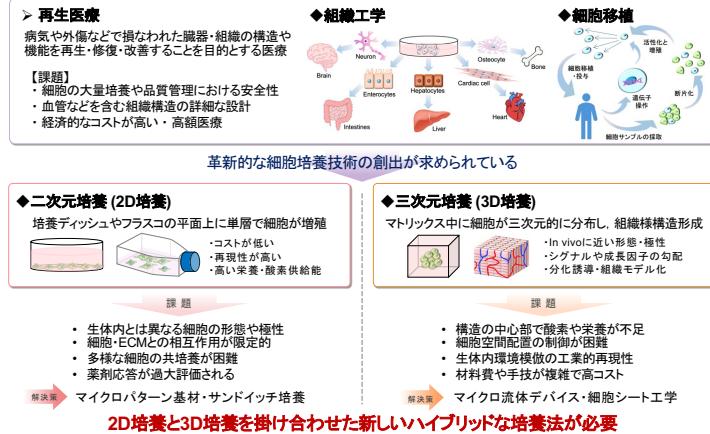
産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 沖原 正明

AIST
Create the Future, Collaborate Together

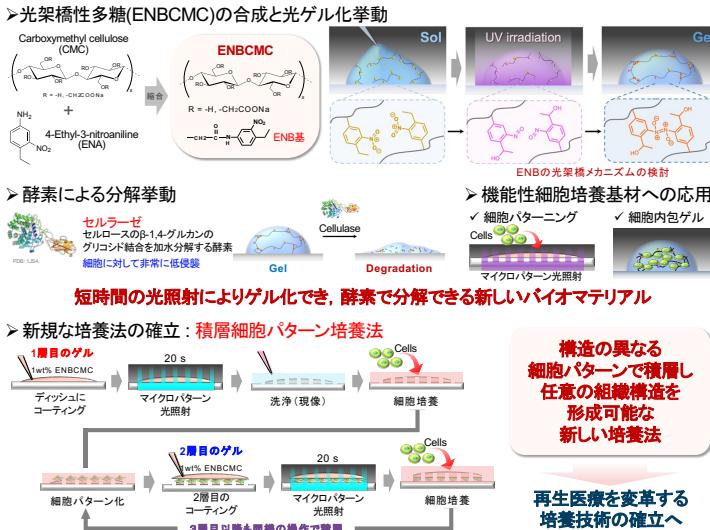
1. 緒言

従来の細胞培養は、ポリスチレンディッシュなどを用いた二次元(2D)培養が一般的である。しかし、創薬研究などにおいては、生体内環境を模倣する三次元(3D)培養系の構築が不可欠である。3D培養では栄養・酸素供給や細胞の空間配置制御に課題がある。そこで本研究では、温和な条件で分解可能なカルボキシメチルセルロース(CMC)の側鎖に、光二量化反応性をもつ o -ethyl-nitrobenzyl(ENB)基を導入した新規光架橋性多糖(ENBCMC)を開発した。ENBCMCの低濃度水溶液に光照射することで、ENB基が二量体を形成し、架橋点として作用することで物質透過性の高いハイドロゲルの形成が期待できる。また、CMCはセルラーゼにより分解可能であり、形成されたゲルを培養細胞に対して非侵襲的に分解できることが期待される。本研究では、ENBCMCの光ゲル化および酵素分解挙動を評価し、さらにイングル培養やパターン形成を通じて、新たな3D細胞培養系の構築を試みた。

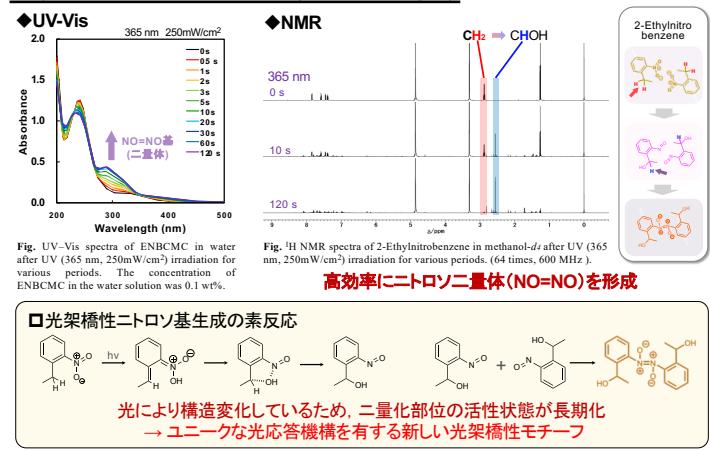
2. 研究背景



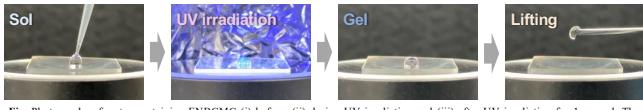
3. 光応答性天然高分子と新規3D培養系の創出



4. 光二量化メカニズムと光ゲル化挙動



光照射によるゲル化挙動(ポリマー濃度 1wt%、光照射 365 nm 1 s)



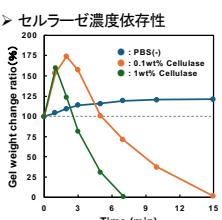
5. ハイドロゲルの分解挙動

セルラーゼによるゲルの分解挙動
ポリマー濃度 0.5wt%・光照射 365 nm 30 s
セルラーゼ濃度 1wt%



Fig. Photographs of the degradation behavior of ENBCMC hydrogels over time when 1 wt% cellulase is added. ENBCMC hydrogel gelled after 30 seconds of UV (365nm) irradiation at 0.5wt% polymer concentration.

細胞毒性の低い分解酵素(セルラーゼ)により
オンデマンドでゲルを即時分解可能



6. In gel 3D培養によるスフェロイド化

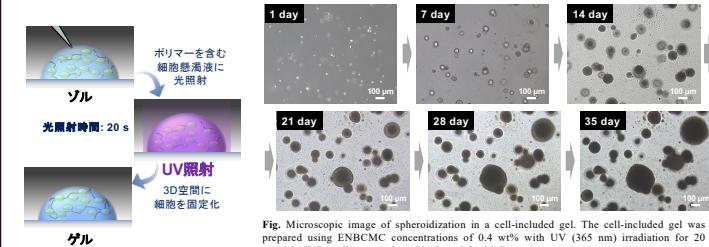


Fig. Microscopic image of spheroidization in a cell-included gel. The cell-included gel was prepared using ENBCMC concentrations of 0.4 wt% with UV (365 nm) irradiation for 20 seconds. HeLa cells were cultured in the gel for 35 days.

三次元空間に細胞を固定化でき、長期培養によって最大で400μmのスフェロイドへと成長

7. 細胞パターンニングと細胞パターンのシート化

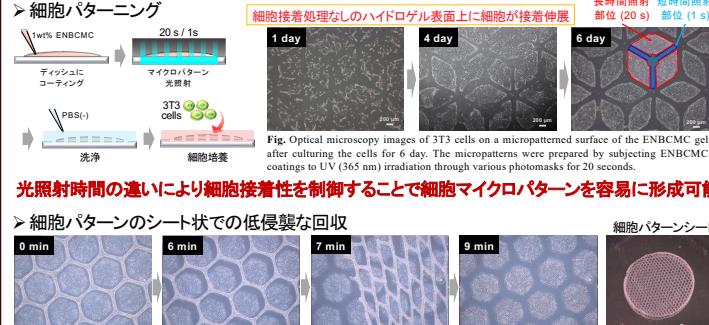
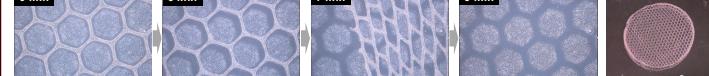


Fig. Optical microscopy images of 3T3 cells on a micropatterned surface of the ENBCMC gel after culturing the cells for 6 day. The micropatterns were prepared by subjecting ENBCMC coatings to UV (365 nm) irradiation through various photomasks for 20 seconds.

光照射時間の違いにより細胞接着性を制御することで細胞マイクロパターンを容易に形成可能

細胞パターンのシート状での低侵襲な回収



セルラーゼ添加により微細な細胞パターン構造を維持したままシート状で簡単に回収可能

8. 新規培養法：積層細胞パターン培養

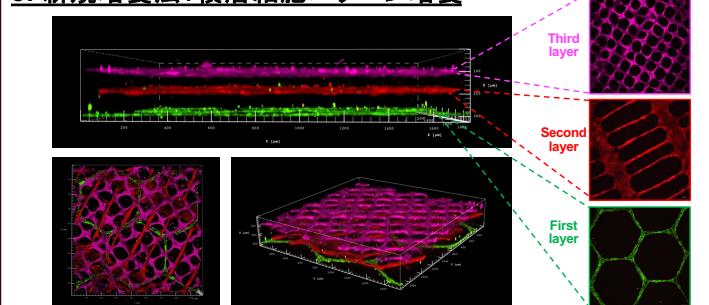


Fig. Z-stack 3D images of three-layer stacked 3T3 cell pattern cultures in 1 wt% ENBCMC hydrogel obtained by confocal laser scanning microscopy: (a) top view, (b) oblique view from above, (c) side view. Cells were stained green for the first layer, orange for the second layer, and deep red for the third layer by using CellTracker dye.

構造の異なる細胞パターンで積層すること、任意の組織形成が可能な新しい培養技術へ

9. 総括

- 高効率な光二量化反応を示す o -ethyl-nitrobenzyl(ENB)基を導入した新規光架橋性多糖(ENBCMC)の合成に成功した。
- ENBCMCは、1秒間の光照射でゲル化し、セルラーゼ添加により分解することがわかった。
- ENBCMCを機能性培養基材として検討した結果、In gel培養ではスフェロイドの成長を促進し、2D培養では簡便に細胞マイクロパターンを形成でき、細胞パターンシートとして回収できた。
- さらに、ENBCMCを用いることで、構造の異なる細胞パターンで積層すること、任意の組織形成が可能な新しい培養技術の創出につながることを見出した。