

イオン性の液体表面で幹細胞の培養に成功

～再生医療に貢献する細胞資源の培養効率、大幅引き上げに向けて～

配布日時：2024年2月28日14時

NIMS（国立研究開発法人物質・材料研究機構）

概要

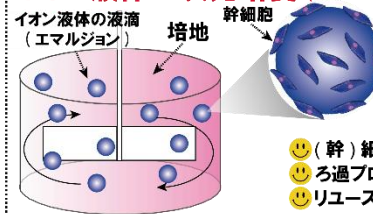
1. NIMSは「イオン液体」¹⁾とよばれる液体の表面で、再生医療でも広く利用されるヒト間葉系幹細胞²⁾を培養する技術を確立しました。従来はプラスチック皿で行われてきた有用細胞資源の培養効率を大幅に引き上げることが可能になると同時に、培養時に排出されるプラスチックごみの削減につながる事が期待されます(図1)。イオン液体は蒸発しないため、環境に拡散していきません。これまでは使い捨てにされてきたプラスチック皿と異なり、細胞培養後に回収、洗浄、加熱/乾燥による滅菌まで可能で、環境に優しいリユース可能な“液体”細胞培養基材に展開される重要な一歩となります。

二次元培養（量産に不向き／環境負荷の懸念）



- ☹️ 二次元平面のため培養空間を効率的に使えない
- ☹️ 細胞足場が使い捨てのためプラスチックごみが排出される

イオン液体三次元培養（大量培養／足場のリユース可能）



イオン液体

- ★水と混ざらない
- ★無毒性、細胞培養可
- ★洗浄後、再利用可
- ★蒸発せず環境に拡散しない

- 😊 (幹)細胞の培養効率（面積）↑
- 😊 ろ過プロセスによる細胞回収
- 😊 リユース可能なイオン液体分散相

図1 従来の二次元細胞培養と本研究の提案するイオン液体三次元培養の比較

2. 通常、再生医療等に適用可能な(幹)細胞の培養、増殖にはプラスチック皿のような固体の平面が用いられます。これに対して水と混ざり合わない油のような液体の表面で細胞が培養できれば、その液体をドレッシングのように培養水溶液中に分散させて、培養効率(体積当たりの有効な培養表面積)を大幅に引き上げられるため、古くから研究が進んできました。これは増え続けるプラスチックゴミを削減できるばかりか、液体の特徴を活かしたろ過による細胞の分離・回収や、培養プロセスの完全オートメーション化などの技術革新が望めます。その一方で、これまで研究に用いられてきたフッ素系液体は細胞毒性こそ低いものの、プラスチック皿より高価であり、なおかつその自然環境下における低い化学的分解性が「永遠の化学物質」「PFAS問題」³⁾としてクローズアップされており、細胞培養技術の進化に対する代償として、その高コスト化と高環境負荷が懸念されていました。

3. 今回NIMS研究チームは、水と混ざり合わず、なおかつ細胞毒性が極めて低いイオン液体を見だし、その表面でヒト間葉系幹細胞を培養することに成功しました。イオン液体はプラスとマイナスのイオンのみからなる液体ですが「液体なのに蒸発しない、沸騰しない」ことが大きな特徴です。細胞培養に用いた液体を洗浄、加熱、乾燥、滅菌することで、使い捨てることなく再利用することが可能になります。さらに研究グループでは、イオン液体のイオンの組み合わせによって、液体表面に吸着するタンパク質の吸着状態が大きく変化し、そのことが優れた液体足場の形成に重要なことをつきとめました。

4. 今後、研究チームはイオン液体表面の幹細胞の分化状態を制御する技術の確立を目指すとともに、分散培養による有用な幹細胞資源の培養効率引き上げ、プラスチックごみを出さない培養プロセスの代替をにらみ、細胞培養に適切なイオン液体の洗浄、滅菌プロセスの開発を進めていきます。

5. 本研究は、高分子・バイオ材料研究センターの上木岳土主任研究員と中西淳グループリーダーらのグループによる成果で、日本学術振興会 科学研究費助成事業(23H02030 (研究代表: 上木岳土), 22H00596, 23K17481(研究代表: 中西淳))の支援を受けて進められました。

6. 本研究成果は、2024年2月26日にAdvanced Materials誌にオンライン掲載されました。

* 物質・材料研究機構は、その略称をNIMS（National Institute for Materials Science）に統一しております。

研究の背景

世界最速で高齢化が進む我が国においては、幹細胞を用いる再生医療工学の確立が不可欠です。一般的に、再生医療の利用に有用な(幹)細胞資源の培養、増殖には、使い捨てのプラスチック皿が用いられています。細胞培養を行う際は、まずプラスチック皿の中に「培地」を導入します。培地は細胞という「種」を生育するために必要な栄養(タンパク質)などが溶け込んだ、いわば「肥料」にあたります。細胞はその培地のプールで満ちたプラスチック皿に蒔かれます。適切な条件にプラスチック皿を置いておくと、細胞はプラスチック皿と培地の界面で自発的に成長し、増殖します。最終的に発育、分化した細胞は、トリプシンと呼ばれる酵素による生化学反応により皿から剥離、精製され、再生医療の現場等で活躍することになります。この手法はオーソドックスに行われている細胞培養方法ですが、培養空間がプラスチック皿と培地が接する内部の二次元平面(皿の底面)に制限されるため、単位容積あたりに培養できる細胞数が少なく、その効率が低いことが問題でした。これに対して、培地と混ざり合わない液体(フッ素系液体等)の表面で細胞を生育する「液体界面培養」が提案されてきました。液体の足場は、プラスチック皿と異なり、自在に変形できるため、培地の中に液滴のような形で浮遊、分散させることも可能です。このような培養形態にすると、限られた空間において培養表面積を圧倒的に引き上げることができます。培養できる細胞の数は、培養できる面積に比例するので、培養面積の底上げは培養時間の短縮、ひいては医療コストの削減に直結します。また、液体の変形性を利用することで生育後の細胞をトリプシン処理のような生化学反応に頼ることなく、ろ過、という低コストかつ工業的な汎用プロセスで回収することも可能となります。このように次世代の細胞培養技術として期待されている液体界面培養ですが、液体足場としてこれまでに広く検討されてきたフッ素系液体は、プラスチック皿より高価であるにも係わらず、使い捨てでの利用が想定されています。また最近では、フッ素系液体の自然環境下における極めて低い化学的分解性が「永遠の化学物質」「PFAS 問題」³⁾として世界的にクローズアップされています。このような状況を鑑みると、フッ素系液体を用いることはむしろプラスチック皿よりも環境にダメージを与えてしまうのでは、と考えられはじめていました。事実、液体界面培養で頻繁に用いられている「Fluorinert™」や「Novec™」のようなフッ素系液体は、2025 年末までにすべてが製造中止になることが決定しています。つまり液体界面培養はプラスチック皿を用いた従来の細胞培養プロトコールに替わる、優れた要素技術として研究されてきましたが、今や高コスト化と高い環境への負荷が懸念される状況にありました。

研究内容と成果

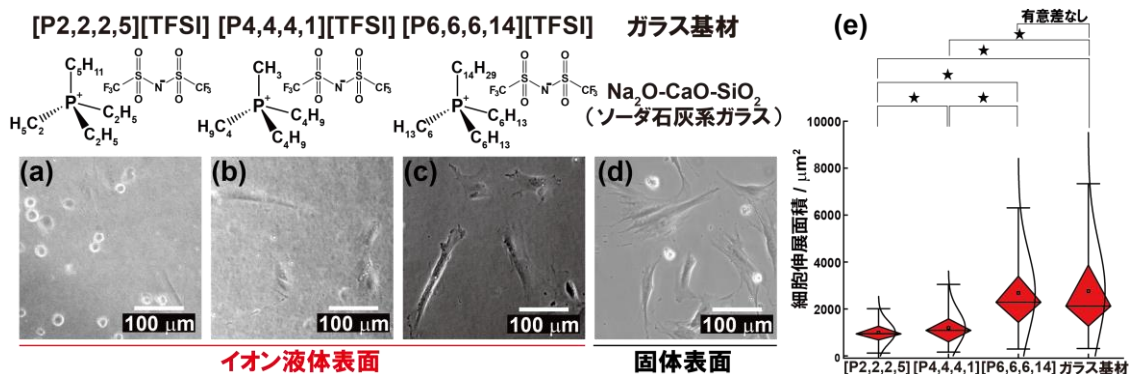


図 2 今回の研究でもちいたイオン液体の化学構造と(a)-(d)各イオン液体界面におけるヒト間葉系幹細胞(hMSCs)の顕微鏡像。(e)各イオン液体およびガラス基材界面における細胞伸展面積の統計解析の結果。[P6,6,6,14][TFSI]というイオン液体の界面ではガラス基材と同程度、細胞が伸展していることがわかる。図中の★は統計的に有意な差があることを示している。

NIMS 研究グループはこの問題を「イオン液体」を用いることで解決しました。イオン液体はプラスとマイナスのイオンのみからなる室温で溶融した状態の塩です。液体であるにもかかわらず、蒸発せず、沸騰もしない不思議な性質をもっており、適切に洗浄、滅菌すれば、培養のたびに廃棄することなく繰り返し使うことができる環境に優しい液体です。研究グループは、まずフッ素系液体と同じように培地と互いに混ざり合わず、なおかつ細胞に毒性を示さないイオン液体を探索しました。その中で細胞毒性を示さず、かつ水と混ざり合わない、いくつかのイオン液体を見出しました。さらに細胞播種前の処理条件を検討す

ることイオン液体の界面で細胞を培養することに世界で初めて成功しました。図2で示すように、ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)は各種イオン液体の界面に接着し、なおかつ液体の化学構造に応じてその接着性や伸展度が大きく変化します。特に図2(c)に示したイオン液体の界面で細胞は大きく伸展して接着していることがわかりました。その細胞伸展面積は固体であるガラス基材上のそれに匹敵します(図2(d))。一般的に接着細胞の伸展度は、接着する表面の固さによって変化し、柔らかい界面では丸くなり、固い界面では伸び広がります。細胞はイオン液体界面をガラスと同じくらい固いもの、と認識していることを意味する非常に興味深い結果です。次に我々は原子間力顕微鏡(AFM)を利用してイオン液体の界面をナノメートルオーダーの微小な分子レベルの空間で観察しました。その結果、界面の細胞は「イオン液体そのものに接着しているわけではない」ということがわかりました。培地に溶存するタンパク質が、イオン液体の界面に集積、吸着して固体の薄膜を形成しており、細胞はその力学的な固さを感じ取って接着性を変化させていたのです(図3)。さらに我々は、イオン液体の界面でタンパク質の薄膜が形成されていく過程を高速AFM測定によって可視化することに成功しました。その結果、タンパク質でできた固体の薄膜の形成速度は、

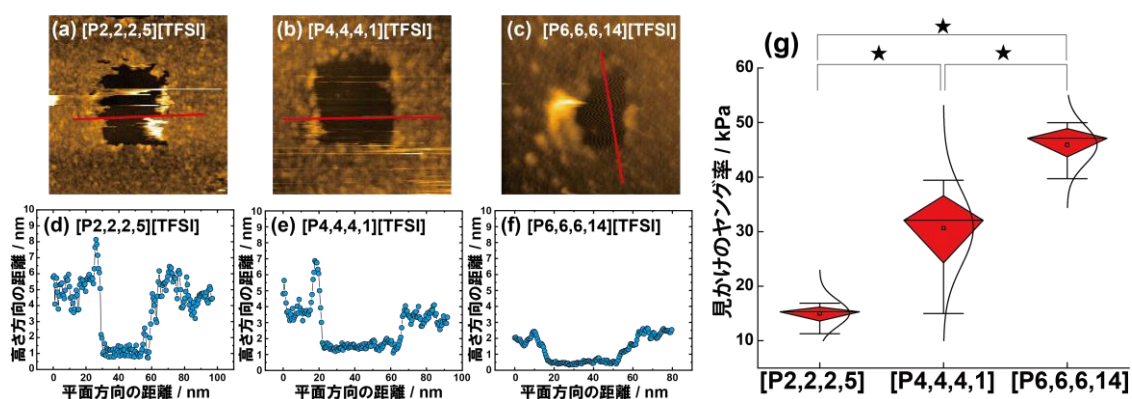


図3 (a)-(c)各イオン液体の界面で形成されるタンパク質固体薄膜。厚みを評価するため薄膜自身を微小な針で剥がしとっている。(d)-(f)各イオン液体に形成されたタンパク質固体薄膜の厚み測定。および(g)タンパク質固体薄膜の力学測定。イオン液体の構造に応じて固体薄膜の厚みや固さが変化する様子がわかる。図中の★は統計的に有意な差があることを示している。

その形成初期におけるイオン液体界面でのタンパク質のブラウン運動⁴⁾の速さに大きく依存することがわかりました(図4(a)-(f))。さらにこのブラウン運動の速さはイオン液体を構成する、特にプラスイオン(カチオン)の化学構造に大きな影響を受けているところまで突き止めました(図4(g))。以上の検討から細胞の接着を液体界面でしっかり支える、力学強度に優れる固体薄膜を形成するためのイオン液体の要求構造が明らかになりました。また我々は液体の表面のみならず、イオン液体自身を固体薄膜化(ゲル化)した材料形態に加工することで細胞の接着を促進し、生存を維持できることも可能であることを見出しました(図4(h))。これは従来の界面培養で用いられてきたフッ素系液体ではなしえなかった、新しい発想に基づく方法論です。

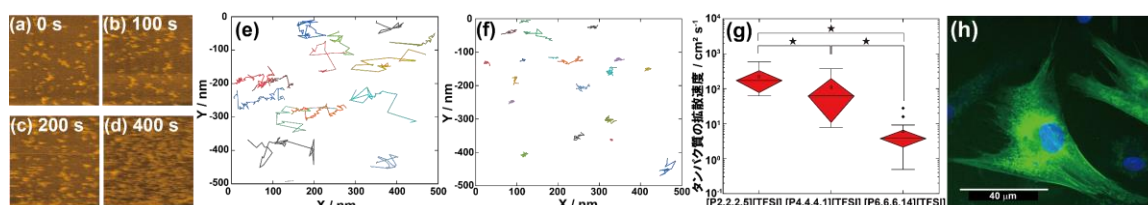


図4 (a)-(d)[P6,6,6,14][TFSI]の界面でタンパク質固体薄膜が形成されていく様子。(e)[P2,2,2,5][TFSI]および(f) [P6,6,6,14][TFSI]界面においてタンパク質が膜化する際、個々のタンパク質粒子の重心を追跡した結果。イオン液体の構造に依存してタンパク質粒子の運動性が大きく変化する様子がわかる。(g)これらタンパク質の運動性を拡散係数(ブラウン運動の速さ)として統計的に定量化した結果。図中の★は統計的に有意な差があることを示している。(h) イオン液体をゲル化させたときの界面において細胞が接着、伸展している様子。

今後の展開

今回、我々はイオン液体の二次元表面においても、プラスチック皿やフッ素系液体と同様に細胞が接着し、その生存が維持可能であることを世界で初めて示しました(図5)。今後、細胞の培養面積を引き上げるべく分散培養系に展開していきます。このためには細胞接着を支持するタンパク質でできた固体薄膜を力学的に、より強固なものに改質していく必要があります。今回の研究から得られたイオン液体構造と力学特性に関する知見を基盤に、より強固な固体薄膜を形成する新たな無毒性イオン液体の分子設計を進めます。また、我々は最終的にプラスチックごみを出さない、環境に優しい細胞培養方法の実現を目指しています。このための布石として、細胞培養に用いた後のイオン液体の高効率かつ低コストな洗浄・滅菌方法を提案します。予備検討の段階ですが、我々は既に細胞培養に用いたイオン液体を適切に洗浄・滅菌することで繰り返しの細胞培養が可能であることを確認しています。また、イオン液体はその化学構造を無限に作り込むことができることも大きな特徴です。この特徴を活かし、足場に用いるイオン液体の分子構造設計を通じて細胞の動態を制御する方法論の確立や、それに対する細胞応答の仕組みを理解したいと考えています。

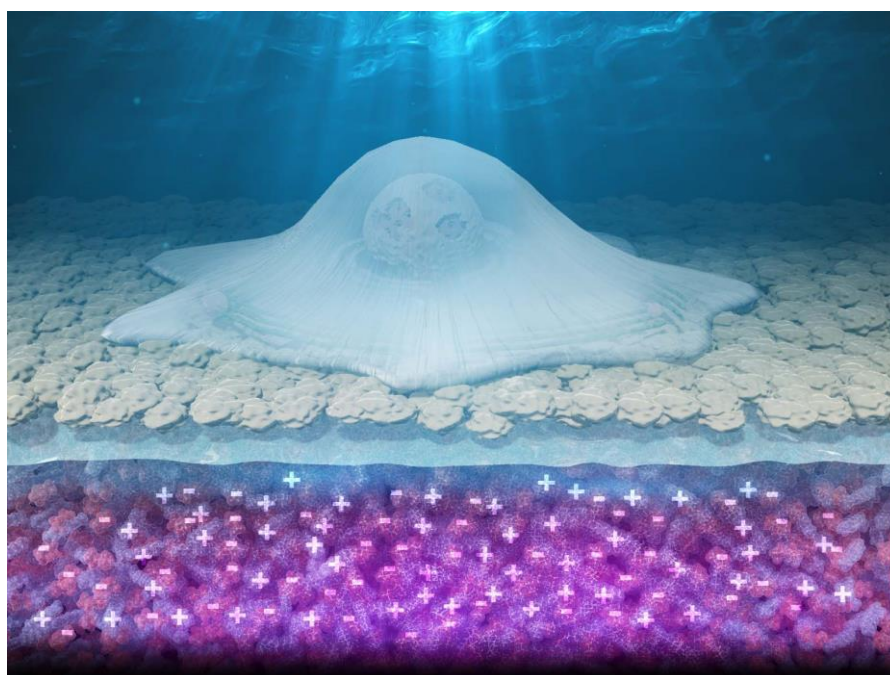


図5 イオン液体界面における細胞培養のイメージ図

掲載論文

題目 : Ionic Liquid Interface as A Cell Scaffold

著者 : Takeshi Ueki, Koichiro Uto, Shota Yamamoto, Ryota Tamate, Yuji Kamiyama, Jia Xiaofang, Hidenori Noguchi, Kosuke Minami, Katsuhiko Ariga, Hongxin Wang, Jun Nakanishi

雑誌 : Advanced Materials

掲載日時 : 2024年2月26日

DOI : 10.1002/adma.202310105.

用語解説

[1] イオン液体: プラスとマイナスのイオンだけでできた液体、つまり熔融状態の塩のことをいいます。例えば食塩の主成分である塩化ナトリウム(NaCl)は、その融点が 801°C です。塩化ナトリウムを 801°C 以上の高温に加熱すると結晶性の固体から、無定形の液体に状態変化します。この液体は、水やアルコールのような「分子でできた」液体とは違って「イオンでできた」液体です。食塩水のように NaCl が水に電離して溶解した溶液ともまったく異なり、純物質で液体状態の塩です。このような状態が 100°C 以下で達成されている物質群のことをイオン液体、特に、融点が室温以下まで下がった物質群を室温イオン液体と呼

びます。イオン液体は揮発しない、燃えない、熱的、(電気)化学的に安定、液体構造を分子(イオン)設計して自在に作り出すことができるなど、一般的な「分子でできた」液体と異なる性質をもっています。

[2] ヒト間葉系幹細胞: 国内外でこれまでに最も臨床応用が進行している幹細胞(様々な細胞に分化する能力を持った細胞)です。骨髄などの間葉と呼ばれる組織に由来した細胞で、骨芽、軟骨、心筋、神経、脂肪等、いくつかの異なる系統の細胞に分化することが可能です。腫瘍を形成することがほとんどなく、IPS/ES細胞とともに再生医療への応用も期待されています。

[3] PFAS 問題: パーフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物を総称して PFAS と呼びます。こうした有機フッ素化合物は撥水、撥油性、熱的、(電気)化学的安定性を示し、半導体洗浄プロセス、レジスト、金属メッキ処理剤、泡消火剤、フッ素系ポリマー加工助剤など広く使われています。その一方、これら化合物は分解性が極めて低く、高蓄積性であることから環境中に残留されるばかりか、食物連鎖を通じて人の健康や動植物の生息・生育に影響を及ぼす可能性が指摘され、地球規模の環境問題として取りざたされています。PFAS の中でもスルホン酸、あるいはカルボン酸構造を持つ PFOS(パーフルオロオクタンスルホン酸)、PFOA(パーフルオロオクタン酸)は蒸気圧こそそれほど高くありませんが、水溶性が極めて高く容易に外部環境に排出されるため、その環境蓄積懸念や健康への影響が特に問題視されています。

[4] ブラウン運動: 液体あるいは気体中に浮遊する微粒子が周囲の熱運動する媒質(液体分子、気体分子)に絶えず衝突することで、微粒子自身が不規則に運動する現象をいいます。ブラウン運動は三次元空間だけでなく一次元直線、二次元平面においても起きます。今回の研究では液体の二次元平面におけるタンパク質のイオン液体界面での拡散を観測しました。ブラウン運動の速さを表す指標が、拡散係数と呼ばれる値で記事、図 4(g)の縦軸に表されています。

本件に関するお問い合わせ先

(研究内容に関すること)

NIMS 高分子・バイオ材料研究センター メカノバイオロジーグループ 主任研究員 上木岳士(うえき たけし)

E-mail: UEKI.Takeshi@nims.go.jp

TEL: 029-860-4947

URL: https://samurai.nims.go.jp/profiles/ueki_takeshi?locale=ja

NIMS 高分子・バイオ材料研究センター メカノバイオロジーグループ グループリーダー 中西淳(なかにし じゅん)

E-mail: NAKANISHI.Jun@nims.go.jp

TEL: 029-860-4569

URL: https://samurai.nims.go.jp/profiles/nakanishi_jun?locale=ja

(報道・広報に関すること)

NIMS 国際・広報部門 広報室

〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1

E-mail: pressrelease@ml.nims.go.jp

TEL: 029-859-2026, FAX: 029-859-2017