

同時発表：

筑波研究学園都市記者会（資料配布）

文部科学記者会（資料配布）

科学記者会（資料配布）



超分子カーボン材料のパターン化による細胞の分化制御に成功

— 再生医療の実現にむけて、足場材料の大面积化を可能にする技術の開発 —

配布日時：平成27年6月1日14時

国立研究開発法人 物質・材料研究機構

概要

1. 国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 超分子ユニットの南 皓輔 研究員、有賀 克彦 ユニット長と、生体機能材料ユニットの山崎 智彦 MANA 研究者らは、炭素材料の1つであるフラーレン¹⁾の柱状結晶を用いて、(1) 水面に浮かべ、(2) 圧縮し、(3) 基板に転写する、というわずか3ステップの簡便な方法で、細胞培養の足場となる材料の表面に、ナノスケールのパターンを形成することに成功しました。さらにこの足場材料が、筋芽細胞²⁾の成長と分化の制御が可能であることを実証しました。細胞の分化制御が可能な足場材料を容易に大面积化できる技術として、本研究成果は、再生医療³⁾の発展に大きく貢献することが期待されます。
2. 再生医療の実現にむけて、生体組織を生体外で構築するために細胞培養の足場となる材料の開発が求められています。なかでも、細胞の分化を誘導・制御できる足場材料の開発は、生体組織の構築および機能発現において必要不可欠です。細胞の分化を誘導・制御する手法としては、生理活性物質などを直接培養液に加える手法が主流でしたが、近年、足場材料の表面に小さな溝を一定方向に形成するなど、ナノからマイクロメートルサイズのパターン化した三次元構造を形成することにより、細胞の分化を誘導・制御できることが報告されています。
3. 効率的に細胞を培養し組織を構築するためには、細胞の分化が誘導・制御でき、かつ、なるべく大きな面積の足場材料が必要です。しかし、これまで足場材料の表面に三次元パターンを形成する技術として報告されてきた、リソグラフィ技術や光架橋ゲル、高分子材料による表面皮膜などは、煩雑な手法や多くの作製ステップを有するなどの課題があり、足場材料の大面积化が困難でした。
4. 本研究グループでは、細胞分化を誘導させる材料として着目されているフラーレンの柱状結晶（フラーレンウィスカー）を用いることで、表面がパターン化された足場材料を、センチメートルスケールの大面积で作成することに成功しました。この手法は、フラーレンウィスカーを水面に浮かべ、圧縮することで一列に並べ、基板に転写するだけで、足場材料の表面にナノスケールのパターンを形成することができるという、非常に簡便な方法です。さらに、フラーレンウィスカー足場材料は、生体適合性が高く、筋芽細胞を培養すると筋管細胞⁴⁾へと分化が誘導されるとともに、一定方向にそろって成長して行くことがわかりました。すなわち、細胞の分化を誘導できるフラーレンを使って、表面が一次元パターン化された足場材料を作製することにより、筋芽細胞の分化と筋組織としての機能化を促進できることが示唆されました。
5. 本研究で用いた手法は、足場材料の大面积化が容易であることから、数 cm^2 ～数十 cm^2 の面積を必要とする再生医療での応用が可能です。また、本研究で開発した足場材料は、筋肉細胞に限らず、骨細胞や幹細胞⁵⁾の分化も誘導・制御できると考えられることから、これからの再生医療研究に大きく貢献すると期待されます。
6. 本研究成果は、国際学術誌「Advanced Materials」のオンライン電子版にて2015年6月2日（火）に公開される予定です。

研究の背景

再生医療・組織工学において、生体組織を生体外で構築するためには、足場となる材料の上で細胞を培養し、特定の細胞種へと分化させて組織として機能を持たせる必要があります。分化の制御は、主に生理活性物質などの外的な分化誘導因子を細胞に与えることで行なわれてきましたが、近年、ナノテクノロジーの進歩により、細胞の成長に適した三次元の表面構造を持つ足場材料が、細胞の分化を誘導・制御することが明らかとなってきました。

ところが、これまで足場材料の原料として使われてきた生体適合性の高いコラーゲンをはじめとする高分子は、マイクロメートルサイズの三次元構造を構築するには煩雑な作製手法を経なければならず、大面積化することが困難でした。また、リソグラフィ技術などを使って三次元構造を構築することができる無機材料の場合は、生体適合性や細胞接着性が低く、構築された表面を生体適合性の高い材料で覆う必要がありました。

そんな中、炭素原子が数十個結合してできた炭素クラスター材料が、細胞の分化を誘導することが報告され、足場材料への応用が期待されています。なかでも、サッカーボール形状の分子であるフラーレンは、大きさが1 nm (ナノメートル=10億分の1メートル) と極めて小さな材料であるものの、分子間での強い相互作用により自己組織化することで、マイクロメートルサイズの分子集合体(超分子組織体)を形成できることが知られています。さらに、生体適合性が高いため、足場材料を含む医療材料として着目されています。しかしながら、これまでフラーレンのみで構築された三次元構造を有する足場材料の報告・実例はありませんでした。

研究内容と成果

本研究グループは、フラーレンを一定方向に配列した一次元結晶(ウィスカー)にすることで、細胞の成長と分化を制御可能な足場材料の開発に成功しました(図1)。

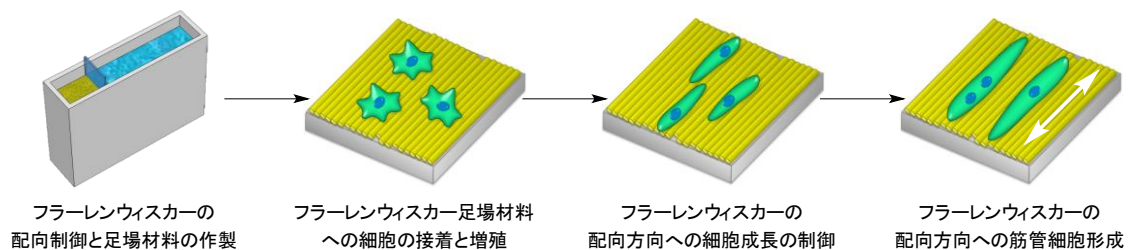


図1. フラーレンウィスカーの配向および足場材料への応用。

本研究では、ラングミュア・ブロッジレット(Langmuir-Blodgett; LB)法⁶⁾と呼ばれる手法を用いて、フラーレンウィスカーを基板上に一定方向に配列(配向)させました。フラーレンウィスカーは高い疎水性を有しているため、フラーレンウィスカーを水面上に浮かべ単層の膜を形成することができます。その膜を圧縮することで、水面上に高精度に配向したフラーレンウィスカー膜を作製しました。その後、基板上に転写し乾燥させることで、表面が疎水化され、規則的に約500 nmの溝が並んだ構造を持つフラーレンウィスカー足場材料を作製しました。LB法を用いることで、従来の煩雑な作製手法とは異なり、写し取る基材に左右されることなく容易に大面積のフラーレンウィスカー足場材料が作製できます。

このフラーレンウィスカー足場材料は、表面が疎水化されているため、細胞が接着することが可能です。この足場材料に、筋分化能を有するマウス筋芽細胞を播種したところ、一般的なガラス表面と比べて細胞の接着面が広く高い接着能を示しました。また増殖率も高いことから、フラーレンウィスカー足場材料は高い生体適合性を有していることが示されました。

このフラーレンウィスカー足場材料は、約 500 nm の溝を持つパターン構造を有しているため、細胞の成長方向を制御することができます。培養した筋芽細胞の形状を蛍光顕微鏡観察すると、溝のないガラス基板上で培養した場合と比べ約 1.8 倍フラーレンウィスカーの配向方向に伸長しています (図 2)。また、筋分化を促すと筋芽細胞同士が融合して筋管細胞の形成が認められ、フラーレンウィスカーの配向方向に沿って一軸方向に形成していることが分かりました。筋管細胞が一軸方向に揃って成長する挙動は、生体内の筋繊維・筋肉の構造と同様であり、筋肉の細胞機能を発揮するものと期待されます。さらに、筋管細胞形成について詳細に調べると、ガラス基板上と比べてフラーレンウィスカー足場材料上では筋芽細胞の筋分化が顕著に誘導されることが明らかとなりました。すなわち、フラーレンがもともと持っている分化誘導能と、そのフラーレンを使って基板上に一次元にパターン化した表面を構築したことにより、筋芽細胞の分化と筋組織としての機能化を促進できることが示されました。

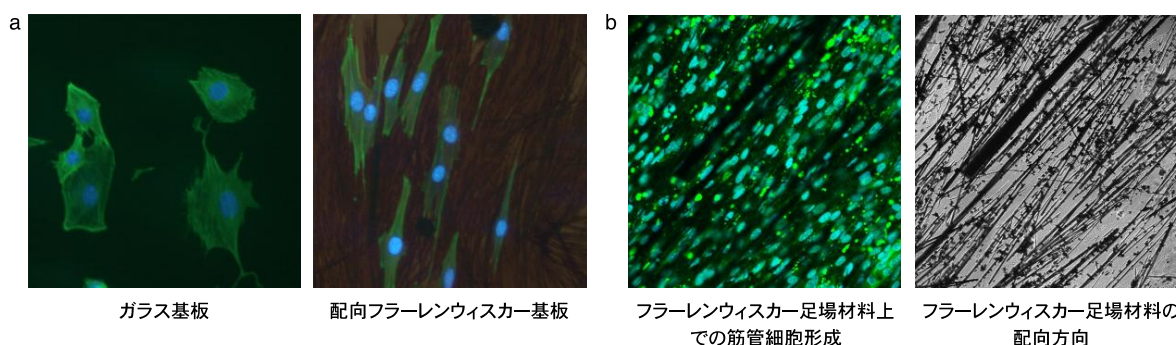


図 2. フラーレンウィスカー足場材料上での細胞挙動。a. ガラス基板上とフラーレンウィスカー足場材料上で伸長した細胞の蛍光顕微鏡観察像。b. フラーレンウィスカー足場材料上で形成した筋管細胞の蛍光顕微鏡観察像。蛍光染色した筋管細胞 (左) とその下にあるフラーレンウィスカー (右)。フラーレンウィスカーが斜めに配向している方向にそって筋管細胞も斜めに配向している様子が認められる。

今後の展開

本研究で開発したフラーレンウィスカー足場材料は、細胞の分化を誘導・制御し、組織の機能化を促進し、かつ LB 法を用いることにより簡便に大面積を作製できるという特徴を持つことから、これまでに報告されている材料と比較して有用な足場材料となります。フラーレンウィスカー足場材料は、数 cm^2 ~ 数十 cm^2 の足場面積を必要とする生体外での組織再生に応用することができ、再生医療・組織工学の発展に大きく貢献します。

今後は、開発したフラーレンウィスカー足場材料の適用範囲を拡張し、筋肉細胞に限らず、神経細胞や骨細胞など他の細胞の分化誘導への応用、さらには iPS 細胞を始めとする幹細胞へと展開します。

掲載論文

題目 : Highly Ordered One-Dimensional Fullerene Crystals for Concurrent Control of Macroscopic Cellular Orientation and Differentiation towards Large-Scale Tissue Engineering

著者 : Kosuke Minami, Yuki Kasuya, Tomohiko Yamazaki, Qingmin Ji, Waka Nakanishi, Jonathan P. Hill, Hideki Sakai, Katsuhiko Ariga

雑誌 : *Advanced Materials* (DOI: 10.1002/adma.201501690)

掲載日時 : 2015 年 6 月 2 日 (火)

用語解説

(1) フラーレン

炭素が数十個集まってできた球状化合物。高い疎水性を有している。今回の研究では炭素が 60 個集まってできた C₆₀ フラーレンを使用。

(2) 筋芽細胞

筋繊維の由来となる細胞。核が一つの細胞であり、筋分化の過程で他の筋芽細胞と融合し、多核の筋管細胞を経て筋繊維となる。

(3) 再生医療・組織工学

事故や病気などが原因で機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、細胞を積極的に利用して、その機能の再生をはかる医療。組織工学は再生医療の一つの分野であり、生体外で生体組織・臓器を構築・再生する学問・技術。

(4) 筋管細胞

筋繊維へとなる細胞。筋分化の過程で筋芽細胞が融合して形成される多核の細胞である。

(5) 幹細胞

生体のさまざまな組織の細胞に分化する能力と、細胞分裂を繰り返しながら増殖する能力をもつ細胞。再生医療の分野では、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人口多能性幹細胞 (iPS 細胞) などが用いられる。

(6) ラングミュア・プロジェクト法 (LB 法)

一般的には、脂質などの凝集した膜 (ラングミュア膜と呼ぶ) を固体基板上に写し取る技術を指す。この手法を応用して一次元ナノ材料の配向制御に用いた手法も同様にラングミュア・プロジェクト法という。後者の手法を英語では、一般的な LB 法 (Langmuir-Blodgett method) と分けて Langmuir-Blodgett approach と呼ぶ。

本件に関するお問い合わせ先

(研究内容に関すること)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点 (MANA)

YAMATO-MANA 研究者 南 皓輔 (みなみ こうすけ)

E-mail: MINAMI.Kosuke@nims.go.jp

TEL: 029-851-3354 (内線 8456)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点 (MANA)

MANA 研究者 山崎 智彦 (やまざき ともひこ)

E-mail: YAMAZAKI.Tomohiko@nims.go.jp

TEL: 029-860-4845

URL: http://www.nims.go.jp/mana/people/mana_scientist/t_yamazaki/index.html

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点 (MANA)

主任研究者 有賀 克彦 (ありが かつひこ)

E-mail: ARIGA.Katsuhiko@nims.go.jp

TEL: 029-851-4597

URL: http://www.nims.go.jp/mana/member/principal_investigator/katsuhiko_ariga.html

(報道・広報に関すること)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 企画部門 広報室

〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1

TEL: 029-859-2026、 FAX: 029-859-2017

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