

# 幹細胞培養のための硬質コラーゲンゲルの開発

再生医療のカギとなるのが体内の様々な細胞に変化（分化）する幹細胞で、細胞を培養する皿の硬さにより分化する細胞種が変わります。生体物質コラーゲンを用いて、世界初となる幹細胞培養皿用の硬質ゲルを開発中です。

## 幹細胞と分化誘導

組織・器官を再生し、従来の医療技術では困難であった疾患の治療を行う「再生医療」のコアとなる技術が「幹細胞 (stem cell)」です。胚性幹細胞 (ES細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS細胞) などは狭義の幹細胞です。幹細胞は目的の細胞、すなわち治療する組織の細胞に分化させて用います。しかし、分化の制御が難しく、分化誘導効率が極めて低いことが問題になっています。

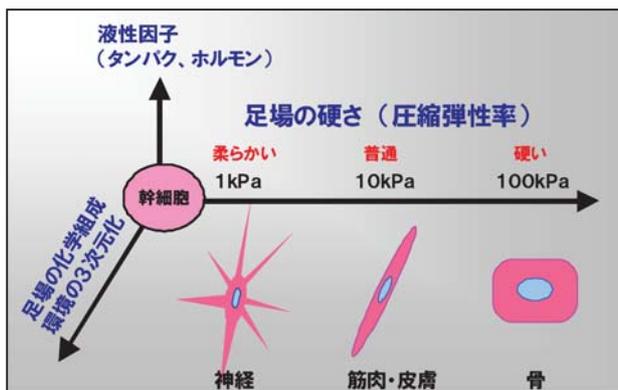


図1 足場の硬さと分化誘導の関係

## 幹細胞の分化と足場材料の硬さ

最近、細胞が接着する足場、すなわち培養皿の底面の硬さが分化にとって重要な意味をもつことがわかってきました<sup>1)</sup>。足場の硬さが組織の硬さと近くなった場合に、その組織を構成する細胞への分化誘導が最も促進されます (図1)。細胞培養研究の多くはポリスチレン (PS) 皿を用いて行われます。細胞の分化誘導にとって硬すぎる足場の上で評価がなされてきたのです。

## コラーゲンゲルの必要性

硬さを制御できる足場材料としては、これまでポリアクリルアミドゲルが用いられてきました。しかし、毒性、非生体吸収性、表面改質の必要性など、実用化にとって多くの問題がありました。一方、コラーゲンは生体内に豊富に存在するタンパク質で医療材料としての実績も豊富です。細胞培養用のゲルとしても市販されていますが、ゲルの硬さは1kPaに満たない脆弱な材料です。もし細胞への分化誘導を促進する、硬さ制御された培養皿をコラーゲンから開発できれば、再生医療産業にとって利用価値の高いデバイスになると期待できます。

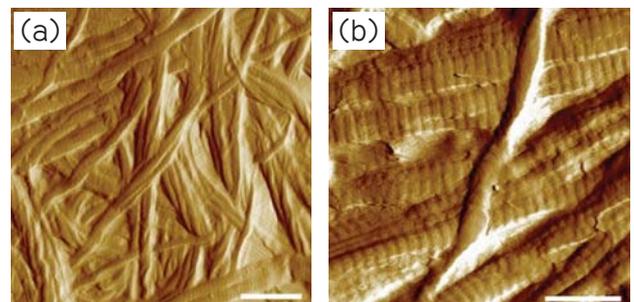


図2 コラーゲン線維の原子間力顕微鏡像

(b)は(a)の拡大図

図中のスケールバーは(a)1000nm、(b)500nm

## コラーゲンゲルの硬質化

生体内では細胞から吐き出されたコラーゲン分子が細胞外環境で自己組織化して束になります (線維化)。その過程で分子間に架橋が導入されます。自己組織化は試験管の中でも起こり、生体内と同様な線維を形成します (図2)。筆者は、生体内のコラーゲン線維化と架橋の同時反応を模倣したコラーゲンの架橋方法を開発しました<sup>2)</sup>。コラーゲンの線維化に架橋剤 (水溶性カルボジイミド (WSC)) を共存させることで、生体内と類似した線維化と架橋の同時反応が起こります。得られたコラーゲンゲルは従来に無い硬さを示しました。そこで、硬さを制御するための条件検討を行いました。

## コラーゲンゲルの硬さ制御

コラーゲンゲルの硬さに影響を与える因子としては、1) コラーゲン濃度、2) 架橋剤濃度、および 3) 線維化度の3つが知られています。コラーゲンの線維化と架橋の同時反応では、これらの因子は互いに影響します。また、線維が形成されない場合、ゲルは軟らかくなってしまいます。そこで、線維化が起こる条件のみでゲルを作製し、コラーゲン濃度がゲル硬さに及ぼす影響を調べました。

以下にコラーゲンゲル製造工程を示します。

- 1) 酸性コラーゲン水溶液とWSC含有リン酸緩衝液を混合してゾルを作製
- 2) 6穴の細胞培養用プレートに速やかにゾルを分注
- 3) 10℃冷蔵庫に24時間静置してゲル化

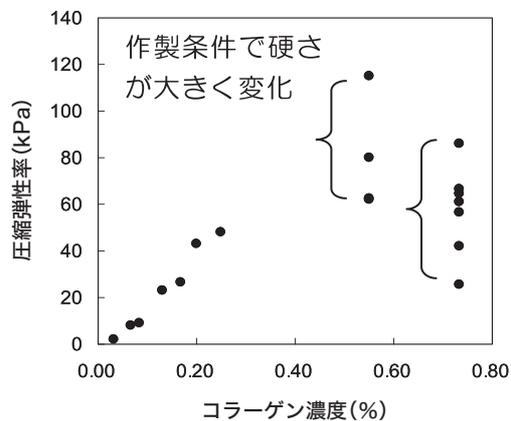


図3 コラーゲンゲルの圧縮弾性率とコラーゲン濃度の関係

得られたゲルの圧縮試験を行い、圧縮弾性率(硬さの指標)を算出しました。

図3にゲル中のコラーゲン濃度と圧縮弾性率の関係を示します。コラーゲン濃度が低い(< 0.3%) 場合、圧縮弾性率はほぼコラーゲン濃度に比例して増加しました。コラーゲン濃度が0.55%で圧縮弾性率は極大値に至りましたが、他の因子がゲル硬さに大きく影響することがわかりました。条件を最適化し、コラーゲン濃度0.55%で圧縮弾性率115 kPaを達成しました(図3)。この硬さは人体で最も硬い分化誘導環境(オステオンという骨の原型; 100 kPa)と同等の硬さです。すなわち、軟~硬組織まで、全ての細胞への分化誘導に最適化するためのコラーゲンゲル硬さ制御技術が確立されたこととなります。

## 細胞培養

作製した硬質コラーゲンゲル(50kPa)の上でヒト皮膚線維芽細胞を培養し、PSディッシュ上での形態と比較しました(図4)。細胞は接着タンパク質を介して足場をつかみ、細胞骨格を用いて足場を引張ります。PSは引張っても変形しないため、細胞は丸く立体的になることが知られています(図4bおよびd)。一方、コラーゲンゲルは細胞の張力により微小変形しますので、細胞は伸張した形態をとったものと推定されます(図4aおよびc)。

## 実用化に向けて

現在、企業2社との共同研究によりゲル硬さが分化誘導に及ぼす影響を解明中です。皮膚、骨などの細胞への分化誘導を促進する培養皿として、早期の事業化を目指しています。

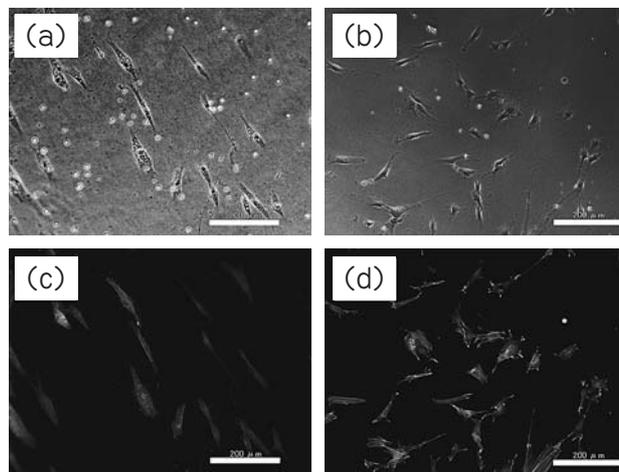


図4 硬質コラーゲンゲルとPS皿の上で培養した線維芽細胞の様子

(a)硬質コラーゲンゲル、(b)PS皿  
(c)および(d)は、(a)および(b)のアクチン染色像  
図中のバーは200 μm

## 引用文献

- 1)Even-Ram et al. *Cell* 126, 645(2006)
- 2)Yunoki et al. *Biomacromolecules* 9, 879(2008)

開発本部開発第二部

ライフサイエンスグループ <駒沢支所>

柚木俊二 TEL 03-3702-3115 内線 582

E-mail : yunoki.shunji@iri-tokyo.jp