

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ  
(英語) AMED-PRIME

研究開発課題名： (日本語) 光駆動型動的細胞操作材料の開発と構造力学場記憶機構の解明  
(英語) Light-responsive dynamically manipulatable cell culture platforms  
for revealing the mechanism of cellular mechanostructural memory

研究開発担当者 (日本語) 若手国際研究センター ICYS 研究員 宇都 甲一郎  
所属 役職 氏名： (英語) International Center for Young Scientists, ICYS  
researcher Koichiro Uto

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)  
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

<和文>

本研究開発では、基材のトポグラフィーや弾性率などの構造力学的環境因子に対する幹細胞の記憶現象の存在さらにはその機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、表面形状や弾性率の時空間操作を可能とする動的培養基材基盤技術を確立し、細胞培養における基材の構造力学的培養履歴が幹細胞機能に及ぼす影響について詳細な解析を行う。これを通して、構造力学的情報が細胞機能に及ぼす時間空間的役割を理解し、四次元メカノバイオロジーへと発展させることを目標としている。本年度は、以下の3つのサブテーマについて検討を進めた。

### (1) 幹細胞培養を指向した刺激応答性基材物性の最適化

今後の基盤となる基材材料として光分解性ゲルと形状記憶エラストマーの2種類の動的培養基材の開発を行った。従来確立していた形状記憶エラストマーは、その形状変化を誘起する際に系全体での温度変化を必要とするため、空間操作性に問題があった。この形状記憶エラストマーに光熱変換材料を組み込みコンポジット化することで形状変化を光により駆動することに成功した。これらの材料は、通常の細胞培養条件下では一定の物性を維持するが、細胞存在下で光照射することにより弾性率低下や構造変化を誘導することが可能であった。

### (2) 幹細胞分化実験のプロトコールの確立

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC)を用いて脂肪分化と骨分化誘導を効率よく再現できるプロトコールの確立を目指した。プラスチック培養皿を用いた系において、適切な培地と分化誘導因子を組み合わせることにより、それぞれの分化誘導条件でオイルレッド O(脂肪分化)とアルカリホスファターゼ(骨分化)染色で陽性の細胞を確認することができた。ただ分化誘導効率は実験ごとに異なっていることが分かった。

### (3) 幹細胞分化実験に向けた最適構造力学条件のスクリーニング

脂肪分化や骨分化さらには神経分化の効率的な分化誘導を促す最適な弾性率または表面形状のスクリーニングを行うための、材料と鑄型の作製を行った。弾性率に関してはkPa-MPaの広範囲での制御に成功した。表面形状についてはラインやナノポスト構造に着目しその鑄型を作製した。作製した鑄型を用いることで形状記憶エラストマー表面に形状を効率よく転写することに成功した。今後、転写した表面形状と分化の関係性を評価する。

<英文>

In this project, I'm aiming to reveal cellular memory phenomena in response to environmental mechanostructural factors, such as topography and elasticity of substrates, and its mechanism. Specifically, I will develop a dynamic cell culture platform enabling spatiotemporal control of substrate topography and elasticity in order to investigate the effect of the culture history of an extracellular mechanostructural environment on stem cell behaviors. Understanding the spatiotemporal role of mechanostructural information of cellular surrounding through this project to lead further an emergence of four-dimensional mechanobiology research. In this fiscal year, I focused on three subthemes as follows.

### (1) Optimization of stimuli-responsive cell culture platform for stem cell culture

Two types of dynamic materials such as photodegradable hydrogels and shape memory elastomers were developed as cell culture substrates. It is established that it is difficult to consider the effect of temporal shape change for conventional temperature-responsive shape memory elastomer system since temperature change of the whole system is necessary. Thus, photoresponsive shape memory elastomers have been developed in this work by composite with the photothermal material. The successful fabrication of both photodegradable hydrogel and photoresponsive shape memory elastomers enabled control of stiffness and topography in response to light irradiation in the presence of adhered cells. This new approach allowed us to investigate the temporal effect of shape change and stiffness change on cell behaviors.

### (2) Establishment of protocol on the differentiation of stem cell

I aimed to establish a standardized protocol for adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells (hMSC). The system consisting of a plastic dish, adipogenic (oil red o) and osteogenic (alkali phosphatase) positive cells were observed by selecting an appropriate medium and differentiation-inducing factors for each differentiation experiments. However, I found that the differentiation efficiency might be varying among each experiment, suggesting that there is a reproducibility problem.

### (3) Screening of optimum mechanostructural conditions for differentiation of stem cell

Materials and mold for patterning substrates were designed and fabricated to perform the screening experiments. I then looked to optimize elasticity and topography for efficient differentiation of hMSC to adipogenesis, osteogenesis, and neurogenesis. I succeeded in obtaining a cell culture substrate that broadly covered the elasticity ranges from kPa to MPa. In addition, molds with nano-grooves and nano-post structures were fabricated for patterning of shape memory elastomers. Finally, I found that the mold structures were efficiently transferred onto designed shape memory elastomers.

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 3 件）

1. UTO K, AOYAGI T, DEFOREST CA, HOFFMAN AS, EBARA M. A combinational effect of 'bulk' and 'surface' shape-memory transitions on the regulation of cell alignment. *Advanced Healthcare Materials*, in press.
2. SUZUKI K, TANAKA H, EBARA M, UTO K, MATSUOKA H, NISHIMOTO S, OKADA K, MURASE T, YOSHIKAWA H. Electrospun nanofiber sheets incorporating methylcobalamin promote nerve regeneration and functional recovery in a rat sciatic nerve crush injury model. *Acta Biomaterialia*. 2017, 53, 250-59.

3. UTO K, TSUI JH, DEFOREST CA, KIM DH. Dynamically tunable cell culture platforms for tissue engineering and mechanobiology. *Progress in Polymer Science*. 2017, 65. 53-82.
4. 宇都甲一郎, デフォレスト コール. 時空間制御バイオマテリアルを用いた細胞力学記憶メカニズムの解明. *バイオマテリアル-生体材料-誌*. 2017, 35, 36-41.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 表面形状記憶を用いた動的細胞機能制御, 口頭, 宇都甲一郎, 荏原充宏, つくば医工連携フォーラム 2017, 2017/1/20, 国内.
2. Spatiotemporal control of cardiac anisotropy using dynamic nanotopographic cues, ポスター, UTO K, MENGSTEAB PY, SMITH AST, FRANKEL S, FISHER E, NAWAS Z, MACADANGDANG J, EBARA M, KIM DH, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016), 2016/11/28-30, 国内.
3. Light-responsive 4D biomimetic culture platform for dynamic mechanobiology, 口頭, UTO K, ICYS workshop FY2016, 2016/10/6-7, 国内.
4. Dynamic control of cellular alignment using shape-memory cell culture platform, ポスター, UTO K, AOYAGI T, DEFOREST CA, HOFFMAN AS, EBARA M, MANA international symposium 2017, 2017/2/28-3/3, 国内.
5. 動的細胞培養基材を用いたメカノバイオロジー研究, 口頭, 宇都甲一郎, 第 20 回次世代医工学研究会, 2017/3/13-14, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 形状記憶材料について, 宇都甲一郎, NIMS 一般公開 2017, 2017/04/23, 国内.
2. バイオ研究における高分子材料科学の可能性: 大学-研究所-海外留学を経て、宇都甲一郎、名古屋大学大学院創薬科学研究科主催 第 53 回創薬科学セミナー, 2017/3/17, 国内.

(4) 特許出願

なし