

酵素反応を経て得られるハイドロゲルの諸応用



研究室紹介

Studies on various applications of hydrogels obtained through enzymatic reaction

Key Words : Hydrogel, Bioprinting, Cell Dome, Tissue engineering

境 慎 司*

はじめに

ハイドロゲルとは、高分子のネットワーク中に水が豊富に含まれる形状を保った物体のことである。例えば、プリンやゼリーといえはハイドロゲルを容易に想像できるだろう。水を豊富に含む物体である点が、我々の生体の組織と同様であることから、一般に生体・細胞との親和性が高いとされる。このため、ハイドロゲルは、コンタクトレンズや創傷被覆材、再生医療用の細胞を培養するための基材など、生体や細胞と接触するさまざまな用途において利用されており、また新たな用途やさらなる機能化が検討されている。

私は、このハイドロゲルに関する研究を学部4年生で研究室に配属されてから現在に至るまで、新しいハイドロゲルの開発や、様々な用途を対象に行ってきた。特に、2007年頃から主として行っているのが、高分子水溶液から西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の酵素反応を経て得られるハイドロゲルの開発と医療関連分野への応用である。なお、ペルオキシダーゼは、過酸化水素の存在下でヘムまたはその他の金属を活性中心として様々な酸化反応を触媒する酵素群であり、ほぼすべての生物に存在する。植物において細胞壁を構成するリグニンは、リグニンモノマーがペルオキシダーゼの作用により重合することで生成し、その作用によりリグ

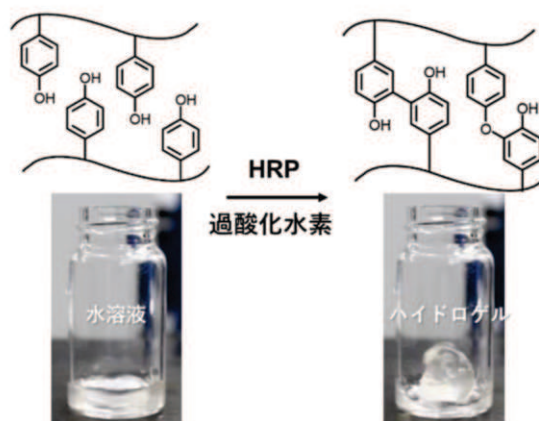


図1 HRP と過酸化水素存在下でのフェノール性水酸基重合反応模式図とハイドロゲル形成。

ニン分子の伸長が生じる。

私が現在主宰する「生物材料設計グループ」においては、過酸化水素存在下での HRP によるフェノール性水酸基の重合 (図1) を利用し、3D バイオプリンティング [1-3] や、セルドーム (我々が独自に命名したデバイスの名前) [4, 5]、細胞包括ゲルファイバーや細胞包括マイクロカプセル [6]、創傷被覆材 [7]、表面機能化による線虫への新規機能付与 [8]、細胞培養担体の表面機能による細胞挙動制御 [9] など、様々な検討を実施している。文字数の制限があるため、詳細な部分については記載することはできないが、以下に 3D バイオプリンティングとセルドームに関する取り組みについて紹介する。

3D バイオプリンティングについての取り組み

3D バイオプリンティングは、PC などで作製したデジタルデータの設計図に基づいて、3D プリンターを用いて細胞を含む立体的な構造物を造形する技術である。通常の 3D プリンティングとの違いは、生きた細胞がインク成分である点である。このため、適用可能な条件 (温度、pH、使用可能な溶媒など) は、



* Shinji SAKAI

1975年4月生まれ
九州大学 工学府 物質プロセス工学専攻
攻博士後期課程短縮修了 (2002年7月)
現在、大阪大学大学院 基礎工学研究科
物質創成専攻 教授 博士 (工学)
専門/生物化学工学
TEL : 06-6850-6252
E-mail : sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

細胞の生存を低下させないものに限定される。なお、細胞を含むインクはバイオインクと呼ばれる。HRPによるフェノール性水酸基の重合は、細胞の生存を低下させない条件下で進行させることができる。このため、我々のグループでは、この官能基を有する高分子の水溶液に細胞を分散したものをバイオインクとして用いるバイオプリンティングに関して検討を行っている。

HRPの酵素反応をインクの hidroゲル化に用いるバイオプリンティングにおいては、その反応の進行に必要な過酸化水素をどのようにしてプリントプロセスに供給するのかということが鍵となる。これは、フェノール性水酸基を有する高分子、HRP、過酸化水素を水溶液として混合すると10秒程度で hidroゲルが形成されることによる。これらを一度にすべて混合してからプリントを開始すると、最初の10秒程度は良好な造形ができて、hydroゲルの形成によりすぐにインクの吐出が困難となる。

このため、我々のグループでは、主要な3Dバイオプリンティング技術の一つである直径数十マイクロメートルの液滴を高速に滴下しながら造形を行うインクジェット方式について、複数の吐出ノズルの一つから過酸化水素を含む高分子水溶液インクを、また、他の吐出ノズルから細胞と高分子、HRPを含んだインクを交互にほぼ同じ場所に1秒間に500個程度ずつ滴下する方法を開発した(図2)。これにより、それまでにこの方式のバイオプリンティングでは良好な造形をすることができなかったヒアルロン酸やゼラチンなどの誘導体から、内部に生存を損なうことなく細胞を含有する3次元構造体をプリントすることに成功した。また、最も多くの検討が行われている注射針の先端のような細管から連続的

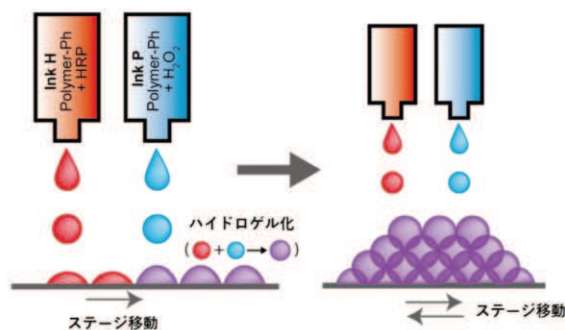


図2 フェノール性水酸基含有高分子 (Polymer-Ph) 水溶液をインクとして用いるインクジェット方式3Dバイオプリンティング模式図。

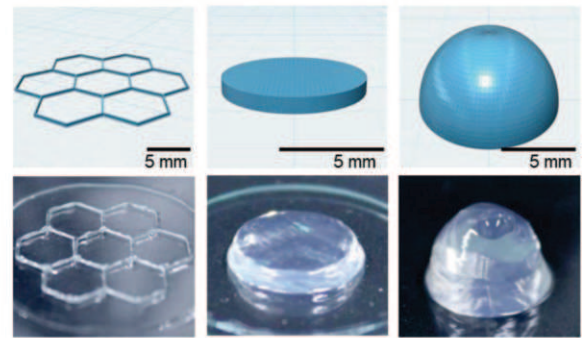


図3 過酸化水素含有空気下でヒアルロン酸誘導体水溶液インクからプリントした構造物。

にインクを線状に押し出しながら造形する押し出し方式のバイオプリンティングについては、周囲の空気に10 ppm程度の過酸化水素を含ませ、その雰囲気下でプリントを行う方法を開発した(図3)。現在も、新規インク材料の開発や、プリント方法の改良を通じて、これらの方法をより発展させるための研究を行っている。

インク材料の開発については、インドネシアやフランスなど海外の研究者との共同研究、日本国内の企業との共同研究などを通じて、新しい材料の探索も行っている。また、3Dプリントにより得られる構造体中での良好な細胞の増殖や組織化と、高精度での3Dプリントを同時に実現するためには、そのインクに適したプリンターが必要である。このため、3Dプリンターの開発にも取り組んでいる。

セルドームについての取り組み

我々のグループで独自に命名したものであるため、「セルドーム」という言葉を初めて目にする方がほとんどであろう。セルドームは、ドーム球場のように、直径0.5~1 mm、高さ0.5 mm程度の半球状の構造体の内部に、細胞を収容するものである(図4)。ドームの壁、天井にあたる部分が半透性の hidroゲル薄膜であるため、酸素や栄養分を培養液から内部へ供給することができ、細胞の代謝老廃物を外部へ拡散させることができる。また、hydroゲル膜を拡散できる分子量数十万以下の物質であれば、セルドーム外から内部に送達することができるため、各種試薬により細胞を染色することもできる。そして、スライドガラス表面にこのセルドームを作製すると、ドーム外から供給した試薬により染色した細胞を底面から顕微鏡により容易に観察することができる。

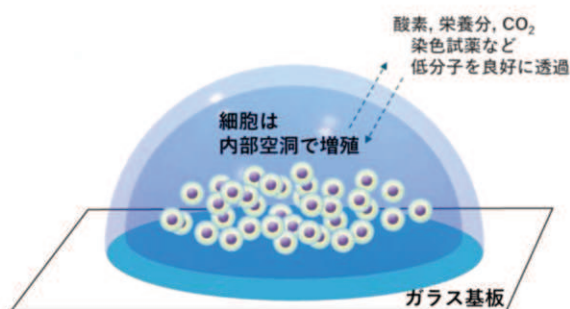


図4 中空部に細胞を含むセルドーム模式図.

このセルドームの作製にも HRP の触媒作用により形成するフェノール性水酸基を有する高分子から得られる水ゲルを利用している。具体的には、スライドガラス上に動物細胞を分散させた HRP を含むゼラチン水溶液を 1 滴ドロップし、冷却して半球状にゲル化させる。その後、微量の過酸化水素を含有させたフェノール性水酸基含有高分子の水溶液を、このゼラチン水ゲル上にドロップすると、HRP が過酸化水素を含む高分子水溶液と接触し、そこで水ゲルが形成する。あとは、培養液に入れて、細胞培養時と同じ 37 度の環境に静置すると、ゼラチン水ゲルが温度変化により溶解して、内部が液体のセルドームが得られる。

高分子の濃度や HRP 濃度、過酸化水素濃度を調節し、十分な強度を有する水ゲル薄膜を作製すれば、1 か月以上、数日毎の培地交換を行いながら、セルドーム内で細胞を増殖させることができる。

このセルドームの面白い点は、内部で細胞が増殖して形成する構造が半球状をしており、また、スライドガラスは酸素や栄養分を透過しないことから、セルドーム底面の中心部に近くなるほど、酸素や栄養分濃度が低く、生体の腫瘍組織で生じるようなそれらの濃度が一定でない環境を再現できることである。そして、球状の組織体では中心部にあることから観察には共焦点レーザー顕微鏡が必要となるような、酸素や栄養分の濃度が最も低い部分も、スライドガラスの表面近くにあるため容易に観察可能であることもこのセルドームの面白い点である。実際に白血病由来細胞株や肝がん由来細胞株をセルドームの内部を満たすまで培養した後に、低酸素状態を検出するための蛍光試薬で染色すると、中心部ほど低酸素状態であることを確認している。

現在は、このセルドームを使って、リンパ腫細胞

の 3 次元培養など、従来の培養法では適切なタイミングで培地交換を行いながら長期間の培養を行うことが難しかった、浮遊細胞の 3 次元培養モデルの作製や評価に取り組んでいる。

おわりに

本稿では、酵素反応を経て得られる水ゲルに関して我々の研究グループで行っている取り組みを紹介した。今後も、この水ゲルの諸応用に関することを中心として研究室の研究活動を進めていく予定である。

参考文献

- [1] S. Sakai, K. Mochizuki, Y. Qu, M. Mail, M. Nakahata, M. Taya, Peroxidase-catalyzed microextrusion bioprinting of cell-laden hydrogel constructs in vaporized ppm-level hydrogen peroxide, *Biofabrication* 10(4) (2018) 045007.
- [2] W. Mubarok, C. Zhang, S. Sakai, 3D Bioprinting of Sugar Beet Pectin through Horseradish Peroxidase-Catalyzed Cross-Linking, *ACS Appl Bio Mater* 7(5) (2024) 3506-3514.
- [3] W. Mubarok, K. Elvitigala, T. Kotani, S. Sakai, Visible light photocrosslinking of sugar beet pectin for 3D bioprinting applications, *Carbohydrate Polymers* 316 (2023) 121026.
- [4] R. Kazama, R. Sato, H. Fujiwara, Y. Qu, M. Nakahata, M. Kojima, S. Fujita, S. Sakai, Development of non-adherent cell-enclosing domes with enzymatically cross-linked hydrogel shell, *Biofabrication* 15(1) (2022) 015002.
- [5] R. Kazama, S. Sakai, Effect of cell adhesiveness of Cell Dome shell on enclosed HeLa cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 137(4) (2024) 313-320.
- [6] R. Goto, M. Nakahata, C. Delattre, E. Petit, R. El Boutachfaiti, S. Sakai, Fabrication of cell-laden microbeads and microcapsules composed of bacterial polyglucuronic acid, *International Journal of Biological Macromolecules* 244 (2023) 125481.

- [7] S. Sakai, S. Yamamoto, R. Hiram, M. Hidaka, K. Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, Enzymatically gellable chitosan inks with enhanced printability by chitosan nanofibers for 3D printing of wound dressings, *European Polymer Journal* 210 (2024).
- [8] W. Mubarak, M. Nakahata, M. Kojima, S. Sakai, Nematode surface functionalization with hydrogel sheaths tailored in situ, *Materials Today Bio* 15 (2022) 100328.
- [9] K. Elvitigala, L. Mohan, W. Mubarak, S. Sakai, Photo-tuning of Hyaluronic-acid-based Hydrogel Properties to Control Network Formation in Human Vascular Endothelial Cells, *Advanced Healthcare Materials* (2024) e2303787.

