

# 自己集合性ペプチド水素ゲル内で三次元培養された細胞への機械刺激

永井 祐介<sup>a,b\*</sup>, 横井 秀典<sup>b</sup>, 貝原 恵子<sup>a</sup>, 成瀬 恵治<sup>a</sup>

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム生理学, <sup>b</sup>株式会社メニコン

キーワード: 機械刺激, メカノバイオロジー, 自己集合性ペプチド, 3次元培養, スキャフォールド

## The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel

Yusuke Nagai<sup>a,b\*</sup>, Hidenori Yokoi<sup>b</sup>, Keiko Kaihara<sup>a</sup>, Keiji Naruse<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Cardiovascular Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, <sup>b</sup>Menicon Co. Ltd.

### はじめに

再生医療では細胞が立体的な組織へと成長するための足場＝スキャフォールドが必要である。近年、機械刺激が細胞に与える影響が注目され、再生医療においても、スキャフォールドの内部で培養された細胞への機械刺激について研究されるようになった<sup>1-3)</sup>。しかし、代表的なスキャフォールドであるコラーゲンやマトリゲルは動物由来で成長因子を多く含み、また、製造ロットごとにそれらの含有量に差が生じる場合があることから<sup>4,5)</sup>、純粋に機械刺激の効果を評価することが困難であった。さらに、アレルギーや未知の感染症の懸念があり<sup>6-8)</sup>、実際のヒト臨床応用にも問題があった。

そこで我々は、3次元細胞培養から動物由来スキャフォールドが抱える問題を排除し、純粋に機械刺激の

効果を研究するためのツールとして、非動物由来の自己集合性ペプチドゲル SPG178 (self-assembling peptide gel #178) を開発した。ここでは、SPG-178のゲル形成挙動や生体適合性、さらに、実際にゲル内で培養した細胞への機械刺激とその応答について紹介する<sup>9)</sup>。

### 自己集合性ペプチドゲルについて

一般に、自己集合性ペプチドゲルは自己集合性ペプチドと呼ばれるペプチドからなり、それらは水中で自発的に会合してナノファイバーを形成する。ナノファイバー同士がさらに絡み合うことで3次元ネットワークが構築され、最終的には含水率が99%程度の高含水のゲル (= 自己集合性ペプチドゲル) となる。自己集合性ペプチドが水中で会合する際は $\beta$ シート構造を取ることが多く、その場合、アミノ酸配列の特徴として親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の繰り返し構造を持つことが知られている<sup>10)</sup>。SPG-178を構成するペプチドのアミノ酸配列は、RLDLRLALRLDLR (R: アルギニン, L: ロイシン, D: アスパラギン

平成26年1月受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7119 FAX: 086-235-7430

E-mail: gmd20002@s.okayama-u.ac.jp

### プロフィール



永井 祐介

昭和51年生まれ

平成10年3月 九州大学工学部応用物質化学科卒業

平成12年3月 九州大学大学院工学研究科修士課程 修了

平成12年4月 株式会社メニコン入社

平成16年4月 Center for Biomedical Engineering, Massachusetts Institute of Technology 客員研究員 (平成18年5月まで)

平成19年6月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム生理学 客員研究員 (平成20年3月まで)

平成20年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程 入学

平成24年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程 修了

平成24年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム生理学 民間等共同研究員

現在に至る

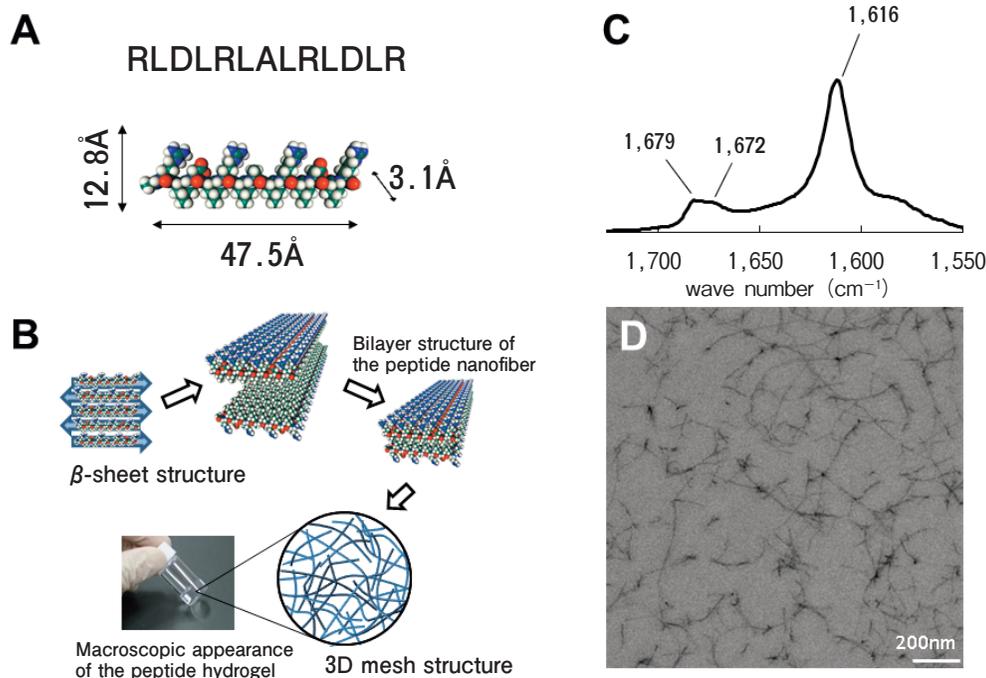


図1 自己集合性ペプチドによるゲル形成およびSPG-178ペプチドの特性  
 A：SPG-178ペプチドの分子モデル。B：ゲル形成までの模式図。C：SPG-178の全反射型フーリエ変換赤外吸収スペクトル。1,616  $\text{cm}^{-1}$ のピークは $\beta$ シート構造, 1,679  $\text{cm}^{-1}$ のピークは逆平行 $\beta$ シート構造がゲル内にそれぞれ存在することを示唆している。(1,672  $\text{cm}^{-1}$ のピークはペプチド合成過程で使用し, ゲルの中にわずかに残っていたトリフルオロ酢酸に起因するものである。) D：ペプチドナノファイバーの透過型電子顕微鏡観察像。(文献9より改変引用)

酸, A：アラニン)であり, 一般的な自己集合性ペプチドゲルと同じく水中では $\beta$ シート構造を取る。さらに自発的に会合してナノファイバーを形成することも確認されており, 中性領域において透明なゲルとなる(図1)。同ペプチドには, 正電荷を持つアルギニンが4つ, 負電荷を持つアスパラギン酸が2つ組み込まれており, 正味の電荷が+2となるように設計されている。これによって, 中性領域での安定性と透明性を実現しているが, もしも正電荷と負電荷を持つアミノ酸の数を同じにしてしまうと, 正味の電荷がゼロに近い状態となり, 中性領域でのペプチドの溶解性が低下し, ゲルが崩壊しやすくなってしまふ。

### SPG-178の生体適合性について

SPG-178を用いた3次元培養では, これまでにラット筋芽細胞(C2C12)やヒト繊維芽細胞(TIG-1), ヒト軟骨肉腫細胞(OUMS-27)などを用いた実験を行っており, それらの細胞がゲル内で増殖することが確認されている。3次元培養されたC2C12について蛍光色素による生死判別をおこなうと, ゲル内に死細胞の核

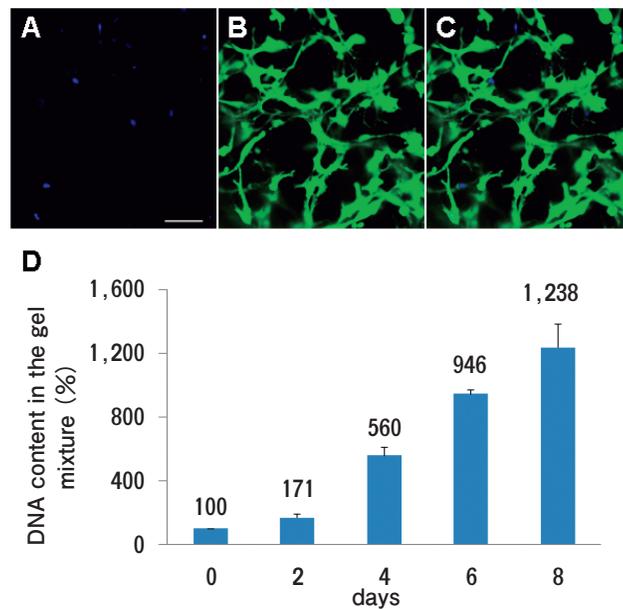


図2 自己集合性ペプチドゲル内での3次元培養  
 ゲル内細胞(C2C12)のDAPI(死細胞)(A), Calcein(生細胞)染色(B), およびMerge(C)。D：培養0日目以降の細胞DNA量の変化。(文献9より引用)

が散見されるものの(図2 A), 生細胞の伸長がみられ(図2 B), ゲル内において, 多くの細胞が生着・生存できることが確認できた(図2 C). また, DNA 定量によって, ゲル内の C2C12の増殖について調べたところ, 8日間の培養で細胞数が約12倍に増加することが確認された(図2 D). これらより, SPG-178は細胞への親和性が高く, 3次元培養用スキャフォールドとして有用な材料であることが確認できた.

### ゲル内での細胞の伸長について

SPG-178が実際に伸展可能なスキャフォールドであり, 内部の細胞にその伸展刺激を伝えることができるかどうかを調べるため, まず, ゲルを専用のチャンバーに保持させた後に20%の伸展を実施した. 伸展の前後の様子を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ, チャンバーの伸展に応じてゲル内の細胞が伸展されることが確認された. 細胞間距離の増加から計算された伸展率は19%であり, チャンバーの伸展率とほぼ一致した(図3 A, B). 次に, チャンバーの伸展率を10%として, 5分間の静的伸展を実施したところ, ゲル内細胞の ERK が伸展をしない場合(N.S.)に比べて約2.8倍活性化されることが確認された(S). また, ERK リン酸化阻害剤である PD98059を添加した場合(S.P.), 伸展に伴う ERK のリン酸化を完全に阻害したが, DMSO(PD98059の溶媒)添加のみの場合(S.D.)では阻害効果は見られなかった(図3 C). これらの結

果から SPG-178は伸展可能な材料であり, 内部の細胞にその伸展による機械刺激を伝達可能であることが確認された.

### おわりに

これまで再生医療に向けた細胞増殖・分化の制御は増殖因子やサイトカインによるものが主流であったが, 近年では機械刺激を取り入れようとする研究が多くみられるようになった. 機械刺激の影響を詳細に調査するには, それ以外の要素を極力排除した(非動物由来の)系での実験が望ましく, 人工合成物である自己集合性ペプチドゲルはそのようなニーズを満たす材料と言える.

自己集合性ペプチドゲル SPG-178を用いた3次元培養では, ゲルと細胞懸濁液を直接混ぜ合わせる事が可能であり, そのまますぐに培養を開始することができる. 混合後においても中性領域で安定したゲルが形成され, この, 中性領域で安定したゲルを形成できるという性質により, SPG-178はゲル単体として, オートクレーブ滅菌が可能であるという優れた特徴を有している.

SPG-178の構造的な特徴について, 全反射型フーリエ変換赤外分光法から, SPG-178のペプチドは逆平行βシート構造を取ることが確認された. また, 透過型電子顕微鏡観察では直径が10nm以下のナノファイバー構造が確認され, 分子モデルとの一致が見られた. 観

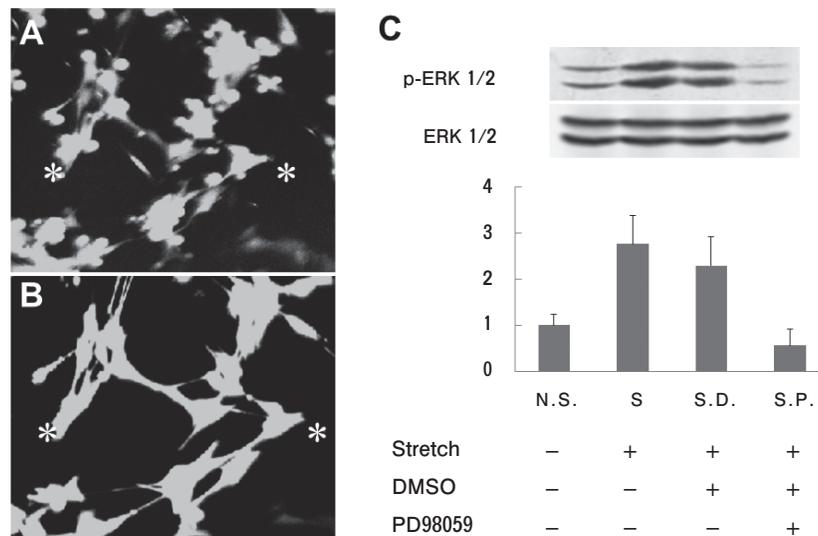


図3 SPG-178内で培養された C2C12への伸展刺激  
 A: チャンバー伸展前. B: チャンバー20%伸展後, 2つの\*印の間隔は19%増加した. C: 伸展率10%で5分間伸展した場合, 細胞内 ERK の活性化がウェスタンブロッティングにより確認された. (文献9より改変引用)

察されたメッシュサイズは細胞よりもはるかに小さく、ペプチドファイバーは化学架橋されていないことから、細胞の浸潤や成長に伴ってメッシュサイズが変化すると考えられる。

蛍光色素を用いた生死判別実験において、ゲル内での細胞の伸長が観察され、ペプチドファイバーへの細胞の確実な接着が示唆された。また、DNA 定量によってゲル内での細胞増殖が確認され、これらより、SPG-178ゲルのスキャフォールドとしての有用性が示された。細胞培養初期には、ペプチド分子の正電荷アミノ酸が細胞接着に寄与し、また、液体培地の血清成分がファイバーに付着することで、さらに細胞接着を助長すると考えられる。

共焦点レーザー顕微鏡観察により、チャンバーの伸展に伴う細胞の伸展と細胞間距離の増加が確認された。さらに、伸展後の迅速な ERK リン酸化は従来の二次元培養系での報告と一致していた<sup>11,12)</sup>。

これらの結果より、SPG-178ゲルは3次元培養細胞へ機械刺激を伝達可能であり、その効果を研究するための有用なツールであることが証明された。今後、SPG-178と専用の伸展チャンバー、さらに自動伸展装置を組み合わせることで、機械刺激に対する3次元培養細胞の応答をより詳細に検討する予定である。

## 文 献

- 1) Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, et al. : Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* (2006) 12, 452-458.
- 2) Hirano Y, Ishiguro N, Sokabe M, Takigawa M, Naruse K : Effects of tensile and compressive strains on response of a chondrocytic cell line embedded in type I collagen gel. *J Biotechnol* (2008) 133, 245-252.
- 3) Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandenberg HH : Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J physiol Cell Physiol* (2002) 283, C1557-1565.
- 4) Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH : Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* (1992) 202, 1-8.
- 5) Vallier L, Alexander M, Pedersen RA : Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* (2005) 118, 4495-4509.
- 6) Cooperman L, Michaeli D : The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol* (1984) 10, 638-646.
- 7) Lynn AK, Yannas IV, Bondfield W : Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (2004) 71, 343-354.
- 8) Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HOB, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB : Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96, 15137-15142.
- 9) Nagai Y, Yokoi H, Kaihara K, Naruse K : The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel. *Biomaterials* (2012) 33, 1044-1051.
- 10) Yokoi H, Kinoshita T, Zhang S : Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102, 8414-8419.
- 11) Rauch C, Loughna PT : Stretch-induced activation of ERK in myocytes is p38 and calcineurin-dependent. *Cell Biochem Funct* (2008) 26, 866-869.
- 12) Zhan M, Jin B, Chen SE, Reecy JM, Li YP : TACE release of TNF- $\alpha$  mediates mechanotransduction-induced activation of p38 MAPK and myogenesis. *J Cell Sci* (2007) 120, 692-701.