

カルボジイミド系架橋剤による心室組織 ECM 由来ハイドロゲルの 力学特性の調整と細胞適合性の評価

Modulation of the mechanical properties of hydrogels from ventricular extracellular matrix
by using carbodiimide crosslinker and investigation of the cell compatibility

藤田恭平 (山形大学大学院理工学研究科) ○ 馮忠剛 (山形大学大学院理工学研究科)

小沢田正 (山形大学大学院理工学研究科) 佐藤大介 (山形大学大学院医学系研究科)

中村孝夫 (山形大学大学院医学系研究科) 白石泰之 (東北大学加齢医学研究所)

梅津光生 (早稲田大学先端生命医科学センター)

Kyohei FUJITA, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
Zhonggang FENG, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
Tadashi KOSAWADA, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
Daisuke SATO, Graduate School of Medical Science, Yamagata University
Takao NAKAMURA, Graduate School of Medical Science, Yamagata University
Yasuyuki SHIRAIISHI, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University
Mitsuo UMEZU, Center for Advanced Biomedical Sciences, Waseda University

Abstract: Hydrogels composed of cardiac extracellular matrix (ECM) have been utilized as a scaffold to induce cardiac differentiation of pluripotent stem cells. Although the mechanical properties of scaffold is one of the critical cues for the differentiation of stem cells, how to obtain the appropriate mechanical properties of the hydrogel for cardiac differentiation has not been investigated. In this study, we modulated the mechanical properties of ventricular ECM hydrogels (vECM gels) using N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC) and investigated the mechanical properties by means of compression test. The elastic modulus K_1 of the modified nonlinear Kelvin model of 12.5 mg/ml-vECM gels can be enhanced from 129.5 Pa to 3868.0 Pa by EDAC treatment as well as K_2 from 1956.3 Pa to 5915.9 Pa, and the viscoelasticity can be modulated to close to that of decellularized ventricular tissue. The compatibility of the gels for cell culture after EDAC treatment was also investigated.

Key Words: Hydrogel, Cardiac Extracellular Matrix, Viscoelasticity

1 背景

心不全や心筋症など重篤な心疾患は未だに死因の大部分を占めている。近年では幹細胞由来心筋細胞が生体外での心筋組織の構築、心疾患のリモデリング、薬剤スクリーニングなどに応用され[1]、幹細胞から分化させた心筋細胞が心疾患の治療に果たす役割は大きい。幹細胞を心筋細胞へ分化誘導する代表的な手法としては、心臓発生に関与する成長因子を発生を模擬して適切なタイミングで培養皿上の幹細胞に作用させる方法[2]がある。

近年では心臓組織の細胞外マトリクス(ECM)を利用した幹細胞の分化手法が報告されている。脱細胞化心臓組織上で培養されたマウス胚性幹細胞(マウス ES 細胞)は心筋細胞へ分化し、脱細胞化肝臓組織上では肝臓細胞へ分化する傾向であったことが報告されている[3]。この報告から各臓器および組織の ECM を足場として幹細胞を分化させると、その臓器や組織に存在する細胞への分化が促進されることが示唆される。さらに心臓 ECM と I 型コラーゲンから成るハイドロゲル中でヒト ES 細胞胚様体を培養すると成長因子の添加をせずとも ES 細胞は心筋細胞へ分化したことが報告されている[4]。このように各臓器や組織の ECM が幹細胞の組織特異的な分化を促進することが強調されている。

一方で異なる弾性率を有するポリアクリルアミドゲル上で培養された間葉系幹細胞は、骨組織と同等の弾性率の足場上では骨原生細胞へ、筋組織と同等の弾性率の足場上では筋原性細胞へ分化したことが報告されている[5]。また心筋組織と同等の弾性率を有するポリアクリルアミドゲル上で培養された心筋細胞は最も良く拍動したことが報告されている[6]。前述の各臓器・組織特異的 ECM が及ぼす幹細胞の組織特異的な分化や細胞機能の発現に対する効果に加えて、細胞が存在する元の組織に適合した足場の力学特性が極めて重要であると考えられる。

以上の報告で足場素材に用いられてきたハイドロゲルはポリマーネットワーク中に多量の水分を含む粘性と弾性の双方を併せ持つ粘弾性体である。近年ではこの足場素材の粘弾性特性が培養細胞の挙動へ及ぼす影響が検討されている。粘弾性特性のパラメータのひとつである応力弛緩係数を有する足場上では単純弾性体の足場上よりも細胞接着面積および増殖が増加することが報告されている[7]。さらに応力弛緩係数が低い足場上で培養された間葉系幹細胞の増殖および骨分化が促進されることが示され[8]、目的に見合った細胞培養や幹細胞分化を行う上で足場素材の粘弾性特性を考慮に入れたバイオマテリアルをデザインすることは

が今後求められることが考えられる。

しかしながら心臓組織 ECM ハイドロゲルを用いた幹細胞分化や細胞挙動評価の報告では、ECM ハイドロゲルの力学特性の指標としてヤング率や動的弾性率のみが議論されている[4,9]。そのため心臓組織 ECM ハイドロゲルの粘弾性特性に関する詳細な評価が行われていない。さらに幹細胞の心筋細胞への分化や心筋細胞の機能発現に対して最も良い効果を持たらすと考えられる心臓組織と同等の力学特性まで心臓組織 ECM ハイドロゲルの力学特性を調整する検討は行われていない。

本研究ではヤギ心室組織 ECM 由来ハイドロゲル(vECM ゲル)の力学特性を非線形粘弾性モデルを用いて詳細に解析を行った。またカルボジイミド系架橋剤 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC)を用いて vECM ゲルの力学特性を脱細胞化心室組織と同程度まで調整できるかを検討した。さらに力学特性を調整した vECM ゲル上でラット胎児線維芽細胞の培養を行い vECM ゲルの力学特性が及ぼす細胞挙動への影響を評価した。

2 実験方法

2-1 vECM ゲルの作製

本研究では日本ザーネンヤギの心臓を利用した。まず切断したヤギの心室組織を生理食塩水で2時間液浸振盪した。その後、組織を1%(wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS)-phosphate buffer saline (PBS)溶液中で5日間、1%(vol/vol) Triton X-100-PBS 溶液中で24時間振盪することで脱細胞処理を行った。さらに脱細胞した組織を純水に3日間液浸振盪することで洗浄した。脱細胞組織を1 mg/ml Pepsin 溶液中で48時間消化し、1M NaOH および10X PBS を用いて心室 ECM 溶液の pH、塩濃度を生理学的条件(pH 7.4, 塩濃度 1X)まで調整した。この ECM 溶液 400 μ l を 3 mm 厚のシリコン鋳型より作製した ϕ 12.5 鋳型に流し込み、37 $^{\circ}$ C -5% CO₂ で1時間インキュベートし vECM ゲルを作製した。

2-2 vECM ゲルの力学特性の調整と圧縮試験

vECM ゲルの力学特性の調整は N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC; Sigma)を用いて行った。作製した vECM ゲル(ECM 濃度:2.5 mg/ml, 7.5 mg/ml, 12.5 mg/ml, 17.5 mg/ml)を EDAC 溶液(EDAC 濃度; 10mM, 30mM, 50mM, 100mM)に24時間室温で液浸することで処理した。

これらの vECM ゲルの力学特性の評価は Fig.1 の概略図に示す軟組織用圧縮試験装置を用いて行った。本研究では ϕ 12.5 コルク抜きで打ち抜いた脱細胞心室組織(DV-tissue)の力学特性も圧縮試験により評価した。

電子天秤(GR-120, A&D company)の秤量皿上にペトリディッシュ内に PBS で満たされた vECM ゲルをセットし、プレッサー(移動速度 0.0025 mm/s)で圧縮した。圧縮ひずみが約 5%に達した段階で、プレッサーの移動を停止し応力弛緩を約 3 分間観察した。これら圧縮-弛緩過程の load の変位を PC に記録した。圧縮応力は Eqs.1 より算出した。

$$\sigma = \frac{9.8x}{\pi r^2} \quad \text{Eqs.1}$$

Eqs.1 において、 σ ; 圧縮応力(Pa)、 x ; 電子天秤で測定した load(kg)、 r ; ゲルの半径(m)である。

2-3 力学モデルとデータ解析

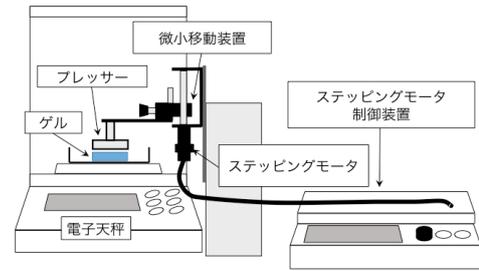


Fig. 1 The schematic drawing of compression unit

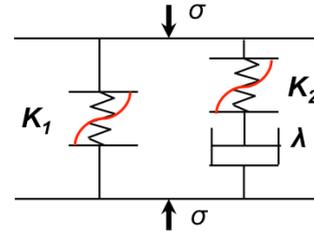


Fig. 2 Diagram of non-linear Kelvin model, which consists of two non-linear springs and a stress-relaxation dashpot

得られた ECM ゲルの力学特性の実験データには粘弾性非線形 Kelvin モデル(Fig.2)を適用した。非線形 Kelvin モデルの構成方程式は Eqs.2 のように表せる。

$$\sigma(t) = K_1 \varepsilon^\alpha(t) + K_2 \int_{-\infty}^t e^{-\frac{t-t'}{\lambda}} d(\varepsilon^{\alpha-1}(t')) \quad \text{Eqs.2}$$

Eqs.2 において、 σ ; ゲル中の応力(Pa)、 ε ; 圧縮ひずみ(1/s)、 α ; 非線形定数、 K_1 、 K_2 ; 弾性係数(Pa)、 λ ; 応力弛緩係数(s)である。

本研究では弾性係数 K_1 、 K_2 および応力弛緩係数 λ について評価した。さらに約 5%の圧縮ひずみにおける見かけ上のヤング率についても検討を行った。

2-4 力学特性を調整した vECM ゲルの細胞適合性の評価

EDAC 処理により力学特性を調整した vECM ゲル上に細胞を播種するため、EDAC 処理を施した vECM ゲルを 1% Penicillin-PBS 中で2日間液浸振盪し洗浄した。さらに洗浄した vECM ゲルを DMEM (10% FBS, 1% Penicillin 含有)に24時間液浸させた。DMEM での液浸後、ラット胎児線維芽細胞を 5000 cells ずつ vECM ゲル上へ播種し4日間培養を行った。EDAC 処理を施した vECM ゲルの接着性を評価するために Calcein-AM 染色を細胞播種24時間ごとに行った。さらに細胞播種24時間後の細胞の接着面積を Calcein-AM 染色後の細胞画像を元に Image J によって算出した。

3 実験結果

3-1 vECM ゲルの力学特性

vECM ゲルの力学特性を非線形 Kelvin モデルにより評価した。さらに vECM ゲルをカルボジイミド系架橋剤 EDAC による処理によって vECM ゲルの力学特性が脱細胞心室組織と同程度まで調整できるかを検討した。

vECM ゲルの圧縮試験における実験データの一例を Fig.3 に示す。vECM ゲルは粘弾性体に特有な応力弛緩を示し、さらに非線形 Kelvin モデルは実験データをよく回帰できることが分かった($R^2=0.99$)。

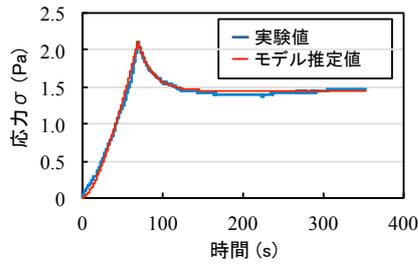


Fig. 3 Experimental data and their regression via the non-linear Kelvin model

Fig.4 に弾性係数 K_1 (A)、弾性係数 K_2 (B)、応力弛緩係数 λ (C)、見かけ上のヤング率(D)の結果を示す。各 ECM 濃度の vECM ゲルの弾性係数 K_1 、 K_2 は EDAC 処理濃度の増加に伴って増加する傾向が確認できた(Fig.4(A), 4(B))。無処理- 2.5 mg/ml vECM ゲルの K_1 は 10.5 ± 1.4 Pa、 K_2 は 5.1 ± 1.9 Pa であったが、50mM EDAC 処理- 2.5 mg/ml vECM ゲルでは K_1 は 38.3 ± 23.4 Pa、 K_2 は 23.8 ± 14.2 Pa まで増加した。一方で無処理- 12.5 mg/ml vECM ゲルの K_1 は 129.5 ± 46.2 Pa、 K_2 は 191.1 ± 48.0 Pa であったが、100mM EDAC 処理- 12.5 mg/ml vECM ゲルでは K_1 は 3868.0 ± 1031.3 Pa、 K_2 は 5915.9 ± 840.9 Pa まで増加した。この結果から ECM 濃度の増加に伴って無処理 vECM ゲルの弾性係数は増加し、さらには ECM 濃度が高いほど EDAC 処理による弾性係数の向上に効果があることが示唆された。弾性係数 K_1 、 K_2 は EDAC 処理により増加したが、7.5 mg/ml、12.5 mg/ml、17.5 mg/ml vECM ゲルの応力弛緩係数 λ は EDAC 濃度の増加に伴って減少した(Fig.4(C))。さらに本研究では見かけ上のヤング率についても検討をおこなった。12.5 mg/ml および 17.5 mg/ml vECM ゲルの見かけ上の Young 率は EDAC 処理によって無処理のものとは最大で約 3-5 倍まで増加したものの、2.5 mg/ml および 7.5 mg/ml vECM ゲルでは約 2 倍の増加であった(Fig.4(D))。Fig.4(A)から Fig.4(D)の図中に示すピンク色の帯は脱細胞心室組織のそれぞれの力学特性の最大値と最小値の幅を示している。以上の結果から vECM ゲルの力学特性は EDAC 処理によりそれぞれ調整することができ、脱細胞心室組織と同程度の力学特性を有する vECM ゲルを作製できることが示唆された。

3-2 力学特性を調整した vECM ゲル上での細胞培養

EDAC 処理により力学特性を調整した vECM ゲル上でラット胎児線維芽細胞を培養し、EDAC 処理を施した vECM ゲルが細胞適合性を有しているかを評価した。本研究では、脱細胞心室組織と同程度の見かけ上のヤング率を有する vECM ゲル(30mM EDAC 処理-12.5 mg/ml vECM ゲルおよび無処理 17.5 mg/ml vECM ゲル)、脱細胞組織と比べ低いヤング率を有する vECM ゲル(10mM EDAC 処理-7.5 mg/ml vECM ゲル)、脱細胞組織と比べ高いヤング率を有する vECM ゲル(10mM EDAC 処理-17.5 mg/ml vECM ゲル)の 3 種類の異なるヤング率を有する vECM ゲル上でラット胎児線維芽細胞を培養した。Fig.5(A)にそれぞれの vECM ゲル上の線維芽細胞(培養 1 日目)を Celcein-AM により染色した蛍光観察画像を示す。線維芽細胞は EDAC 処理を施した vECM ゲル上で仮足を突出し良好に接着していることが確認できた。また単一細胞の接着面積を検討したところヤング率の増加に伴って接着面積が増加し、脱細胞心室組織と同等のヤング率を有する 30mM EDAC 処理- 12.5 mg/ml

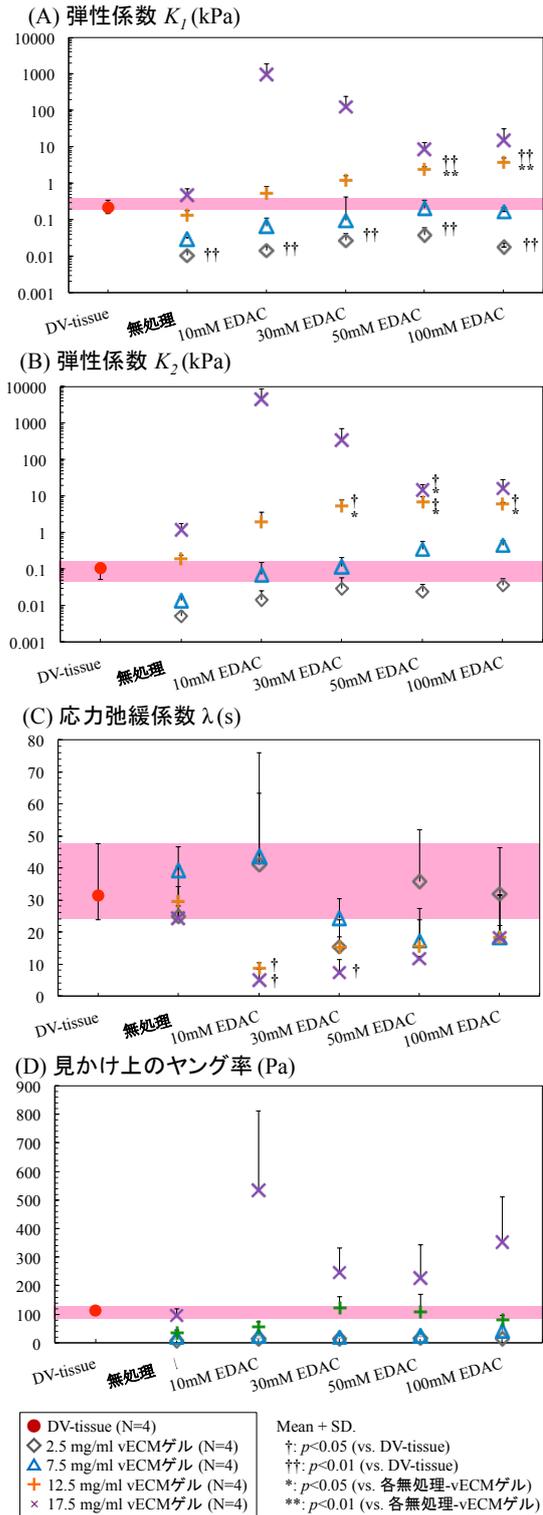


Fig. 4 The mechanical properties in non-treated, 10mM EDAC treated-, 30mM EDAC treated-, 50mM EDAC treated-, and 100mM EDAC treated-each vECM gel

vECM ゲルで細胞接着面積が最も広くなることが分かった(Fig.5 (A))。

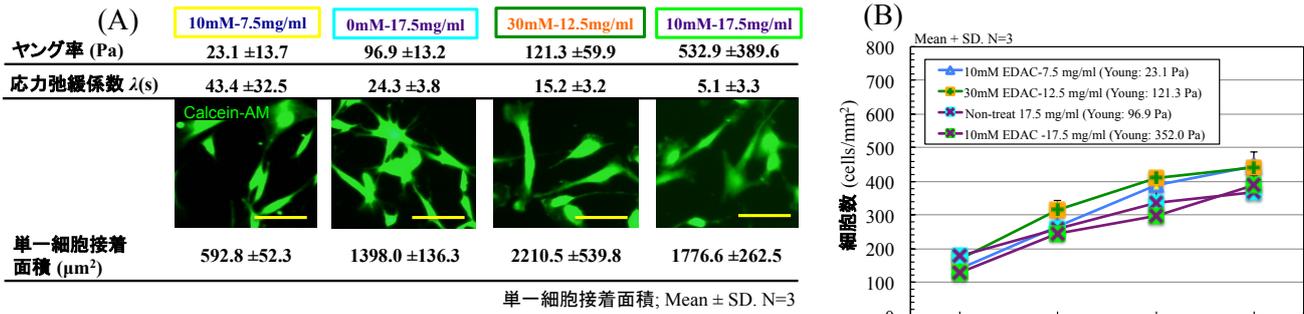


Fig. 5 The investigation of cellular compatibility of rat embryonic fibroblasts on the vECM gels (A) cellular morphology on the vECM gels. (B) Cell proliferation on the vECM gels

さらに培養 4 日間の単位面積あたりの細胞数の変化を評価したところ、それぞれの vECM ゲル上での線維芽細胞の増殖傾向は異なり、なかでも 10mM EDAC 処理-7.5 mg/ml vECM ゲルおよび 30mM EDAC 処理- 12.5 mg/ml vECM ゲル上で最も増殖する傾向であった(Fig. 5(B))。

4 考察

本研究ではヤギ心室組織 ECM 由来ハイドロゲル(vECM ゲル)の力学特性を非線形 Kelvin モデルによって詳細に解析した。またカルボジイミド系架橋剤 EDAC により vECM ゲルの架橋処理を行い vECM ゲルの力学特性を脱細胞化心室組織と同程度まで調整した。

EDAC はタンパク分子におけるアミノ酸残基のカルボキシル基と第一級アミンとの間にアミド結合を形成してタンパク分子同士を架橋させる[10]。それ故、ヒアルロン酸やコラーゲン、ゼラチンなど生体高分子足場の力学特性を向上させる架橋剤として用いられてきたが[11]、ECM ハイドロゲルでは EDAC を架橋剤として力学特性を調整する試みは行われていない。本研究の力学特性の解析によって、ECM 濃度の増加に伴って無処理 vECM ゲルの弾性係数は増加し、さらに ECM 濃度が高いゲルほど EDAC 処理による弾性係数の向上に効果があることが示唆された。

本研究の将来展望として力学特性を調整した vECM ゲルを足場素材としてヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化培養を行う。さらに vECM ゲルの詳細な力学特性を指標として、ヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化に対して vECM ゲルの力学特性が及ぼす影響について検討を行う予定である。しかしながら ECM ハイドロゲルを用いた幹細胞分化や細胞挙動評価の報告では、分化や細胞挙動に対する足場素材の力学特性の指標としてヤング率のみが議論されている。一方で足場素材の粘弾性特性が培養細胞の挙動へ及ぼす影響が検討され始め、応力弛緩係数が細胞挙動に影響を及ぼすことが示唆されている[7,8]。この報告を踏まえ、力学特性を調整した vECM ゲルの応力弛緩係数を指標として細胞挙動を評価したところ、応力弛緩係数が増加するにつれて細胞接着面積は減少し細胞増殖は促進される傾向であった(Fig.5(A))。

5 結論と展望

本研究ではヤギ心室組織 ECM 由来ハイドロゲルをカルボジイミド系架橋剤 EDAC により処理を行ったところ、EDAC 処理濃度の増加に伴い vECM ゲルの力学特性は向上し脱細胞化心室組織と同程度まで調整可能であることが明らかとなった。さらに EDAC 処理により力学特性を調整した vECM ゲル上でラット胎児線維芽細胞を播種したところ

細胞はゲル上に良好に接着・増殖し、vECM ゲルは細胞適合性を有していることが明らかとなった。

参考文献

- [1] G. Vunjak-Novakovic, N. Tandon, A. Godier, R. Maidhof, A. Marsano, T.P. Martens, M. Radisic, Challenges in cardiac tissue engineering, *Tissue Eng. Part B Rev*, Vol.16(2), pp.169-187, 2010.
- [2] C.L. Mummery, J. Zhang, E.S. Ng, D.A. Elliot, A.G. Elefanty, T.J. Kamp, Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a method overview. *Circ. Res*, Vol.11(3), pp. 344-358, 2012.
- [3] S. Higuchi, Q. Lin, T.K. Lim, S.B. Joshi, G.S. Anand, MCM, Chung, M.P. Sheetz, H. Fujita, Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells, *J. Biosci. Bioeng*, Vol.115(3), pp. 320-325, 2013.
- [4] Y. Duan, Z. Liu, J. O'Neill, L.Q. Wan, D.O. Freytes, G. Vunjak-Novakovic, Hydrogel composed of native heart matrix and collagen induces cardiac differentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, Vol.4(5), pp. 605-615, 2011.
- [5] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, Vol.126(4), pp. 677-689, 2006.
- [6] A.J. Engler, C. Carag-Kreiger, C.P. Johnson, M. Raab, H.Y. Tang, D.W. Speicher, J.W. Sanger, J.M. Sanger, D.E. Discher, Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating, *J. Cell. Sci.*, Vol.121, pp. 3794-3802, 2008.
- [7] O. Chaundhuri, L. Gu, M. Dernell, D. Klumpers, S.A. Bencherif, J.C. Weaver, N. Huebsch, D.J. Mooney, Substrate stress relaxation regulates cell spreading, *Nat. Commun.*, Vol.6(6364), 2015.
- [8] O. Chaundhuri, L. Gu, D. Klumpers, M. Dernell, S.A. Bencherif, J.C. Weaver, N. Huebsch, H.P. Lee, E. Lippens, G.N. Duda, D.J. Mooney, Hydrogels with tunable stress-relaxation regulate stem cell fate and activity, *Nat. Mater.*, Vol.15(3), pp. 326-334, 2016.
- [9] M.E. Jeffords, J. Wu, M. Shan, Y. Hong, G. Zhnag, Tailoring Material Properties of Cardiac Matrix Hydrogels to Induce Endothelial Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, Vol7(20), pp.11053-11061, 2015.
- [10] C. Williams, E. Budina, W.L. Stoppel, K.E. Sullivan, S. Emani, S.M. Emani, L.D. Black.III, Cardiac Extracellular Matrix-Fibrin Hybrid Scaffolds with Tunable Properties for Cardiovascular Tissue Engineering, *Acta Biomater*, Vol.14, pp. 84-95, 2015
- [11] S.N. Park, J.C. Park, H.O. Kim, M.J. Song, H. Suh, Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking, *Biomaterials.*, Vol.23(4), pp.1205-1212, 2002.
- [12] C.R. Lee, A.J. Grodzinsky, M. Spector, The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis, *Biomaterials.*, Vol.22(23), pp.3145-3154, 2001.