

# Accounts of Materials & Surface Research

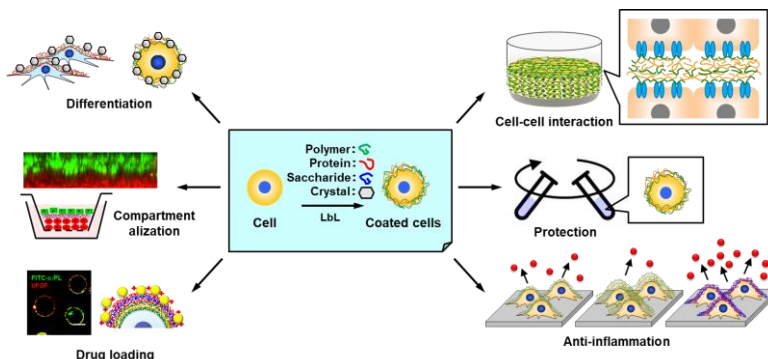
## Physicochemical Design of Cell Surfaces for Tissue Engineering Applications

Michiya Matsusaki\*

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University  
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan  
m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

In recent years, cells have attracted attention as a new modality in the field of drug discovery. Cell therapy means a treatment in which cellular material is transplanted into a patient by injection or other means. Cells used in cell therapy can be broadly classified into three types: (1) cells harvested from patients or others as they are, (2) cells harvested from patients or others and modified to provide function, and (3) target cells derived from pluripotent stem cells (iPSCs) from patients or others. Historically, harvested cells have been transplanted as is, but recent developments in gene editing technology have led to an increasing number of therapies using cells with innovations that enhance the recognition and activation of target cells, such as chimeric antigen receptor transgenic T cells (CAR-T cells). However, issues of gene editing technology such as off-targeting, low quality, and inducing side effects have been reported. To solve these problems, a "chemical and physical approaches to cell design," which is more flexible, reproducible, and transient, is effective.

We reported a method for controlling cell microenvironment by coating the cell membrane surfaces with layer-by-layer nanofilms of polyelectrolytes and extracellular matrices. The coatings induced cell-cell interaction to construct three-dimensional tissues, specific protein secretion, and differentiation. Moreover, design of elastic modulus at cancer cell microenvironments (mechano-design) by coordination bond formation between collagen and transition metal ion has been discovered. Physicochemical design of cell surfaces will be a new strategy to provide specific functions to therapeutic cells for biomedical applications.



Physicochemical design of cell surfaces will be a new strategy to provide specific functions to therapeutic cells for biomedical applications.

**Keyword:** Cell surface, nanofilm coating, mechano-design, extracellular matrices

**Michiya Matsusaki** was born in Kagoshima, Japan in 1976. He received his Ph.D. degree in 2003 from Kagoshima University. He started his academic career as a Postdoctoral fellow at Osaka University in 2003. He was a visiting scientist at Lund University in 2004. In 2006, he joined the Department of Applied Chemistry in the Graduate School of Engineering at Osaka University as an Assistant Professor. He was promoted to Associate Professor in 2015 and to full Professor in 2019. He was a JST-PRESTO researcher (Concurrent position) from 2008 to 2011 and from 2015 to 2019. He was awarded 20 awards including the Young Scientist's Prize by the Minister of Education, Culture, Sports, Science, and Technology. His research interest is biomaterials and tissue engineering for regenerative medicine and pharmaceutical applications.



# 細胞表面の物理化学的デザインと組織工学への応用

松崎典弥

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻

## 1. 緒言

近年、創薬や医療分野において新しいモダリティとして注目されているのが細胞である。低分子医薬からペプチド・核酸などの中分子、さらには抗体・遺伝子などの高分子医薬を経て、細胞をいかに活用できるかが問われている。細胞を治療モダリティとして用いた場合のメリットは、①幹細胞や前駆細胞を患部に移植することでその幹細胞がある特定の細胞に分化して損傷部位を修復する、②分化した細胞は、損傷した組織と置き換わるように統合され、臓器や組織の機能改善を促進する、③移植細胞が損傷部位で比較的短～中期間(数日から数週間)生存し、増殖因子やケモカインを産生することで、産生されたタンパク質のパラクライン効果により回復する、などがあげられる。いずれも従来の創薬モダリティでは得ることができない効果であり、細胞モダリティの魅力の一つである。

細胞を治療や創薬のモダリティとして活用する

ためには、生体から採取してそのまま使用する、または生体外で培養して増幅・分化誘導して使用する、というのが従来のやり方であったが、機能が不十分である、または細胞間・ロット間のばらつきが大きい、などの問題があった。そこで近年注目されているのが、遺伝子改変技術により標的細胞の認識と活性化を高める工夫を施したキメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞(CAR-T細胞)<sup>1)</sup>である。CAR-T細胞は、がん細胞の表面に発現する特定の抗原を認識して攻撃するように設計されており、血液がんにとっても高い治療効果を示すことが明らかとなった。このように、遺伝子編集技術を用いて“細胞をデザイン”する技術開発が注目されているが、オフターゲットやゲノム不安定化、サイトカイン放出症候群、正常組織への副作用、スイッチオフができない、品質の不均一性、長時間処理が必要、高額、など様々な課題点が報告されている<sup>2)</sup>。これらを解決するためには、ゲノム編集より自由度が高く、

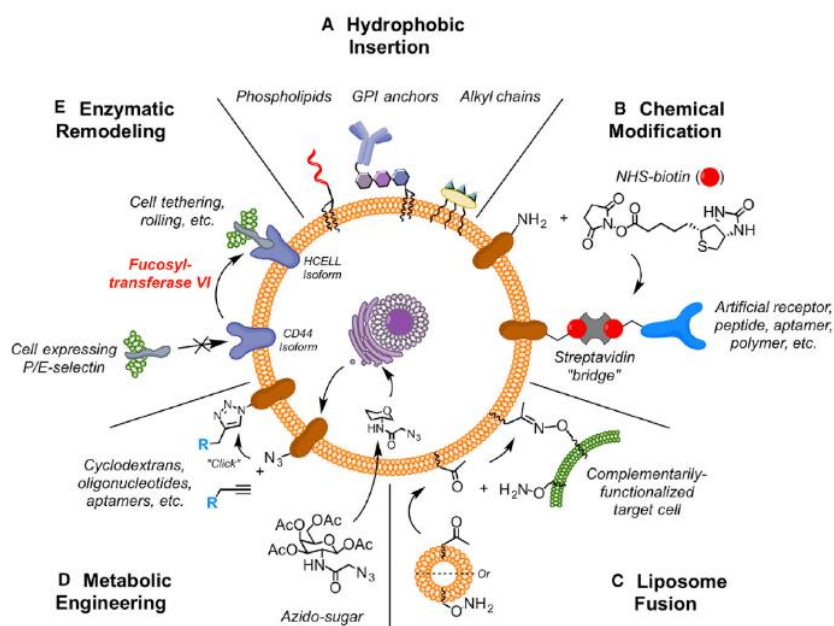
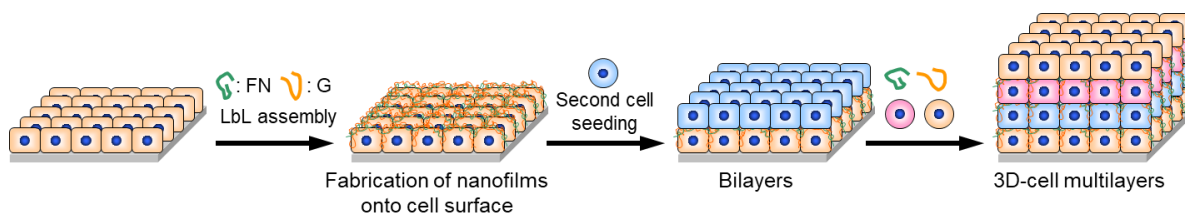


Fig. 1. Chemical approach for cell surface modification. Reproduced with permission from ref. 3.



**Fig. 2.** Illustration of cell multilayer fabrication by coating of nanometer-sized films on cell surfaces.

高い再現性を有し、一過性である“化学的なアプローチによる細胞デザイン”が有効と考えられる。そこで、化学的な手法による細胞デザインの我々のこれまでの研究と今後の展望について紹介する。

## 2. 化学的細胞デザイン

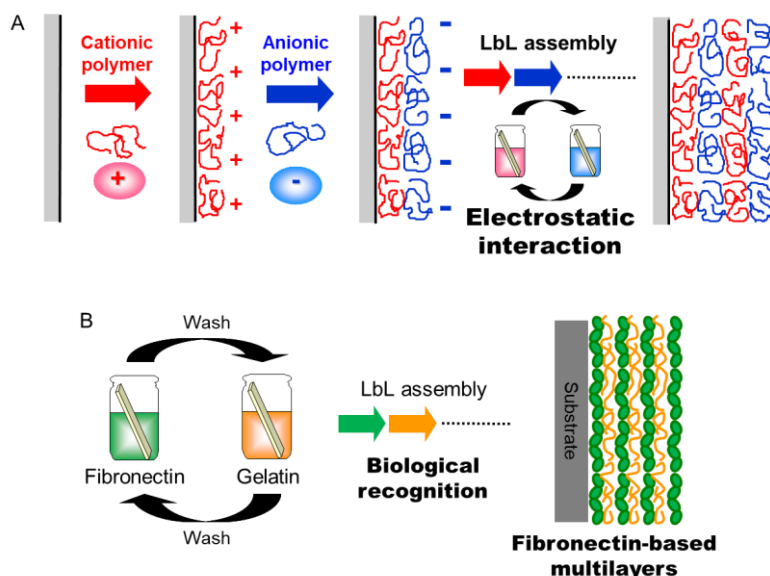
遺伝子編集技術では、機能分子をコードした遺伝子を細胞に導入してタンパク質として発現させることで機能性分子が細胞表面に提示される。安定的に発現する細胞のみを回収して増幅することで、恒常的に発現する細胞も作製できる。一方、化学的なアプローチによる細胞デザインでは、機能分子を細胞膜に挿入または結合することで機能性分子を細胞膜表面に提示する。

**Fig. 1** は、化学的なアプローチによる細胞膜機能化のまとめを示した<sup>3)</sup>。A は疎水性基の細胞膜挿入、B は共有結合形成、C はリポソームによる膜融合、D は代謝工学による糖鎖末端へのア

ジド基の提示、E は酵素リモデリングを示している。どの方法においても様々な修飾が報告されているが、長期間の安定した機能発現が困難である点が共通の課題としてあげられる。そこで我々は、全く異なる細胞表面の化学的デザイン方法を考案した。

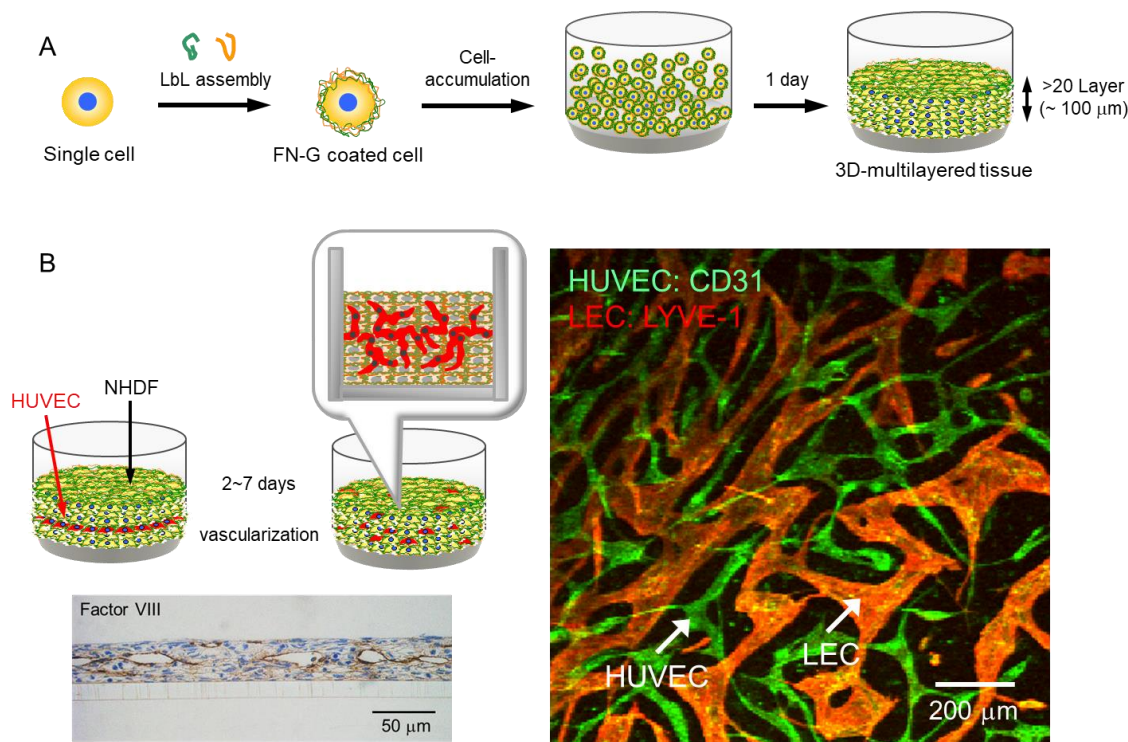
## 3. 細胞膜の薄膜コーティング: 細胞積層法

細胞は、外部との情報交換や機能発現を細胞膜界面で制御している。生体内において、細胞の界面構造と機能の制御に重要な役割を果たしているのが、細胞周辺に存在する細胞外マトリックス (ECM) タンパク質である。例えば、細胞接着とは細胞膜のインテグリン分子と ECM との相互作用であり、また、ECM 成分であるフィブロネクチンやビトロネクチンと細胞膜分子の相互作用が細胞の生存や増殖、シグナル伝達、分化誘導に強く影響することが報告されている。そこで、我々は、この ECM の働きに着目し、



**Fig. 3.** Illustration of layer-by-layer (LbL) assembly driven by typical electrostatic interaction (A) and biological recognition (B).





**Fig. 4.** Illustration of cell accumulation method (A). Construction of vascularized tissues by adding HUVEC or LEC (B).

ECM のように細胞の界面構造を制御できれば細胞の組織化や機能を操作できると考え、細胞の表面を ECM 成分の薄膜でコーティングする手法を考案した。細胞膜表面全体にコーティングすることで、薄膜は安定かつ長期的に維持できると期待される。

ECM 薄膜で細胞表面をコーティングすることで、隣の細胞のインテグリン分子との相互作用が誘起され、細胞を三次元的に積層できると考えた。つまり、“ナノレベルののりづけ”である。薄膜コーティングにより細胞間の接着を誘起することで、三次元組織体を構築することを目標とした (Fig. 2)。

細胞表面へ ECM 薄膜を形成する手法として、我々は、ナノメートルオーダーで高分子薄膜を調製できる「交互積層法」<sup>4)</sup>を用いた (Fig. 3)。接着タンパク質として知られるフィブロネクチン (FN) とコラーゲンの変性体であるゼラチン (G) の交互積層薄膜 (FN-G 薄膜) をおよそ 6 nm の膜厚で細胞表面に形成すると、二層目の細胞が接着した。FN は細胞表面の  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンとコラーゲン/ゼラチンの両方との相互作用ドメインを有しているため、わずか 6 nm という膜厚

でも細胞接着足場として機能したと考えられる。一方、対照実験として薄膜を形成しない場合や膜厚が薄い場合、均一な積層組織体は得られなかった。本手法を繰り返すことで、望みの細胞を望みの層に配置した細胞積層組織体が作製できることを見出した (細胞積層法)<sup>5)</sup>。本手法を用いることで、これまで、「血管壁モデル」<sup>6,7)</sup>や「骨格筋モデル」<sup>8)</sup>、細胞のインクジェットプリントに応用した「肝組織チップ」<sup>9)</sup>などを報告してきた。

#### 4. 細胞集積法

以上のように、細胞積層法は細胞の配置を一層ずつ制御して多層組織体を作製できる画期的な手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで半日ほど培養する必要があり、1 日二層の作製が限度であった。例えば、十層の構造を作製するためには約 5 日必要である。より短時間で積層構造を構築できれば、幅広い応用展開が期待される。そこで、単一細胞表面に FN-G 薄膜を形成することで、短時間で三次元組織体を構築できる「細胞集積法」を新たに考案した (Fig. 4A)<sup>10)</sup>。各細胞が FN-G 薄膜を介して三次元的に相互作用することで、一度に 20

層以上の積層組織体が1日で作製できることを見出した。

生体内には、およそ100~200  $\mu\text{m}$  に一本の毛細血管が存在することで栄養を供給している。そのため、100  $\mu\text{m}$  以上の組織体において内部細胞の壊死を防ぐためには、毛細血管網を構築する必要がある。そこで、我々は、細胞集積法を用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) や皮膚微小リンパ管内皮細胞 (LEC) のサンドイッチ培養を行うことで、毛細血管だけでなくリンパ管の構築を検討した (Fig. 4B)。その結果、毛細血管およびリンパ管網が共存した三次元組織体を得ることに成功した<sup>10-12)</sup>。これらのネットワークは全体に均一に形成され、ネットワークが占める体積はおよそ50~60%、チューブ間距離は100~150  $\mu\text{m}$  であった。様々な解析により、周辺の線維芽細胞から産生された血管新生因子がHUVECやLECのチューブ化に重要であることが確認された。

また、細胞表面に形成する薄膜の性質に応じて細胞間接着以外にも細胞膜保護効果<sup>13)</sup>、抗炎症性制御<sup>14)</sup>、分化誘導能<sup>15)</sup>、細胞隔離<sup>16)</sup>、薬物担持能など、様々な機能を付与できることを見出した。作製した薄膜は数日から1週間は細胞表面に安定に存在し、新しい化学的細胞デザイン方法として有用であった。

## 5. 沈殿培養法

細胞集積法は細胞積層法の10倍以上の加速化を可能にした手法であるが、収率が6割程度であることや1時間以上の多段階プロセスが必要であり、社会実装を実現するためには更なる改善が求められていた。そこで、細胞間接着を瞬時に誘起し、三次元組織体を作製できる手法

の開発に取り組んだ。様々な高分子やタンパク質、多糖を検討した結果、ヘパリンが最も細胞膜と高い相互作用を示すことを見出した。詳細は不明であるが、ヘパリンは様々な膜タンパク質やECM、膜酵素とnM~ $\mu\text{M}$ の解離定数で相互作用することが報告されている<sup>17)</sup>。細胞膜ヘパリンと細胞を混合して1分間遠心分離することで細胞が会合した粘稠性の組織体を得られることが分かった。しかし、ヘパリンは細胞接着性に乏しく、そのままでは組織体を得ることはできなかった。そこで、ECMとしてコラーゲンに着目し、ヘパリンとコラーゲンの割合を最適化することで、瞬時に会合するヘパリンの性質とコラーゲンの細胞接着性を併せ持つ「沈殿培養法」を確立することができた (Fig. 5)。沈殿培養法は、処理時間5分以内、収率99%と細胞集積法の課題を解決可能であり、これまで、毛細血管を有する肝組織モデル<sup>18)</sup>や患者がん初代培養への応用を報告しており、がん治療薬の個別化医療に関する臨床試験に向けた準備を進めている。商業化への道筋が見えてきた。

## 6. 細胞環境のメカノデザイン

これまでは細胞膜と相互作用するタンパク質や多糖による細胞間接着の誘導について主に紹介してきたが、細胞の機能発現や機能維持には硬さ-柔らかさの物理的な因子も大きく影響することが知られている。例えば、ECMなど細胞微小環境の力学的刺激に応答して転写共役因子であるYAP/TAZが幹細胞の増殖や分化を誘導することが報告されている<sup>19)</sup>。また、乳がんや膵がんでは、がん関連線維芽細胞がコラーゲン線維を大量に産生することで間質が硬くなり、数十~百kPaまで増加することが報告され

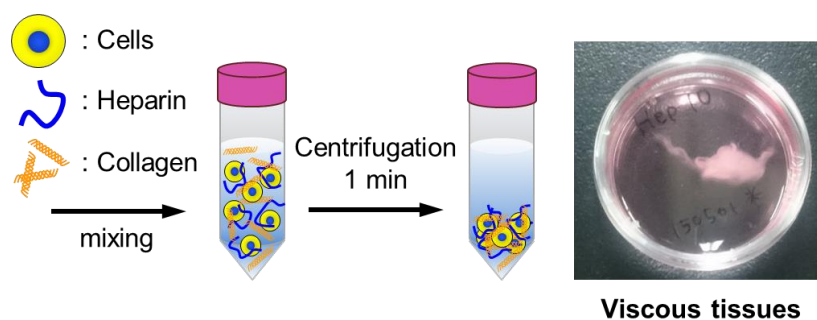
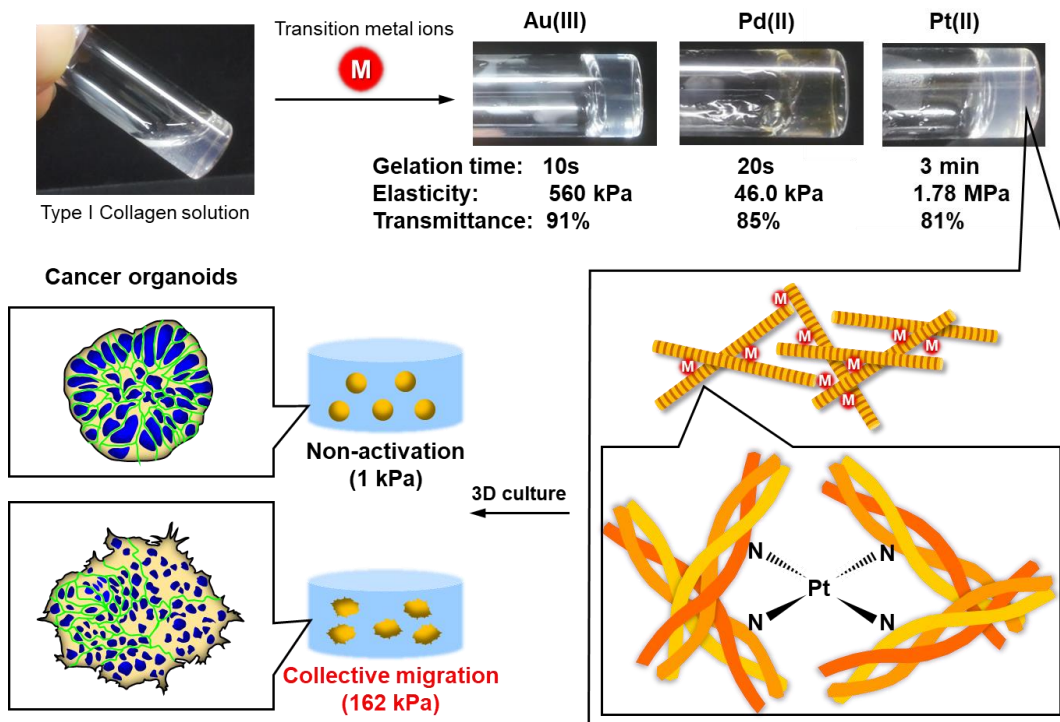


Fig. 5. Illustration of sedimentation culture.



**Fig. 6.** Illustration of collagen-transition metal gels and their application for malignancy control of cancer organoid by elastic modulus control.

ており、乳がんのステージと密接に関係していることが明らかになっている<sup>20)</sup>。従って、細胞微小環境の硬さを制御することは細胞の機能制御に関する研究や薬効評価、毒性試験において重要であるが、これまで合成高分子ではなく実際のECMを用いて生体類似の硬さ(弾性率)の幅広い制御を行うことは困難であった。ECMの主成分であるコラーゲンは細胞の三次元培養に幅広く用いられてきたが、中性水溶液への溶解性に乏しく高濃度化が困難であるため、1 wt%以下の低濃度において酸性水溶液の中和と加温によるコラーゲンゲル形成が一般的に用いられてきた。しかし、その弾性率は10 kPa以下と低く、生体類似の高弾性率の再現は困難であった。

最近、我々は、I型コラーゲンのリン酸緩衝食塩水に遷移金属イオンを添加することで数分以内に高弾性率かつ透明なコラーゲンゲルが得られることを見出した<sup>21)</sup>。遷移金属イオンとコラーゲンの窒素や酸素原子との配位結合による架橋が形成され、イオン濃度に依存した弾性率および透明度の制御が可能であった。本コラーゲンゲルを用いて患者由来大腸がんオルガノイド

を三次元培養したところ、162 kPaの高弾性率ゲルにおいて転移過程において見られる集団的細胞移動が観察された(**Fig. 6**)。細胞環境の弾性率制御によるがん細胞の悪性度制御の可能性が示唆された。本手法により、患者がん細胞をその悪性度を維持した状態で生体外で培養できれば、動物実験を用いずに薬効・毒性スクリーニングを行うことが可能になると期待される。

### 7. 総括

本論文では、細胞モダリティの可能性に向けた物理化学的な細胞デザインについて我々の研究を紹介した。細胞をニューモダリティとして医療・創薬に有効に活用するためには、安全性、均質性、再現性の高い機能化法の開発が重要である。遺伝子編集技術は機能性タンパク質を恒常的に発現させるメリットがあるが、安全性や副作用、煩雑、不均一性など課題も多い。一方、化学的な修飾による細胞の機能化は、簡便、均一、高い再現性というメリットがあるが、安全性や長期安定性への課題があり、これらの解決がまず重要である。



また、忘れてはならないのは「生体内の動的な環境変化」である。機能化された細胞がその効果を発揮する場所は、腫瘍や損傷部位、炎症部位など通常的环境とは異なる劣悪な環境である。例えば固形腫瘍の場合、間質を構成する線維性コラーゲンが大量に存在し、マクロファージや線維芽細胞、腫瘍血管、炎症性サイトカイン・ケモカインなどが高密度に存在する、まさに巣のような状態を潜り抜け、奥に潜むがん細胞に作用しなければならない。*In vitro* の培地のみの環境とは劇的に異なる環境で最も機能を発現できるように細胞をデザインしなければならない。

細胞は、その状況に応じて姿やかたち、性質を変え、自ら増幅し、タンパク質や化合物を長期的に発現・徐放できる、もともと高機能な微粒子である。この細胞が持つ機能を最大限引き出し、新たな機能を付与し、医療や創薬にどのように活用できるかが問われている。

- 4739-4748.
- 13) Matsuzawa, A. et al., *Langmuir*, 2013, **29**, 7362-7368.
  - 14) Kadowaki, K. et al., *Chem. Lett.*, 2012, **41**, 523-524.
  - 15) Choi D. et al., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2018, **4**, 1813-1842.
  - 16) Zeng, J. et al., *Small*, 2020, **16**, 1907434.
  - 17) Capila, I. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 390-412.
  - 18) Naito, Y. et al., *Acta Biomater.* 2022, **140**, 275-288.
  - 19) Panciera, T. et al., *Nat. Rev. Mechanobiol.* 2017, **18**, 758-770.
  - 20) Evans, A. et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 2014, **143**, 153-157.
  - 21) Suezawa, T. et al., *Adv. Sci.*, in press.

## 参考文献

- 1) Eshhar, Z. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 720-724.
- 2) Bonifant, C. L. et al., *Mol. Ther. Oncolytics*, 2016, **3**, 16011.
- 3) Csizmar, C. M. et al., *Cell Chem. Biol.*, 2018, **25**, 931-940.
- 4) Decher, G., *Science*, 1997, **277**, 1232-1237.
- 5) Kadowaki, K. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 4689-4692.
- 6) Matsusaki, M. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **50**, 7557-7561.
- 7) Chetprayoon, P. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 4461-4466.
- 8) Gribova, V. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, **474**, 515-521.
- 9) Matsusaki, M. et al., *Adv. Healthcare Mater.*, 2013, **2**, 534-539.
- 10) Nishiguchi, A. et al., *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 3506-3510.
- 11) Matsusaki, M. et al., *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 454-474.
- 12) Nishiguchi, A. et al., *Biomaterials*, 2014, **35**,