

博士論文

Development of a Fluorous Gel as Cell Culture Substrate

(細胞培養基質としてのフルオラスゲルの開発)

宮島 浩樹

緒言

再生医療の発展から、細胞を立体的に培養し、複雑な組織を構築する技術が報告されてきており、それに伴って細胞を目的の位置に局在させるような立体的制御や分化を誘導させるような機能的制御を可能にする培養法の開発も進められている^[1]。しかしながら、細胞を高度に積層、凝集させるような培養系では、その凝集体内部における酸素不足のために細胞死が生じてしまう^[2]。よって、将来的に十分な大きさの組織を構築するためには、その組織を構成する細胞への酸素供給技術が求められる。そこで、フルオラス溶媒の高い酸素溶解性に着目した。

フルオラス化合物は、高度にフッ素化された化合物であり、分子間の van der Waals 力が極めて小さいために、水や多くの有機溶媒と混合した際、フルオラス化合物のみからなる第三の層を形成する (Figure 1)。このことから「フルオラス」=「親フルオロカーボン性の」という意味を示し、フルオラス化合物同士の高い親和性が、有機合成における化合物の分離、回収の技術としてこれまで研究されてきている^[3]。

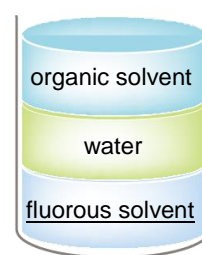


Figure 1. Separation of phases (organic-aqueous-fluorous).

さらに、前述のように、フルオラス溶媒は分子間の van der Waals 力が小さいために、高い酸素溶解性を有することが知られており、水と比較して約 20 倍の酸素を溶解することが報告されている^[4]。フルオラス溶媒の高い酸素溶解性を応用して、人工血液としての利用も研究されていたが、大きな進展はいまだ報告されていない。

当研究室の先行研究においても、細胞培養に利用可能なフルオラス溶媒のスクリーニングテストの結果を報告している^[5]。その報告では、培地をフルオラス溶媒(1*H*, 1*H*, 7*H*-ドデカフルオロ-1-ヘプタノール, DFH)に置換しても (Figure 2)、B16 マウスメラノーマ細胞が 4 日間後でも高い生存率を示した^[5]。

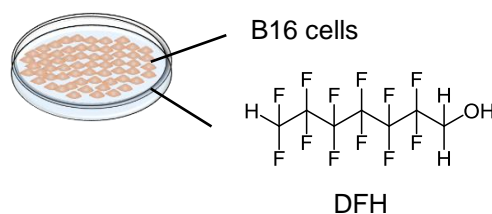


Figure 2. Culture of B16 cells in DFH.

そこで本研究では、フルオラス溶媒由来のゲル(フルオラスゲル)を作製し、細胞培養における酸素供給源となるような新しい材料の開発に取り組んだ。フルオラスゲルの報告例は極めて少なく、その中でも細胞培養への応用を目的としたフルオラスゲルは、これまでにない新しい細胞培養基質として期待できる。

DFH ゲルの作製

当研究室の先行研究において、細胞培養での応用の可能性が示唆されたフルオラス溶媒の 1*H*, 1*H*, 7*H*-ドデカフルオロ-1-ヘプタノール(DFH)を溶媒としたゲル作製を目指した。DFH はフルオラスアルコール類である点に着目し、ゲル化剤として 2,3-*n*-ジデシロキシアントラセン(DDOA, Figure 3A)を選択、合成した。DDOA ゲル化剤はメタノールなどのアルコール類のゲル化剤としてすでに報告されており、芳香環部位の π - π スタッキング相互作用および長鎖アルキル部位の van der Waals 力によって、繊維を形成し、溶媒を閉じ込めてゲルが生じる^[6]。

合成した DDOA を濃度 2.0 mM-4.0 mM (0.05wt%-0.1wt%) になるように DFH へ添加し、加熱・溶解した。その後、常温で約 10 分間放冷することで、目的の DFH を溶媒としたゲル(DFH ゲル)を作製した(Figure 3B)。得られたゲルについて、乾燥したサンプル(キセロゲル)を走査型電子顕微鏡(SEM)によって観察し、約 100 nm-200 nm 幅の繊維が確認できた(Figure 3C)。以上のように、DDOA ゲル化剤によるフルオラス溶媒 DFH のゲル化に成功した。

DDOA ゲル化剤から作製したゲルは、加熱することでゾル化し、冷却することでゲル化するような温度応答性を示すことが報告されている。DFH ゲルについても、上記のような温度応答性を確認できた。ゲル化温度やゾル化温度をコントロールすることができれば、目的の温度において、ゲルを用いた細胞の内包や放出が期待できる。DDOA ゲル化剤を用いたメタノールを溶媒としたゲルの場合では、ゲル化剤濃度を制御することで、容易にそのゾル-ゲル転移の温度制御が可能であることが報告されている^[7]。よって、DFH ゲルについて、様々な濃度の DDOA を用いてゲルの溶解温度(ゾル化温度)を測定した(Figure 4)。

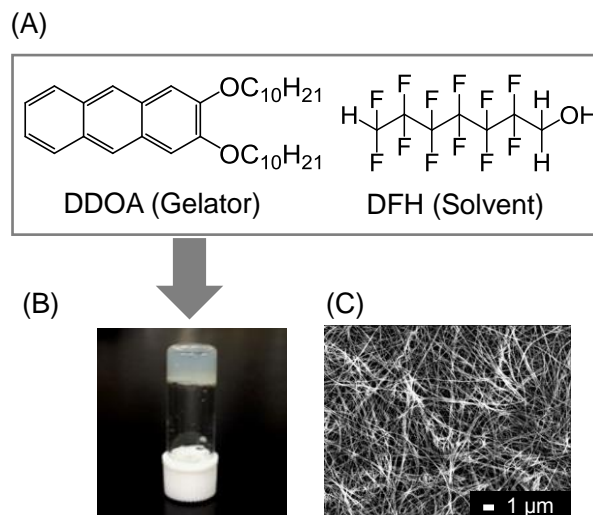


Figure 3. (A) Chemical structure of DDOA gelator and dodecafluoro-1-heptanol (DFH). (B) Gelation of DFH. (C) SEM image of fluorinated gels of DFH by using DDOA.

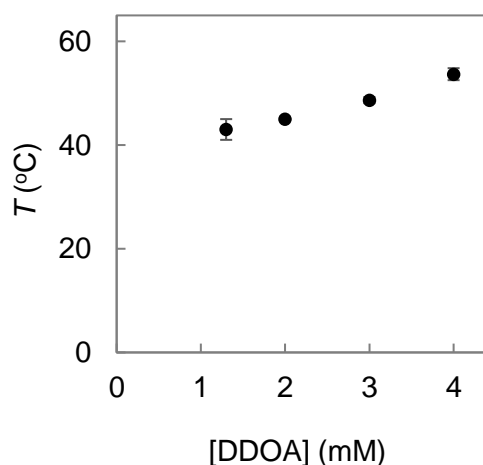
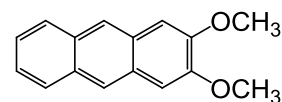


Figure 4. Solation temperature in the presence of various concentrations of DDOA.

その結果、DDOA-メタノールゲルの報告のように、ゲル化剤の濃度を低下させることで、ゾル化温度の低下が見られた。[DDOA]=4 mM のときのゾル化温度は 54 °C であり、[DDOA]=1.3 mM のときは 43 °C であった(Figure 4)。さらにゲル化剤濃度を低下させると、ゲルの流動性が増大する結果となった。本研究でのフルオラスゲルは細胞培養基質としての応用を目指しているため、ゲルの溶解は 37 °C 近傍が望ましいと考え、溶解温度をさらに低下させる試みを検討した。

そこで、アルキル鎖の短い 2,3-ジメトキシアントラセン(DMOA, Figure 5)と DDOA ゲル化剤を混合したゲルの作製を考えた。DMOA は長鎖アルキル基を有していないため、ゲル化剤として機能しないことが予想される。しかし、アントラセン骨格を有していることから、 π - π スタッキング相互作用によって DDOA と相互作用することで、DDOA ゲル化剤の安定的な繊維の形成が妨げられることを期待した。よって、DMOA 存在下で作製したゲルは繊維が不安定なものとなり、その結果、より低温での溶解が可能となることを予想した。

DMOA が DFH 中でゲル化剤として機能しないことを確認し、DDOA と DMOA 混合系によるフルオラスゲルを作製した。[DDOA]+[DMOA]=4.0 mM に統一し、その中で各混合量を変えたゲルの溶解温度測定を行った。その結果、DMOA の量を増大すると、ゲルの溶解温度の低下が確認でき、その混合比によって 27 °C-40 °C でゲルの溶解が可能であった(Figure 6)。したがって、DDOA ゲル化剤のみでは、43 °C-54 °C であったゾル化温度が、DMOA の混合によって、より低温で微細にコントロールすることに成功した。また、DDOA と DMOA 混合系で作製したゲルを乾燥したサンプル(キセロゲル)について、SEM による観察を行った(Figure 7)。その結果、予想したように、ゲルの繊維密度が DDOA のみ(Figure 3C)と比較して大きく減少していることが明らかとなった。



DMOA (Non-gelator)

Figure 5. Chemical structure of DMOA.

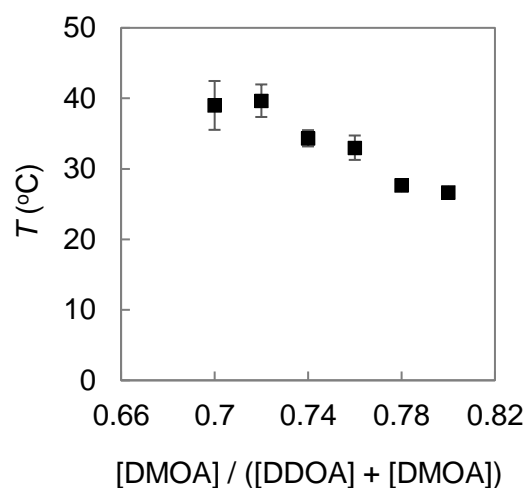


Figure 6. Solution temperature in the presence of various amounts of DDOA and DMOA.

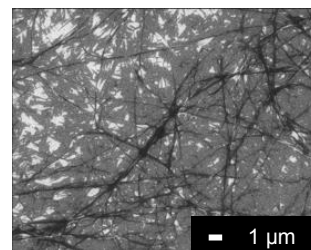


Figure 7. SEM image of fluororous gel of DFH by using mixture of DDOA and DMOA.

DFH ゲルの細胞培養への応用

作製した DFH フルオラスゲルが、細胞培養において酸素供給源として機能できるかどうかを検討した。「(A) 培地(25 mL)とフルオラスゲル(F-Gel; 1.5 mL)」「(B) 培地のみ(25 mL)」のそれぞれの系において、細胞培養過程での培地中の溶存酸素量の変化を測定した。

その結果、培養 96 時間(4 日間)後、培地のみ(B)では、溶存酸素量の大きな低下が確認された(7.17 mg/L (0 h) → 3.37 mg/L (96 h), Figure 8B)。一方、フルオラスゲル存在下(A)では、培地のみ(B)と比較して、溶存酸素量の大きな低下は見られなかった(7.17 mg/L (0 h) → 5.83 mg/L (96 h), Figure 8A)。これらの結果から、フルオラスゲルが細胞によって消費される酸素を補い、溶存酸素量の著しい低下を抑制したことが示唆された (Figure 9)。以上より、フルオラスゲルは、細胞が消費する酸素を供給できる材料であることが示唆された。

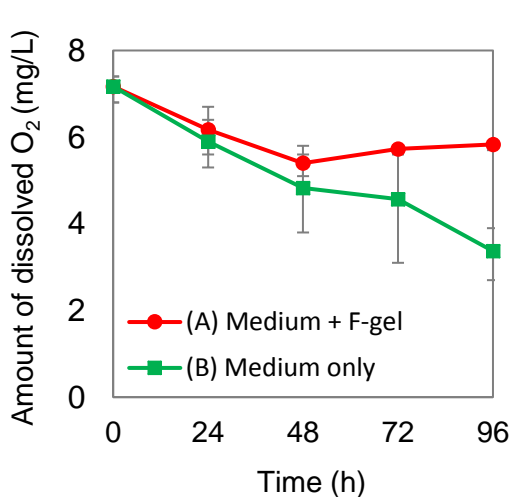


Figure 8. Amount of O₂ in the presence of fluoros gel.

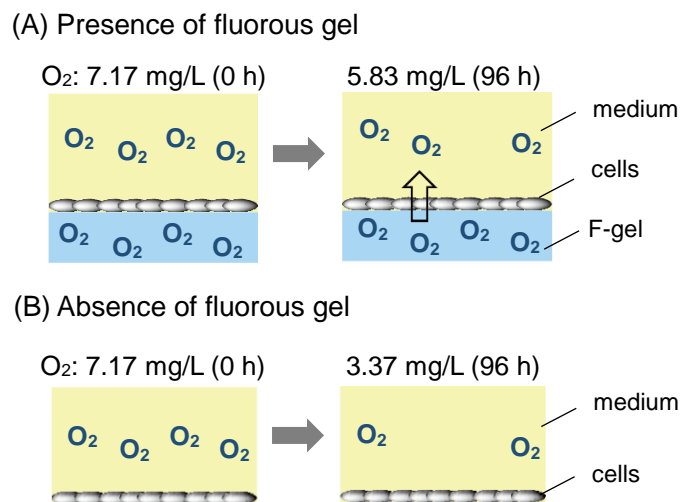


Figure 9. Effect of fluoros gel on the amount of O₂ in the culture medium.

生体材料としての将来的な利用を目指したとき、培養環境に影響を受けると予想されるような細胞種であっても培養可能であることが望ましいと考えた。よって、マウス胎児由来の初代神経細胞の培養を試みた。作製したフルオラスゲルの構成成分は、約 99wt%がフルオラス溶媒(DFH)であることから、第一段階として DFH(溶媒)を用いて初代神経細胞の培養を行った。初代神経細胞はマウス胎児 (ICR マウス, 妊娠 17 日目)由来の細胞を採取し、培地中(ニューロベーサル, B-27 サプリメント含有)で 24 時間の前培養を行った。前培養後、培地を除去し、フルオラス溶媒(DFH)に置換した。

その結果、DFH を用いた培養では、DFH に置換 24 時間後、顕著な細胞死が見られた(Figure 11)。そこで、フルオラス溶媒を用いた細胞培養の報告例からパーフルオロデカリン(PFD, Figure 10)を選択し、同様の実験を行った。PFD を用いた結果、24 時間後でも生細胞数の大きな減少は見られなかった(Figure 11)。今回の結果から示唆されたフルオラス溶媒 DFH の毒性は、DFH の細胞膜への影響が原因だと考えている。DFH はフルオラスアルコールであり、疎水性部位(フルオラス鎖)と親水性部位(アルコール基)を有した両親媒性化合物であるため、初代神経細胞の細胞膜(脂質二分子膜)へ作用し、顕著な毒性につながったと考えている。

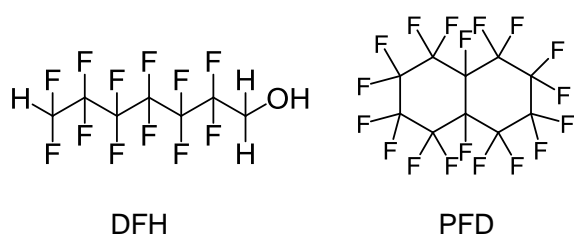


Figure 10. Chemical structure of fluoruous solvents (left; DFH, right; PFD)

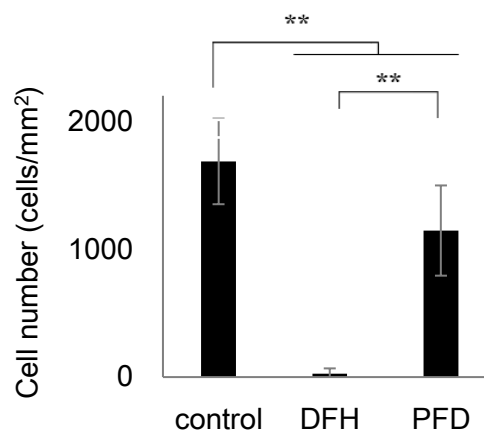


Figure 11. Living cell number of neurons when using the fluoruous solvents after 24-h incubation. One-way ANOVA, **P<0.01.

PFD ゲルの作製

初代神経細胞の培養結果から、パーフルオロデカリン(PFD)を溶媒としたゲルを作製できれば、より低毒性のフルオラスゲルの開発につながることを示唆された。そこで、PFD を溶媒とするフルオラスゲル(PFD ゲル)の作製を目指した。

目的のゲル作製のため、これまでと同様に DDOA ゲル化剤を PFD 中に添加して、ゲル作製を試みた。しかしながら、PFD に対する DDOA の溶解度が極めて低く、目的の PFD ゲルを作製できなかった。これまで用いてきたフルオラス溶媒 (DFH)は、前述のようにアルコール部位を有していたために DDOA がゲル化剤として機能できたと考えられる。しかし、PFD はフルオロカーボンのみからなる無極性のフルオラス溶媒であるため、DDOA は PFD との親和性に乏しく、溶解できないことが課題と考えた。

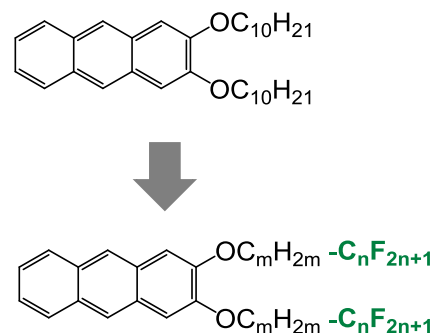


Figure 12. Chemical structures of DDOA gelator and fluoroalkyl-containing compounds.

そこで、PFD への溶解性の向上のための戦略として、DDOA にフルオラス溶媒と親和性を示す部位が必要と考え、これまでのアルキル鎖の末端にフルオロアルキル鎖を導入した新規化合物を設計し、合成した(Figure 12)。様々な $-C_mH_{2m}-C_nF_{2n+1}$ 鎖 (H_mF_n)を導入した化合物を新規ゲル化剤候補化合物として合成した。

フルオロアルキル鎖を導入した化合物は、期待したように PFD へ溶解した。しかしながら、フルオロアルキル鎖を導入したことでゲル化能の変化が示唆された。H10F4($-C_{10}H_{20}-C_4F_9$)鎖を導入した化合物の場合では、DDOA ゲル化剤でこれまで最適な濃度(2 mM-4 mM)ではゲル化が生じなかったが、さらに濃度を上げて 5 mM 以上に調製した際に PFD のゲル化が確認できた。よって、従来の DDOA ゲル化剤にフルオロアルキル鎖を導入することで、より低毒性が期待できるフルオラス溶媒 (PFD)由来のゲル作製を達成することができた。

結言

本研究では細胞培養のための新しい酸素供給材料として、フルオラスゲルの開発に取り組んだ。細胞培養に応用可能なドデカフルオロヘプタノール (DFH)を DDOA ゲル化剤でゲル化し、酸素供給源としての機能を見出した。また、アルキル鎖の短い化合物 DMOA をゲル化剤と混合して用いることで、ゲルの溶解温度を微細にコントロールすることにも成功した。研究を進める中で初代神経細胞の培養結果に基づき、より低毒性なフルオラス溶媒であるパーフルオロデカリン (PFD)のゲル化を目指し、新規ゲル化剤を合成して目的のフルオラスゲルを得た。

ハイドロゲルを用いた細胞培養は盛んに報告されているが、フルオラスゲルを細胞培養に応用する試みは、細胞培養のための新しい材料の開発に貢献する技術となりうる。

参考文献

- [1] (a) Shoji Takeuchi, *et al.*, *Adv. Mater.*, **2011**, 23, 90–94.
(b) Z. Wang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(45), 15027-15034.
- [2] D. R. Grimes, *et al.*, *J. R. Soc. Interface*, **2013**, 1124-1135.
- [3] T. Horváth, J. Rábai, *Science*, **1994**, 266, 72-75.
- [4] K.C.Lowe, *Blood Reviews*, **1999**, 13, 171-184.
- [5] M.C.Z. Kasuya, X. Wen, K. Hatanaka, K. Akashi, *J. Fluor. Chem.*, **2011**, 132, 978-981.
- [6] J.-L. Pozzo, *et al.*, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 6377-6390.
- [7] T. Brotin, *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 34, 416-418.

発表状況

- [1] H. Miyajima, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka., *J. Fluor. Chem.*, **2014**, 163, 46-49.
- [2] H. Miyajima, M. C. Z. Kasuya, A. Del Guerso, J.-M. Vincent, K. Hatanaka., *J. Fluor. Chem.*, **2018**, 205, 30-34.