

特集：バイオマテリアルを基盤とした生命科学研究
(Materials-based biology)

時空間制御バイオマテリアルを用いた細胞力学記憶メカニズムの解明

細胞は動的な細胞外微小環境にさらされており、そこでは生化学的、物理化学的、構造力学的因子が時空間的に変化している。この複雑な微小環境の再現には、動的細胞培養基盤が有用であり、細胞の機能制御や挙動解明の強力なツールとなり得る。本稿では時空間制御可能なバイオマテリアルをベースとした細胞操作技術について概説する。

キーワード：時空間制御バイオマテリアル、動的培養基盤、メカノバイオロジー、四次元バイオロジー、力学場記憶



宇都甲一郎 Koichiro Uto

ワシントン大学 バイオエンジニアリング専攻
<現在>
物質・材料研究機構 若手国際研究センター 国際ナノアーキテクニクス研究拠点
Department of Bioengineering, University of Washington
<Present>
International Center for Young Scientists, International Center for Materials Nanoarchitectonics (ICYS-MANA), National Institute for Materials Science (NIMS)



DeForest, Cole A Cole A. DeForest

ワシントン大学 ケミカルエンジニアリング専攻
Department of Chemical Engineering, University of Washington

1. はじめに

1980年代後半から1990年代におけるLangerやVacantiらにより細胞の再生能力を誘導しながら組織を再生させる組織工学の提唱¹⁾、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞をはじめとする幹細胞の発見により社会的ニーズが年々高まっている組織や臓器の機能再建を実現しうる再生医療^{2, 3)}、そして今や'Eroomの法則(Mooreの法則の逆転現象)'と揶揄され事実上破たんしているといっても過言でもない新薬開発など⁴⁾、どの実用化も依然として難題を抱えている状況である。その理由の一つは、人間の体とは全く異なる力学および生化学的環境かつ静的条件下で細胞が培養されていることに端を発している。その意味で、生体内の動的かつ複雑な環境因子の役割を理解し再現・応用できれば組織工学や再生医療のブレークスルーとなり得ることが期待される。本稿では、動的生体内環境をデザインするにあたり有用なバイオマテリアル基盤技術、これを基に解明されつつある新しい生命科学的知見について概説する。

2. 動的培養基盤技術と時空間制御バイオマテリアル

細胞は非常に複雑な動的環境にさらされており、そこでは細胞機能に影響する様々な因子が時間空間的に作用している(図1)⁵⁾。さらに、発生プロセス、繊維化や癌化などで見ることのできる多くの細胞挙動自体が動的性を伴っている⁶⁻⁹⁾。よって、動的環境変化を提供可能な培養基盤はより高度な人工的細胞操作を実現するために有用であると考えられる。動的培養系といった場合、どのような基盤技術が思い浮かぶだろうか。細胞や組織に対して伸縮刺激を負荷できるストレッチチャンバー、ずり応力や静水圧など与えることができるフローチャンバーなどメカニカル刺激を発生する装置・システムを挙げる人は少なくない¹⁰⁾。現在では、MEMSなどのマイクロ加工技術と細胞生物学を融合させ、細胞外微小環境や三次元組織の構築を目指す研究が隆盛を極めており、中でもチップ上で臓器や生体システムそのものの再現を試みる、Organ-on-a-ChipやHuman-on-a-Chip創製

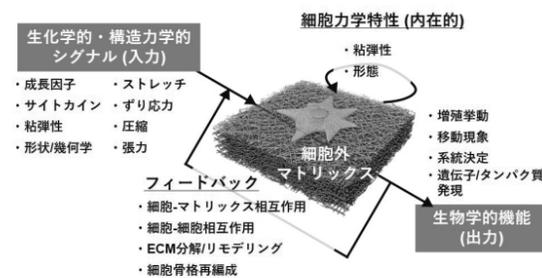


図1 細胞外環境因子(入力)と細胞機能発現(出力)の関係図。入力側のシグナルは動的かつ複雑に変化するものであり、出力までの伝達プロセスにおいてはフィードバック機構を有する。

に関する技術発展には期待が膨らむ¹¹⁻¹⁴⁾。特にLung-on-a-Chipでは、同種細胞だけでなく複数種の細胞を任意配置させ、組織特有のメカニカル刺激を与えることにより、複雑な肺機能の一部をデバイス上で再現することに成功し¹⁵⁾、創薬やドラッグスクリーニング分野における新たな動物実験代替法としてのポテンシャルが示された。

一方、細胞培養の場を構成する材料自身の性質を利用し細胞に対して動的変化を誘導させる、材料工学的なアプローチも存在する^{5, 16)}。生体内における細胞外微小環境を模倣した足場材料・環境を構築できれば組織工学への貢献はもちろん、生体内で見られる多くの細胞現象を生体外で再現できる可能性がある。この動的環境を提供可能な培養基盤材料の開発には、外部刺激に応答し物性を変化させる刺激応答性(またはスマート)材料の利用が有用であることは言うまでもない。特に細胞培養を指向した場合、細胞に対してマイルドな刺激を選択することが望まれ、これまでに熱^{17, 18)}、光^{19, 20)}、pH²¹⁾、酵素²²⁾やDNA²³⁾などの生体分子さらには電場²⁴⁾や磁場²⁵⁾により駆動する材料が開発されその物性変化と動的な細胞挙動の相関性が議論されている⁵⁾。中でも、時空間制御の観点から見ると'光'は細胞に対する非侵襲性も相まって有用な外部刺激であると考えられる。よって本稿では特に、動的細胞操作を可能とする新しい材料基盤として、光操作可能かつ培養次元の拡張性の高いハイドロゲルをベースとした時空間制御バイオマテリアルに焦点を絞り議論したい。

3. 二次元バイオロジーへの応用

三次元網目構造内に多くの水を含むハイドロゲルは、そのデザインの多様性や軟組織の生化学的・力学的物性を模倣しやすいことから、細胞培養の足場材料として関心を集めている。EnglerやDischerらにより足場として用いたアクリルアミドゲル基材の弾性が間葉系幹細胞の分化系統の決定に寄与するとの報告がされて以降²⁶⁾、ハイドロゲル基材の材料物性、特に力学的アプローチにより細胞機能や運命を制御しようという試みが多数報告されるようになった。これも一つのきっかけとなり、本誌(34巻2号)でも特集が組まれるほどメカノバイオロジー研究の分野は急速な発展を遂げている。材料の構造力学物性と細胞応答の相関解析により、力学的パラメーターで多くの細胞挙動を操作できるようになってきたものの、そのほとんどが物性を培養中一定と仮定できる'静的'条件を対象としている。それでは培養中に力学的パラメーターを変化させる'動的'条件下ではどのような細胞応答挙動が示されるのだろうか。

Englerらも用いたハイドロゲル基材に光応答性機能を付与することで力学物性を変化可能な動的培養基盤を構築することができる。例えば光分解性の架橋剤あるいはマクロマーを用いることで、光照射により架橋密度が低下する'光軟化型'培養基盤としての利用が可能となる。Ansethらは光開

裂基としてニトロベンジルエーテル基を有する架橋剤を用いPEGベースの光分解性ハイドロゲルを作製し間質細胞培養における表現型解析を行った^{27, 28)}。弾性率一定の静的培養条件では、光照射の硬領域(32 kPa)で筋線維芽細胞への分化すなわち線維芽細胞の活性化が観察されるのに対し、照射部の軟領域(7 kPa)では線維芽細胞の形質が維持されその活性化は抑制された。実際に、これらの弾性率は損傷弁と正常組織を模倣したのとなっている。それではこの損傷弁と同様の弾性率上で筋線維芽細胞へと分化した細胞に対し、正常組織の弾性率へと戻した場合どのようなことが起こるだろうか。この動的培養条件下においては、細胞骨格の再編成を誘導し脱活性化を起こすことが確認された。すなわち、弾性率低下させた後に筋線維芽細胞に特徴的な α SMAの発現は認められず、筋線維芽細胞の脱活性化を誘導したことになる。ここで、光照射や弾性率変化自体が接着細胞数や細胞生存性に影響を及ぼさないこと、さらにはゲルの分解物や光照射により分化や生存性が変化することがないことを考慮すると筋線維芽細胞の脱活性化は基材の弾性率低下により誘導されたと考えられる。

一方で、発生、創傷治癒や病態の生理学的プロセスなど多くの生体現象はマトリックスの硬化を伴う。よって、弾性硬化を実現できる材料開発はその機構解明に貢献できる技術となり得る。この実現にも、光操作は有用であり、光重合可能なハイドロゲルを設計することで'光硬化型'培養基盤としての応用が可能となる。Burdickらはメタクリル化ヒアルロン酸をマクロマーとして用い、ジチオールとのマイケル付加により架橋構造を導入後、さらに光開始剤を用いたラジカル重合により逐次架橋可能な基材を開発した²⁹⁾。マイケル付加により架橋構造を導入したハイドロゲル上でヒト間葉系幹細胞を培養し、3kPaから30kPaと光照射による弾性硬化に伴う細胞挙動を検討した。その結果、分-時間スケールの短期的プロセスにおいては細胞が接着面積と牽引力を増大させること、より長期的な日-週スケールでは弾性硬化を誘起させるタイミングにより脂肪・骨分化のバランスが変化することが明らかとなった。この結果は、細胞機能や運命は動的変化を誘起させる時間軸によっても操作できる可能性を示唆している。さらに近年では、この光硬化型のゲル基材が組織繊維化プロセスを検討するのに有用なツールとなり得ることも示されている³⁰⁾。

光照射は力学物性の動的制御のみならず、生理活性物質に由来する生化学因子のON-OFF制御にも有用である。Garciaらのグループは、光照射によりRGDペプチドを提示可能なハイドロゲルの作製に成功している³¹⁾。光開裂性のニトロベンジル誘導体で保護されたRGDを修飾したハイドロゲルを作製した場合、ハイドロゲル表面上の細胞接着性をUV照射によりON-OFF制御可能となる。さらにこのハイドロゲルをマウス皮下に埋入させ、経皮的UV照射を行うことでin vivoでの細胞接着挙動の動的制御にも成功している。この系において埋入後の光照射のタイミングにより慢性炎症や繊維化

被膜の形成を抑えることができることは時空間制御バイオマテリアルの重要な利点である。

このように、ハイドロゲルと細胞との相互作用の場を二次元に規定した二次元バイオロジー系であっても時間的な概念を付加することで、複雑な細胞・生体挙動の動的操作が可能となり、病態解明やその治療法の開発に貢献できる新たなバイオマテリアルとしての利用が期待される。

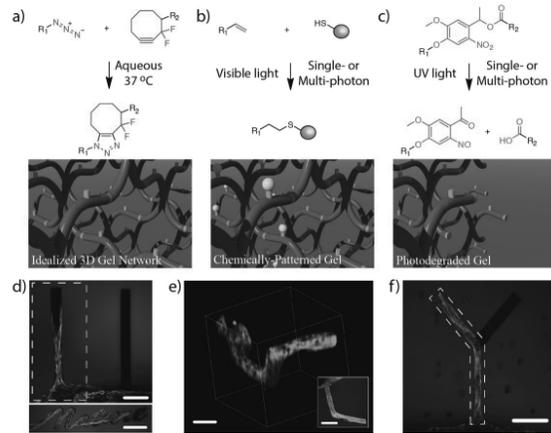


図2 光と生体直交型修飾を介したハイドロゲル三次元環境の二重調節。(a)ハイドロゲル形成に用いたSPAAC反応。b)生化学リガンドの空間パターン可能な光媒介チオール-エン反応。c)ネットワーク構造崩壊に用いたニトロベンジルエーテルの光開裂反応。d-f)三次元細胞移動制御。物理的因子(スペース)と生化学因子(RGD)により三次元空間での細胞移動をガイド可能。

4. 三次元から四次元バイオロジーへの展開

光応答や操作技術の利用は、何も二次元培養系を対象とした材料表面の物性変化のみを誘発することに限らない。現在では基礎化学技術の著しい発展により、クリックケミストリーに代表されるような細胞存在下や生体内にも適用可能な生体直交型の有機反応が多く存在する。これらの有機反応と光操作を上手く組み合わせることで、細胞適合的条件下でのハイドロゲル内への細胞封入、さらに封入した細胞周囲の三次元空間の機能化が可能となり、三次元培養系を時間的に制御可能な四次元培養系として展開できる。

Westらは、PEGジアクリレートをベースとした光機能化可能なハイドロゲルを用い、通常の一光子吸収に加え、二光子吸収を利用したRGDSの三次元パターンングを報告している³²⁾。これは三次元培養の場を提供するハイドロゲル内部機能化の空間制御を実現したものであり、より複雑な三次元培養系を構築するためのデザインアプローチに加え、高解像度で三次元パターンング可能な二光子レーザー顕微鏡を用いたリソグラフィ法の有用性を示すものであった。ただしこの系においては、RGDSの三次元パターンングを行った後に、ハイドロゲル上に細胞を播種する形となっている。一方、この光を用いた三次元パターンング技術は細胞封入したハイドロゲルの空間機能化にも有用である^{33, 34)}。これらの

系においては、ハイドロゲルのネットワーク形成にアジド基と高い歪みを有する環状アルキン間で起こる銅触媒を必要としないクリックケミストリー(図2a)を利用している。例えば、両端にジフルオロシクロオクテン基を有し、光機能化部位と酵素分解性ユニットを含んだペプチド架橋剤をデザインし、末端アジド化した四分岐PEGと混合すると逐次的クリックケミストリーによりハイドロゲルが形成され、細胞懸濁液へと適用することで直接的細胞封入が可能である。さらに光媒介マイケル付加(図2b)などの生体直交型反応の利用により、ハイドロゲル内に細胞を封入したままRGDSなど生化学因子を任意の場所に修飾でき、これにより伸展または非伸展状態にある線維芽細胞集団の空間パターンングに成功している³³⁾。同様な機能性架橋剤にさらに光開裂分子(図2c)を組み込むことにより生化学因子の空間パターンング能に加え、ネットワーク構造の崩壊による物理的空間の創出が可能となる³⁴⁾。ゲル内に封入した線維芽細胞に対してRGD機能化有り無しの物理空間を作成したところ、RGD機能化空間への優先的細胞移動が確認され、三次元空間における細胞移動には生化学因子と物理的因子の両方が重要であることを明らかにした(図2d-f)。

一方、光媒介生体直交型反応を駆逐することで生化学因子の可逆的三次元パターンングが可能となる³⁵⁾。実際には、逐次的クリックケミストリーにより細胞を封入させ、かつ光開裂性基(NPPOC)で保護したアルコキシアミンを含むハイドロゲルを作製する。UV光照射によるNPPOCの脱保護後により提示されるアルコキシアミン基と機能化したいタンパク質に導入したアルデヒド基間のoxime ligationにより、タンパク質を

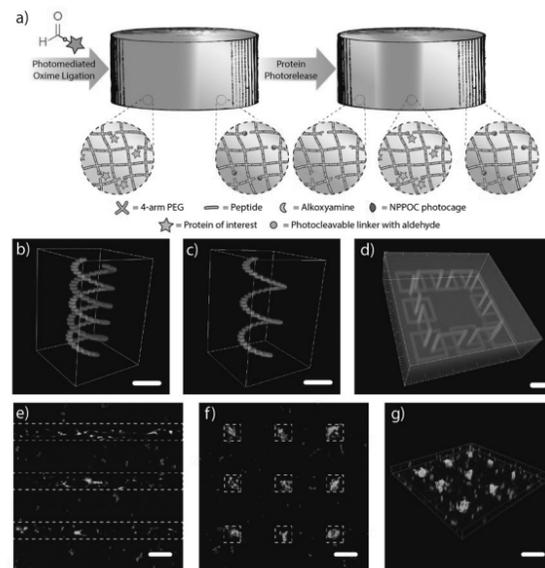


図3 可逆的生化学因子のパターンングによる幹細胞運命の四次元制御。a)光媒介oxime ligationと光開裂を用いた可逆的タンパク質パターンングの概念図。b)ハイドロゲル三次元空間での二重螺旋様パターンング。c)光照射によるパターン化物の選択的除去。d)二種タンパク質の三次元パターンング。e-g)ヒト間葉系細胞分化の時間・空間制御。

三次元ネットワーク内に化学的に固定化できる。また、アルデヒド基含有タンパク質に光開裂性分子を予め組み込むことにより、化学的に固定化されたタンパク質をUV照射により再度取り除くことが可能となり、それにより生化学因子の可逆的機能化とパターンングが実現できる(図3a)。実際に、二光子レーザー顕微鏡を用いることでハイドロゲル内での三次元機能化パターンングが精度よく行われ、化学的に固定化された機能性物質は光照射により選択的除去が可能であった(図3b-d)。これを間葉系幹細胞の三次元培養系へと展開したところ、その分化挙動を時間・空間的に制御できることが示された(図3e-g)。ここではヒトロネクチンの可逆的機能化により細胞の伸展状態を制御しており、ヒトロネクチン機能化部位でのみ骨分化が誘導されることが分かり、その分化挙動も可逆的に制御可能であった。この結果は、生化学因子の可逆的機能化とそのパターンングにより間葉系幹細胞の分化を時間・空間的に制御できたことを示すもので、幹細胞運命の四次元制御に成功した最初の報告である。

これらの結果より、非常に複雑な三次元環境の創出および細胞周囲の力学および生化学的三次元環境の時空間制御が材料主導で可能となってきたのは明らかである。このような材料は、より生体内の組織や臓器環境に近い三次元培養系を時空間操作可能にするため四次元培養系とも呼べる新しい培養基盤技術としてさらなる発展が期待される。

5. 細胞挙動制御から新しい生命現象の探求：力学場記憶

細胞培養基盤としての時空間制御バイオマテリアルの利用は、前述のような細胞挙動の制御に着目した研究のみならず、新しい生命現象の解明のための強力なツールとなり得る。その一例として興味深いのは、過去の培養力学的環境が細胞運命決定に影響を及ぼすという、細胞の‘力学場記憶(mechanical memory)’現象である(図4上)。この力学場記憶現象は、肺線維化に関連する線維芽細胞の活性化や筋線維芽細胞への分化に関する研究において発見され、継代も含む一連の培養プロセスにおいて細胞がどのような力学的環境を経験したかによって挙動が異なるというものであった³⁶⁾。しかし、培養の力学環境を変化させる際にはトリプシン処理を行い、一度細胞を回収した後に新たな環境へと移す必要があり、力学的因子以外のファクターの影響などを考慮する必要があった。

先にも述べた光軟化・硬化型培養基材は、細胞に対して同一基材上で任意のタイミングにより弾性率変化を誘起できるため力学場記憶現象の証明に有力なツールとなる。Ansethらは光軟化型培養基材を用いたヒト間葉系幹細胞の培養実験により、幹細胞の力学場記憶の有無について検証した³⁷⁾。骨分化に優位な硬いゲル(~10kPa)上で培養した後に、異なるタイミングで脂肪分化に優位な柔らかいゲル(~

2kPa)へと弾性率を低下させ、その際の分化挙動を検討した。その結果、幹細胞分化は弾性変化を誘起するタイミングに強く影響を受け、硬い基材上での培養期間が長くなるにつれ骨分化への不可逆的な分化偏向が促進されることを明らかとした(図4下)。トリプシン処理を用いた系でも同様な結果は確認できるが、材料主導のシンプルな実験系にしたことで、力学的因子以外のファクターを除外した条件において幹細胞が力学場記憶能を有することが証明された。以前、Blauらにより報告された、骨格筋幹細胞が筋肉と同じ弾性率を有する基材上で培養された時に高い自己複製能を示すという結果は現在のメカノバイオロジーの概念では当然のように思われる³⁸⁾。この系で、基材上から回収した細胞を用いてのin vivo実験においても自己複製能が基材弾性に依存したという事実は興味深い。少し強引であることを承知の上で、これを細胞がin vitro(移植前)での力学場環境をin vivo(移植後)でも記憶しており、それにより細胞挙動の制御がなされたと考えれば、力学場記憶は幹細胞の品質保持や系統決定、組織工学・再生医療の実用化などに直結する重要な細胞現象と言えるだろう。

過去を遡ってみてもこの力学場記憶現象を強く支持する結果は他にも多く存在するように思える。しかし、冒頭でも述べた通り、細胞機能・運命は弾性率などの力学的因子のみで決定されるものではない。よって、生化学的因子など他のパラメーターが力学場記憶にどのように影響するか、また細胞が他因子に対する記憶能を有するか否かは依然として不明である。この細胞の新しい記憶現象の探索やその機構解明に関する研究は、AMED-PRIMEの支援を受けて現在遂行中であり、時空間概念に立脚した新しいバイオマテリアルの開発により材料主導でのバイオロジー研究を展開していきたい。

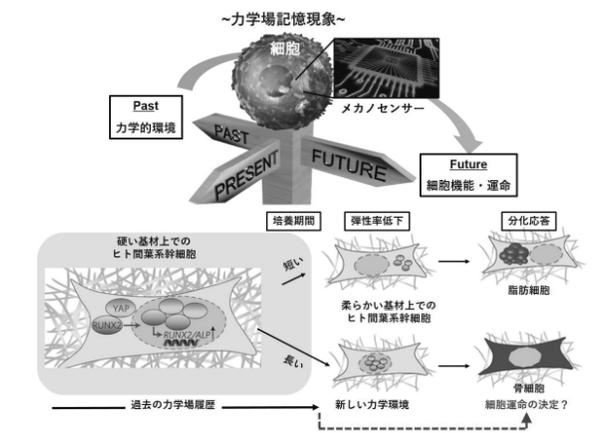


図4 細胞が有する力学場記憶の概念図。細胞は自身が経験した力学的培養環境を記憶しているかのような挙動を示す。実際に、ヒト間葉系幹細胞を硬い基材上で長期間培養すると、骨への不可逆的な分化偏向が誘導される。

6. おわりに

本稿では、時空間制御バイオマテリアルについて、動的細胞培養基盤としての観点から、その研究例を簡単に紹介した。時空間制御バイオマテリアルを細胞培養へと利用することで、細胞機能や運命の動的制御や環境変化に伴う細胞挙動の*in vitro*での観察が可能となる。よって、細胞周囲の構造力学および生化学的要因による機能制御や運命決定における役割のみならず、生体内における動的環境変化が及ぼす影響を解明できることが見込まれる。一方、複雑な三次元微小環境構築のための材料基盤技術の発展は著しいが、その模倣可能な生体内プロセスはまだほんの一部である。よって時空間制御バイオマテリアルの開発は今後さらに重要となり、メカノバイオロジー研究の更なる発展や未だに十分な解明が進んでいない生物学および医学的課題の解決に貢献できる革新的技術となることを期待したい。

参考文献

- 1) Langer R, Vacanti J: Tissue engineering. *Science* 1993, 260: 920-926.
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, et al.: Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 1998, 282: 1145-1147.
- 3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131: 861-872.
- 4) Scannell JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B: Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11: 191-200.
- 5) Uto K, Tsui JH, DeForest CA, Kim D-H: Dynamically tunable cell culture platforms for tissue engineering and mechanobiology. *Progress in Polymer Science*.
- 6) Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P: Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2014, 1840: 2506-2519.
- 7) Lu P, Weaver VM, Werb Z: The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology* 2012, 196: 395-406.
- 8) Wang H, Leinwand LA, Anseth KS: Cardiac valve cells and their microenvironment[mdash]insights from *in vitro* studies. *Nat. Rev. Cardiol.* 2014, 11: 715-727.
- 9) Tibbitt MW, Anseth KS: Dynamic Microenvironments: The Fourth Dimension. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4: 160ps124.
- 10) Steward RL, Cheng C-M, Ye JD, Bellin RM, LeDuc PR: Mechanical stretch and shear flow induced reorganization and recruitment of fibronectin in fibroblasts. *Sci. Rep.* 2011, 1: 147.
- 11) Bhatia SN, Ingber DE: Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotech* 2014, 32: 760-772.
- 12) Huh D, Hamilton GA, Ingber DE: From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011, 21: 745-754.
- 13) Torisawa Y, Spina CS, Mammoto T, Mammoto A, Weaver JC, et al.: Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology *in vitro*. *Nat Meth* 2014, 11: 663-669.
- 14) Huh D, Kim HJ, Fraser JP, Shea DE, Khan M, et al.: Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat. Protocols* 2013, 8: 2135-2157.
- 15) Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, et al.: Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science* 2010, 328: 1662-1668.
- 16) Kim J, Hayward RC: Mimicking dynamic *in vivo* environments with stimuli-responsive materials for cell culture. *Trends Biotechnol.* 2012, 30: 426-439.
- 17) Yamato M, Akiyama Y, Kobayashi J, Yang J, Kikuchi A, et al.: Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. *Progress in Polymer Science* 2007, 32: 1123-1133.
- 18) Mengsteab PY, Uto K, Smith AST, Frankel S, Fisher E, et al.: Spatiotemporal control of cardiac anisotropy using dynamic nanopopographic cues. *Biomaterials* 2016, 86: 1-10.
- 19) Rolli CG, Nakayama H, Yamaguchi K, Spatz JP, Kemkemer R, et al.: Switchable adhesive substrates: Revealing geometry dependence in collective cell behavior. *Biomaterials* 2012, 33: 2409-2418.
- 20) Shimizu Y, Boehm H, Yamaguchi K, Spatz JP, Nakanishi J: A Photoactivatable Nanopatterned Substrate for Analyzing Collective Cell Migration with Precisely Tuned Cell-Extracellular Matrix Ligand Interactions. *PLoS One* 2014, 9: e91875.
- 21) Yoshikawa HY, Rossetti FF, Kaufmann S, Kaindl T, Madsen J, et al.: Quantitative Evaluation of Mechanosensing of Cells on Dynamically Tunable Hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133: 1367-1374.
- 22) Khetan S, Guvendiren M, Legant WR, Cohen DM, Chen CS, et al.: Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nat Mater* 2013, 12: 458-465.
- 23) Jiang FX, Yurke B, Schloss RS, Firestein BL, Langrana NA: The relationship between fibroblast growth and the dynamic stiffnesses of a DNA crosslinked hydrogel. *Biomaterials* 2010, 31: 1199-1212.
- 24) Lamb BM, Yousaf MN: Redox-Switchable Surface for Controlling Peptide Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133: 8870-8873.
- 25) Sniadecki NJ, Anguelouch A, Yang MT, Lamb CM, Liu Z, et al.: Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104: 14553-14558.
- 26) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006, 126: 677-689.
- 27) Kloxin AM, Benton JA, Anseth KS: *In situ* elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype. *Biomaterials* 2010, 31: 1-8.
- 28) Wang H, Haeger SM, Kloxin AM, Leinwand LA, Anseth KS: Redirecting Valvular Myofibroblasts into Dormant Fibroblasts through Light-mediated Reduction in Substrate Modulus. *PLoS One* 2012, 7: e39969.
- 29) Guvendiren M, Burdick JA: Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics. *Nat Commun* 2012, 3: 792.
- 30) Caliarì SR, Perepelyuk M, Cosgrove BD, Tsai SJ, Lee GY, et

- al.: Stiffening hydrogels for investigating the dynamics of hepatic stellate cell mechanotransduction during myofibroblast activation. *Sci. Rep.* 2016, 6: 21387.
- 31) Lee TT, Garcia JR, Paez JI, Singh A, Phelps EA, et al.: Light-triggered *in vivo* activation of adhesive peptides regulates cell adhesion, inflammation and vascularization of biomaterials. *Nat Mater* 2015, 14: 352-360.
- 32) Hahn MS, Miller JS, West JL: Three-Dimensional Biochemical and Biomechanical Patterning of Hydrogels for Guiding Cell Behavior. *Advanced Materials* 2006, 18: 2679-2684.
- 33) DeForest CA, Polizzotti BD, Anseth KS: Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments. *Nat Mater* 2009, 8: 659-664.
- 34) DeForest CA, Anseth KS: Cytocompatible click-based hydrogels with dynamically tunable properties through orthogonal

- photoconjugation and photocleavage reactions. *Nat. Chem.* 2011, 3: 925-931.
- 35) DeForest CA, Tirrell DA: A photoreversible protein-patterning approach for guiding stem cell fate in three-dimensional gels. *Nat Mater* 2015, 14: 523-531.
- 36) Balestrini JL, Chaudhry S, Sarrazy V, Koehler A, Hinz B: The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integrative Biology* 2012, 4: 410-421.
- 37) Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS: Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater* 2014, 13: 645-652.
- 38) Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KEG, Sacco A, Leonard NA, et al.: Substrate Elasticity Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Self-Renewal in Culture. *Science* 2010, 329: 1078-1081.