

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05570

研究課題名(和文) 新規ハイブリッド型足場材料を用いた間葉系幹細胞の分化制御

研究課題名(英文) Control of Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Using Novel Hybrid Scaffolds

研究代表者

飯島 一智 (Iijima, Kazutoshi)

東京理科大学・工学部工業化学科・助教

研究者番号：30468508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質吸着層を介して擬似体液中にてポリスチレン(PS)をヒドロキシアパタイト(HAp)により被覆する手法を確立し、複雑な構造体への適用および種々のタンパク質の利用が可能となった。HAp被覆PS上では細胞培養用PSと比較して間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が促進され、脂肪細胞や軟骨細胞への分化が抑制された。一方、熱プレス法により作製される多糖複合フィルムでは用いるアニオン性多糖の種類により細胞の接着、増殖挙動に差異が生じ、その要因として力学物性の影響と構成糖と細胞受容体との相互作用を介したシグナル伝達が考えられた。アニオン性多糖の種類による間葉系幹細胞の分化制御の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The method to coat polystyrene (PS) with hydroxyapatite (HAp) in a simulated body fluid via a protein adsorption layer has been developed. This method can apply to coat the subjects with complex structures and various kinds of proteins were used as protein adsorption layers. The differentiation from mesenchymal stem cells to osteoblasts was promoted on HAp-coated PS compared to PS for cell culture, and differentiation into adipocytes and chondrocytes were suppressed. In the polysaccharide composite films prepared by utilizing the hot press method, adhesion and proliferation of cells depended on the type of anionic polysaccharides of the films. The influence of mechanical physical properties and signals derived from interaction between sugar of polysaccharide and cell receptor was suggested. The possibility of control of differentiation of mesenchymal stem cells depending on the type of anionic polysaccharide was expected.

研究分野：生体機能材料

キーワード：間葉系幹細胞 複合材料 多糖 ヒドロキシアパタイト 分化 再生医療

1. 研究開始当初の背景

多分化能と自己複製能を併せもつ幹細胞は再生医療や基礎医学研究の分野での応用が期待されている。これらの技術が臨床、あるいは基礎医学研究ツールとして汎用されるためには、「多分化能と自己複製能を維持しつつ大量に培養する技術」と「特定の細胞に高効率に分化・増殖させる技術」の開発が不可欠である。中でも間葉系幹細胞 (hMSC) は胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞と比較すると多分化能では劣るものの、骨、脂肪、軟骨など多様な細胞への分化能を有し、患者本人の骨髄液等から採取可能であることから臨床応用に向けた研究が盛んに行なわれている。hMSC は比較的簡便に *in vitro* において培養が可能であるが、継代に伴って増殖能、分化能が低下することが知られている。また、hMSC を特定の細胞へ分化誘導する方法としては (i) 培地中への液性因子の添加、(ii) フィーダー細胞との共培養、(iii) 特異な細胞足場上での培養、そしてこれらを組み合わせた手法が開発されている。

申請者らは (i) 多糖複合フィルムと (ii) 骨類似アパタイト被覆ポリスチレン (PS) という2種のハイブリッド型細胞足場を開発し、それぞれの特徴的な細胞活性を明らかにしてきた。(i) 多糖複合フィルムはコンドロイチン硫酸 C (CS) などのアニオン性多糖とキトサン (CHI) の二種の水溶性多糖の溶液を混合して得られるポリイオンコンプレックスゲルを凍結乾燥により水分を除去し、熱プレスすることで架橋剤や化学修飾なしに得ることができる透明のフィルムである。CS 以外に種々のアニオン性多糖を用いても作製することができる。一方、(ii) 骨類似アパタイト被覆 PS は、ヒト血しょうの無機イオン組成を模倣した溶液である擬似体液 (SBF) を用いてバイオミネラリゼーションを模倣したプロセスにより作られる。PS 基板上にヒト血清アルブミン (HSA) の吸着層を形成し、塩化カルシウム水溶液で処理した後、SBF の 1.5 倍濃度の溶液 (1.5SBF) に浸漬させることで、PS プレートの表面全面を骨の主な無機成分であるヒドロキシアパタイト (HAp) で被覆することができる。本手法で得られる HAp は Ca^{2+} の一部が Mg^{2+} などに置換された、いわゆる骨類似アパタイトであり、焼結法などにより作製されたものよりも高い生体活性、生体適合性、吸収性が期待され、特別な装置や試薬を必要とせずクリーンベンチ内で簡便に作製できることから、骨関連細胞の解析に有用と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では (i) 多糖複合フィルムと (ii) 骨類似アパタイト被覆 PS という二種類の新規ハイブリッド型細胞足場の hMSC の培養・分化誘導への応用を目指し、基材上での hMSC の接着・増殖挙動と各細胞系列への分化特性を明らかにするとともに、得られた知見を材

料作製へフィードバックし、hMSC の分化能を制御可能な材料を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HAp 被覆 PS プレートの作製と hMSC の分化特性の解析

PS 製 24 ウェルプレートの各ウェルに HSA 溶液を加え、3 h 静置後に洗浄し、これを HSA 吸着 PS プレートとした。HSA 吸着 PS プレートへ 100 mM 塩化カルシウム溶液と 100 mM リン酸水素二カリウム溶液を交互に添加・洗浄する操作を2回繰り返した後、SBF を添加し、36.5°C の恒温槽内でインキュベートした。24 h 後、超純水で洗浄、乾燥することで HAp 被覆 PS プレートを得た。得られたプレートは走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分光 (EDX)、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR)、および X 線回折 (XRD) により評価した。

HSA 以外のタンパク質を吸着層として利用する場合には各タンパク質の PBS 溶液を用い、吸着層の形成以降は HSA と同様の手順で行った。組織培養用 PS (TCPS) を用いる場合には交互浸漬処理以降の操作のみ行った。

HAp 被覆 PS プレートは UV 照射によって滅菌した後、細胞実験に用いた。各ウェルにヒト骨髄由来 MSC を播種し、所定時間培養後、クリスタルバイオレット染色により細胞の形態を観察するとともに、Hoechst33258 を用いた DNA 定量により細胞数を測定した。さらに市販の骨、脂肪、軟骨の各系統への分化誘導培地で所定期間培養することで分化誘導を行った。対照として骨、脂肪への分化については細胞培養用 PS (TCPS) プレート、軟骨への分化については PS 製 96 ウェル U 底プレートをそれぞれ用いた。細胞より Total RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を合成した後、リアルタイム PCR を用いて $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により各系列の分化マーカー遺伝子の発現量を定量するとともに、骨分化をアルカリホスファターゼ (ALP) 染色、脂肪分化をオイルレッド O 染色により評価した。

(2) 多糖複合フィルムの作製と物性評価

フィルムの作製にはサメ軟骨由来 CS、乳酸球菌由来ヒアルロン酸 (HYA)、ブタ腸粘膜由来ヘパリン (HEP)、褐藻由来アルギン酸 (ALG) およびカニ殻由来 CHI を用いた。アニオン性多糖溶液と CHI 溶液を混合することで得られる PIC ゲルを遠心分離および凍結乾燥により単離し、スペーサーを用いて熱プレスすることでおよそ 100 μm 厚のフィルムへと成型した。得られた多糖複合フィルムは走査型電子顕微鏡観察、ゼータ電位測定、粘弾性測定、膨潤度測定により評価を行った。

マウス胎仔由来線維芽細胞株 NIH3T3 およびヒト肺基底上皮腺癌細胞株 A549 を用いて多糖複合フィルム上での細胞培養を行った。フィルムを 96 well プレートに収まる大

きさに裁断し、UV 照射 (254 nm, 9 W) により滅菌後、培地 (10%ウシ胎児血清含有 D-MEM) に 1 時間浸漬し、膨潤させてから用いた。所定数の細胞を播種し、6, 24, 48 h 培養した。接着性評価では、ホルマリン溶液による細胞の固定、ヘマトキシリン溶液による核染色後、光学顕微鏡を用いて細胞の形態観察及び細胞数計測を行った。細胞増殖性は WST-8 アッセイにより評価した。

CS/CHI フィルムへのフィブロネクチン (FN) の吸着は乾燥状態のフィルムを FN の PBS 溶液中に浸漬・膨潤させることで行った。CS/CHI フィルムに吸着した FN 量は ELISA 法により定量した。

4. 研究成果

(1) HAp 被覆 PS プレート

まずヒドロキシアパタイト (HAp) 被覆ポリスチレン (PS) プレートの作製手法の改良を行った。従来は PS プレートに対してタンパクとして HSA を吸着させ、塩化カルシウム水溶液で 24 時間前処理した後に 1.5 倍濃度の擬似体液 (1.5 SBF) に 24 時間浸漬させることで HAp 層を析出させていたが、前処理を塩化カルシウム溶液とリン酸二水素ナトリウム溶液を用いた交互浸漬にすることで、およそ半分の時間、かつ少量の SBF で作製する手法を確立した。次に、得られた HAp 被覆 PS プレートを用いて hMSC の培養を行い、接着・増殖挙動を評価した。その結果、HAp 被覆 PS プレート上に hMSC は接着・伸展し、接着細胞数は TCPS プレートとほぼ同程度であった。さらに HAp 被覆 PS プレート上の hMSC は TCPS と同様の増殖挙動を示した。足場上に播種した hMSC を各細胞系列への分化誘導因子を含む培地で所定期間培養し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化について解析したところ、TCPS と比較して HAp 被覆 PS プレート上では骨芽細胞への分化が促進され、脂肪細胞や軟骨細胞への分化が抑制されていることがわかった。

溶液ベースの本手法では多孔質など複雑な形状の材料表面に対しても HAp による被覆を行えると考えられる。そこで、市販の多孔質 PS 細胞足場材料の HAp による被覆を試みた。タンパク吸着、交互浸漬処理、SBF 処理条件を最適化することで、多孔質構造を保持したまま骨類似 HAp により均一に被覆することができた。HAp により被覆した多孔質 PS 足場に hMSC を播種、培養すると、材料内部まで細胞が進展している様子が観察された。未処理の多孔質 PS 材料での培養と比較して細胞周囲により多く線維状細胞外マトリックスが存在しており、HAp 被覆多孔質材料中での培養により細胞の活性化が示唆された。

次にタンパク吸着層の影響について検討した。タンパク吸着層として従来用いていたヒト血清アルブミン (HSA) 以外にも I 型コラーゲンやリゾチーム、酸性タンパク質アナログとしてポリグルタミン酸を用いた場合に

も HAp 析出が誘起された。タンパク吸着層からの生理活性分子の徐放などへの利用も考えられた。

より簡便な HAp 複合法として接着細胞培養用 PS プレートの被覆法についても検討した。また、HAp 中へのタンパク質担持方法についても検討し、アパタイト層への分化誘導因子の担持による hMSC の分化の制御のために必要な知見を得た。

(2) 多糖複合フィルム

多糖複合フィルムについては、CHI とアニオン性多糖として CS に加えて HYA、HEP、ALG からなるフィルムを作製し、物性評価を行うとともに、マウス胎児線維芽細胞の接着挙動の解析を行った。キトサンと組み合わせるアニオン性多糖の種類によって細胞接着性および増殖性が大きく異なることが明らかになった。そこで構成アニオン性多糖の種類による線維芽細胞の接着、増殖性の違いについて、ELISA 法を用いた FN 吸着量の定量やレオメーターを用いた貯蔵弾性率の測定を行うことでそのメカニズムの解明を目指した。結果、アニオン性多糖の種類によって貯蔵弾性率が大きく異なっており、多糖の化学構造に基づいた細胞-多糖間の相互作用に加えてフィルムの機械的特性の細胞接着への関与も示唆された。

次に hMSC においても高発現し HYA や CS と相互作用することが知られている CD44 に注目し、CD44 の発現の異なる細胞間での接着、増殖挙動の比較を行った。CD44 高発現細胞として A549 細胞、低発現細胞として NIH3T3 細胞を用いた。結果、CD44 の発現は細胞接着性に影響せず、主に増殖性に影響した。以上より、細胞の接着には主にフィルムの力学的特性が関与し、接着細胞に対して受容体介在増殖シグナルが誘導されていることが推測された。

以上の知見をもとに、各種フィルム上において hMSC からの骨・軟骨分化誘導を行なったが、長期培養による細胞の回収率の低下が課題であった。

(3) まとめ

本研究では (i) 多糖複合フィルムと (ii) 骨類似アパタイト被覆 PS という二種類の新規ハイブリッド型細胞足場の hMSC の培養・分化誘導への応用を目指した。骨類似アパタイト被覆 PS 上において hMSC の骨分化が促進されることがわかった。骨類似アパタイト被覆 PS においては吸着層として利用する種々のタンパク質の活性、多糖複合フィルムでは用いるアニオン多糖の種類による hMSC の分化制御の可能性も示唆され、両ハイブリッド足場材料の hMSC 培養足場としての有効性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kazutoshi Iijima, Mineo Hashizume, Utilization of proteins and peptides to create organic-hydroxyapatite hybrids, *Protein & Pep. Lett.*, 査読有, Vol.25, 2018, 25-33 DOI 10.2174/0929866525666171221115033
- ② Kazutoshi Iijima, Ayako Iizuka, Ryo Suzuki, Hitomi Ueno-Yokohata, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Effect of protein adsorption layers and solution treatments on hydroxyapatite deposition on polystyrene plate surfaces in simulated body fluids, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 査読有, Vol.28, 2017, 193 (10 pages) DOI 10.1007/s10856-017-6003-7
- ③ Kazutoshi Iijima, Yuna Tsuji, Izumi Kuriki, Atsushi Kakimoto, Yuichi Nikaido, Rie Ninomiya, Takuya Iyoda, Fumio Fukai, Mineo Hashizume, Control of cell adhesion and proliferation utilizing polysaccharide composite film scaffolds, *Colloids Surf. B*, 査読有, Vol.160, 2017, 228-237 DOI 10.1016/j.colsurfb.2017.09.025
- ④ Kazutoshi Iijima, Ryo Suzuki, Ayako Iizuka, Hitomi Ueno-Yokohata, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Surface functionalization of tissue culture polystyrene plates with hydroxyapatite under body fluid conditions and its effect on differentiation behaviors of mesenchymal stem cells, *Colloids Surf. B*, 査読有, Vol.147, 2016, 351-359 DOI 10.1016/j.colsurfb.2016.08.020. 2016

[学会発表] (計 26 件)

うち招待講演

- ① Kazutoshi Iijima, Mineo Hashizume, Creation of Polymer-Hydroxyapatite Hybrids by Utilizing Proteins and Peptides, International Conference on Functional Nanomaterials and Nanotechnology (ICFNN-2017), 2017年10月11日, ホテル ヤク&イエティ (ネパール・カトマンズ)
- ② Kazutoshi Iijima, Ayako Iizuka, Ryo Suzuki, Hitomi Ueno-Yokohata, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Simple and Rapid Surface Functionalization of Tissue Culture-treated Polystyrene Plates with Hydroxyapatite, 第26回日本MRS

年次大会, 2016年12月19日, 横浜市開港記念会館他 (神奈川県横浜市)

- ③ Kazutoshi Iijima, Ryo Suzuki, Ayako Iizuka, Hitomi Ueno, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Surface Functionalization of Tissue Culture Polystyrene Plates with Hydroxyapatite under Body Fluid Conditions and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Thereon, 第25回日本MRS年次大会, 2015年12月10日, 横浜開港記念会館 他(神奈川県横浜市)

うち国際会議

- ① Kazutoshi Iijima, Izumi Kuriki, Yuna Tsuji, Rie Ninomiya, Takuya Iyoda, Fumio Fukai, Mineo Hashizume, Effect of Anionic Polysaccharides of Polysaccharide Composite Films on Adhesion and Proliferation of Cells, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 2016年12月15日, 福岡国際会議場 (福岡県博多市)
- ② Kazutoshi Iijima, Ryo Suzuki, Ayako Iizuka, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Surface Functionalization of Polymer Substrates with Hydroxyapatite, 13th International Conference on Ceramic Processing Science (ICCP-13), 2016年5月9日, 東大寺文化センター (奈良県奈良市)
- ③ Kazutoshi Iijima, Ryo Suzuki, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Surface Functionalization of Polystyrene Cell Culture Plate with Biomimetic Apatite for Preparation of Artificial Bone Marrow Niches, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), 2015年12月20日, ハワイコンベンションセンター 他(米国・ハワイ州ホノルル)
- ④ Ryo Suzuki, Kazutoshi Iijima, Nobutaka Kiyokawa, Mineo Hashizume, Preparation of Hydroxyapatite-Coated PS Plates and Culture of Human Mesenchymal Stem Cell, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), 2015年12月18日, ハワイコンベンションセンター 他(米国・ハワイ州ホノルル)

[図書] (計 1 件)

- ① 橋詰峰雄, 飯島一智, 手術用シーラント材・癒着防止材の利便性向上を目指した製品開発, 技術情報協会, 26-30

[産業財産権]

なし

〔その他〕

報道

(1) 2016年10月30日TBS「未来の起源」 研究成果紹介

(2) 日経産業新聞2016年9月13日朝刊「細胞移植を効率よく～2種類のフィルム、休眠・増殖切り替え容易～」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 一智 (IIJIMA, Kazutoshi)
東京理科大学・工学部工業化学科・助教
研究者番号：30468508

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

橋詰 峰雄 (HASHIZUME, Mineo)
東京理科大学・工学部工業化学科・教授
研究者番号：40333330

清河 信敬 (KIYOKAWA, Nobutaka)
国立成育医療研究センター研究所小児血液・腫瘍研究部・部長
研究者番号：60195401

(4) 研究協力者

小丸 香奈恵 (KOMARU, Kanae)
東京理科大学大学院・総合化学研究科・大学院修士2年 (平成27年度まで)
研究者番号：なし

鈴木 稜 (SUZUKI, Ryo)
東京理科大学大学院・総合化学研究科・大学院修士2年 (平成28年度まで)
研究者番号：なし

栗城 和泉 (KURIKI, Izumi)
東京理科大学大学院・総合化学研究科・大学院修士2年 (平成29年度まで)
研究者番号：なし

飯塚 綾子 (IIZUKA, Ayako)
東京理科大学・工学部工業化学科・学部4年 (平成27年度まで)
研究者番号：なし