

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06591

研究課題名(和文)オリゴペプチド固定化基板上におけるES細胞並びにiPS細胞の培養と分化

研究課題名(英文) Culture and differentiation of ES and iPS cells on oligopeptide-immobilized substrates

研究代表者

樋口 亜紺 (HIGUCHI, AKON)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・客員研究員

研究者番号：30189766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非動物由来の材料で、ヒトES細胞並びにiPS細胞培養用基板を開発することは、再生医療分野で必須である。本研究は様々な架橋度(剛性/弾性)を有するハイドロゲル上にナノセグメント(細胞接着因子ペプチド)固定化基板上でES細胞並びにiPS細胞を非動物由来培地中で培養した。25.3kPaの弾性率を有するハイドロゲルは、iPS細胞並びにES細胞を長期間培養することに成功した。特に、ジョイントセグメント並びに2本鎖を有するナノセグメントを固定化したゲルは、ヒトES細胞の培養に優れていた。特に、市販のコーティング素材より、ヒトES細胞の培養に適していることを明らかとした。さらに心筋細胞への分化も成功した。

研究成果の概要(英文)：Establishing cultures of human embryonic (ES) and induced pluripotent (iPS) stem cells in xeno-free conditions is essential for producing clinical-grade cells. We designed several structures of oligopeptide-grafted poly(vinyl alcohol-co-itaconic acid) hydrogels with optimal elasticity, and prepared them in formations of single chain, single chain with joint segment, dual chain with joint segment, and branched-type chain. Oligopeptide sequences were selected from integrin- and glycosaminoglycan-binding domains of the extracellular matrix. The hydrogels grafted with vitronectin-derived oligopeptides having a joint segment or a dual chain, which has a storage modulus of 25 kPa, supported the long-term culture of human ES and iPS cells for over 10 passages, which showed better performance than commercially available coating materials. We also succeeded to differentiate human ES cells into cardiomyocytes on the hydrogels.

研究分野：高分子基板を用いた幹細胞培養並びに分化

キーワード：胚性幹細胞 生体材料 細胞培養 細胞分化 バイオマテリアル 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞並びに iPS 細胞は、幹細胞療法、再生医療への有効性が期待されている。

しかしながら、これらの幹細胞を、動物由来の物質を持ちいずに、多分化能を維持した状態で培養することが必須である。現在、ES 細胞並びに iPS 細胞は、線維芽細胞上あるいはマウス癌細胞由来のマトリゲル上で培養することが一般的な手法である。非動物由来の材料で、ES 細胞並びに iPS 細胞培養用基板を開発することは、再生医療分野で必須のプロセスである。

ヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)並びにヒト ES 細胞(胚性細胞)細胞は幹細胞療法並びに再生医療において必要な細胞源であるが、これらヒト幹細胞の多分化能状態での培養並びに適切な組織細胞への分化誘導は、いまだに困難を極めている。<sup>1)</sup> 例えば、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞からの (a)パーキンソン病への治療として期待されるドーパミン産生神経細胞 (TH 細胞) (b) 糖尿病患者への治療として期待されるインスリン産生細胞 (β 細胞) への分化は、いまだに分化効率が低く実用化が困難である。さらに、ヒト iPS 細胞並びに ES 細胞の多能性を有する状態での増殖には、一般にマウス胎児性線維芽細胞 (MEF 細胞、feeder layer) 上でヒト iPS 細胞並びにヒト ES 細胞を培養しており、マウス由来のウイルス等の感染の可能性を否定できない。従って、これらの幹細胞を臨床応用するためには、(c)MEF 細胞を用いない新規バイオマテリアル上でのヒト iPS 細胞並びにヒト ES 細胞の多分化状態での培養法の確立が必須である。

### 2. 研究の目的

幹細胞の運命(多分化状態の保持、特異的組織細胞への分化)の制御は、幹細胞培養基板の物理的特性(剛性/弾性(stiffness))並びに生物化学的特性(細胞接着部位ペプチドの種類並びに表面密度)に大いに依存することが示唆されているが、これらの研究は個別に行なわれてきており、系統的な研究はなされてこなかった。そこで本研究では、(1)物理的因子と生物化学的因子双方を考慮した幹細胞培養用基板を設計し、ES 細胞並びに iPS 細胞の多分化能を維持した状態での大量培養の可能性を検討すること、並びに、(2)適切な組織細胞(骨芽細胞、ドーパミン産生細胞、インスリン産生細胞)への分化効率の高い最適な基板の剛性/弾性並びに最適な細胞接着因子ペプチドあるいは細胞外マトリックス(ECM)の判明を、本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

本申請研究は、(a) 様々な剛性/弾性(stiffness)を有する幹細胞培養基板の調製を行なった。細胞培養基板の剛性/弾性(stiffness)は、基板高分子ゲルの架橋度を調整して制御した。調製した細胞培養基板の剛性/弾性は原子間力顕微鏡により計測した。(b) 様々な剛性/弾性を有する細胞培養基板表面に、細胞外マトリックスをカルボジイミド法を用いて固定化させた(図1)。(d) 細胞外マトリックス並びに細胞接着因子ペプチド固定化細胞培養基板(ナノセグメント固定化細胞培養基板)上でヒト iPS 細胞並びにヒト ES 細胞の培養を行い、多能性状態に何継体まで培養可能か評価した。さらに、(e)ヒト iPS 細胞並びに ES 細胞をナノセグメント固定化細胞培養基板上で培養を行い、骨芽細胞、インスリン産生細胞(β 細胞)並びにドーパミン産生神経細胞(TH 細胞)への分化実験を行い、各分化細胞に対する最適なナノセグメントの特性並びに表面濃度を評価した。

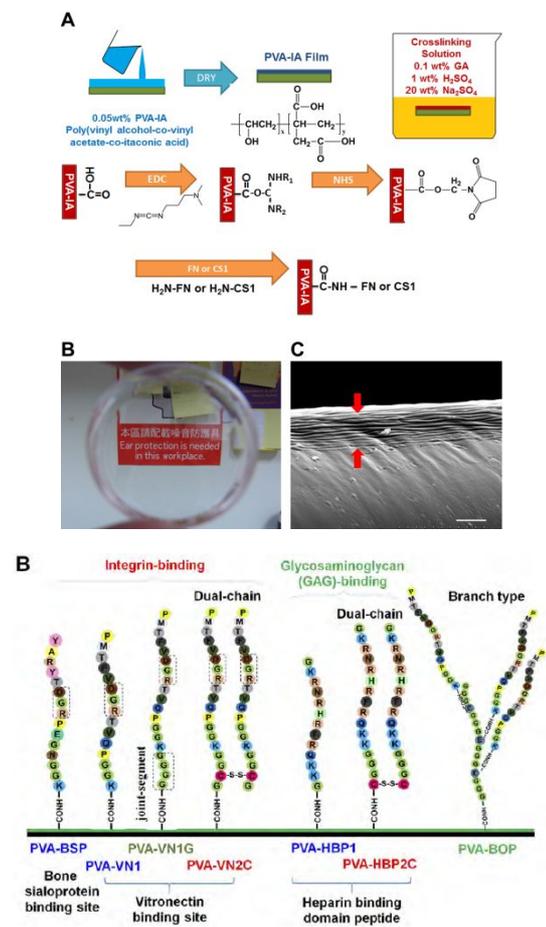


図1 細胞接着因子ペプチド固定化細胞培養基板の調製

### 4. 研究成果

ヒトES細胞並びにiPS細胞を動物由来の物質を持ちいずに、多分化能を維持した状態で培

養することが必須である。現在、ES細胞とiPS細胞は、線維芽細胞上あるいはマウス癌細胞由来のマトリゲル上で培養することが一般的な手法である。非動物由来の材料で、ES細胞並びにiPS細胞培養用基板を開発することは、再生医療分野で必須のプロセスである。本研究は、様々な架橋度（剛性 / 弾性）を有するポリビニルアルコールハイドロゲル上にナノセグメント（細胞接着因子ペプチド（ビトロネクチン由来オリゴペプチド；KGGPQVTRGDVFTMP (VN1)、GGGGKGGPQVTRGDVFTMP (VN1G)、GCGGKGGPQVTRGDVFTMP (VN2C)、GKKQFRHRNRKG (HBP1)、GCGGKQFRHRNRKG (HBP2C) 並びにKGGNGEPRGDYRAY (BSP) ) 固定化細胞培養基板上でヒトES細胞 (H9) 並びにヒトiPS細胞をXeno-フリー培地中で培養した。25.3 Kpaの弾性率を有するハイドロゲルは、iPS細胞並びにES細胞をXeno-free状態で長期間培養することに成功した (図2 図4)。

特に、ジョイントセグメントのあるVN1Gナノセグメント並びに2本鎖を有するVN2Gナノセグメントをハイドロゲル上に固定化した基板は、ヒトES細胞 (H9) 並びにヒトiPS細胞の培養に特に優れていた。特に、市販のコーティング素材より、ヒトES細胞の培養に適していることを明らかとした。さらに心筋細胞への分化も検討した。本研究の結果、細胞培養基の物理特性（弾性率）並びに生物学的特性（特異的細胞接着オリゴペプチド）は、ヒトES細胞 (H9) 並びにヒトiPS細胞の培養に重要であることを明らかとした。本研究の成果は、Scientific Reports 7 (2017) 45146等に掲載された。

本研究成果等で、AIBME (American Institute for Medical Biological Engineering) Fellow (USA)等を受賞することが可能となった。日本学術新公開並びに国立研究開発法人理化学研究所に感謝いたします。

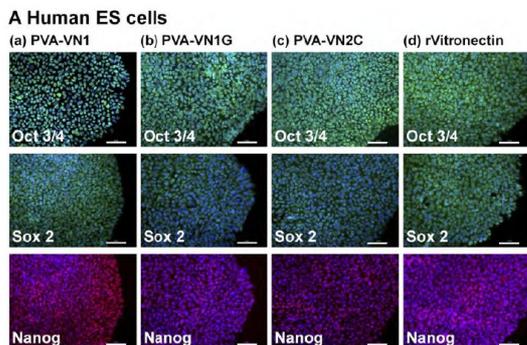


図2 細胞接着因子ペプチド固定化細胞培養基板上に培養したヒトES細胞 (H9) の多分化能性

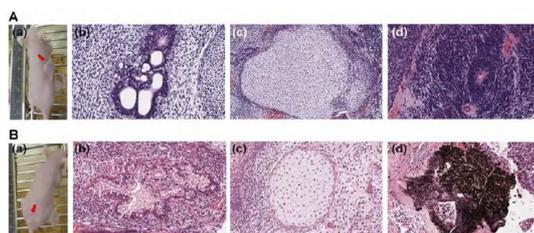


図3 細胞接着因子ペプチド固定化細胞培養基板上に培養したヒトES細胞 (H9) の3胚芽分化性

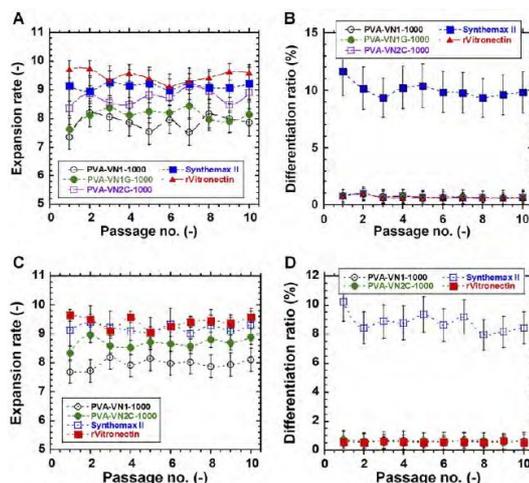


図4 細胞接着因子ペプチド固定化細胞培養基板上に培養したヒトES細胞 (H9) の3長期培養特性

## 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 18 件)

1. Sung TC, Li HF, Higuchi A, Ling QD, Yang JS, Tseng YC, Pan CP, Alarfaj AA, Munusamy MA, Kumar S, Hsu ST, Murugan K, Human Pluripotent Stem Cell Culture on Polyvinyl Alcohol-Co-Itaconic Acid Hydrogels with Varying Stiffness Under Xeno-Free Conditions, J Vis Exp. (JOVE) 2018, 132, e57314 (Feb) <SCI, Impact factor= 1.232>(査読有) 10.3791/57314
2. K. Murugan, J. Madhavan, C. M. Samidoss, C. Panneerselvam, A. T. Aziz, A. Malathi, A. Rajasekar, A. Pandiyan, S. Kumar, A. A. Alarfaj, A. Higuchi, G. Benelli, Bismuth Oxide Nanoflakes Showed Toxicity Against the Malaria Vector Anopheles stephensi and In Vivo Antiplasmodial Activity, JOURNAL OF CLUSTER SCIENCE, 29(2) 337-344 (2018) (Mar) <SCI, Impact factor= 1.471>(査読有) <https://doi.org/10.1007/s10876-018-1332-3>
3. Xiang Z, Wang KJ, Zhang WZ, Teh SW, Peli A, Mok PL, Higuchi A, Kumar SS, Gold Nanoparticles Inducing Osteogenic

- Differentiation of Stem Cells: A Review, *JOURNAL OF CLUSTER SCIENCE*, 29(1), 1-7 (2018) (Jan) <SCI, Impact factor= 1.471> (査読有)  
<https://doi.org/10.1007/s10876-017-1311-0>
4. Murugan K, Jaganathan A, Rajaganesh R, Suresh U, Madhavan J, Senthil-Nathan S, Rajasekar A, Higuchi A, Kumar SS, Alarfaj AA, Nicoletti M, Petrelli R, Cappellacci L, Maggi F, Benelli G, Poly(Styrene Sulfonate)/Poly(Allylamine Hydrochloride) Encapsulation of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Boosts Their Toxic and Repellent Activity Against Zika Virus Mosquito Vectors, *JOURNAL OF CLUSTER SCIENCE*, 29(1), 27-39;2018 (Jan) <SCI, Impact factor= 1.471> (査読有)  
<https://doi.org/10.1007/s10876-017-1300-3>
  5. Danjuma L, Ling MP, Hamat RA, Higuchi A, Alarfaj AA, Marlina, Benelli G, Arulselvan P, Rajan M, Kumar Subbiah S, Genomic plasticity between human and mycobacterial DNA: A review, *Tuberculosis*, 107, 38-47 (2017). (Dec) <SCI, Impact factor= 2.873> (査読有)  
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.03.006>
  6. Priya SP, Sakinah S, Sharmilah K, Hamat RA, Sekawi Z, Higuchi A\*, Ling MP, Nordin SA, Benelli G, Kumar SS., Leptospirosis: Molecular path and immunopathogenesis correlated with dengue, malaria and mimetic hemorrhagic infections, *Acta Tropica*, 176, 206-223 (2017). (Dec) <SCI, Impact factor= 2.218> (査読有)  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.007>
  7. Kumaran SK, Bakar MFA, Mohd-Padil H, Mat-Sharani S, Sakinah S, Poorani K, Alsaedy H, Peli A, Wei TS, Ling MP, Hamat RA, Neela VK, Higuchi A\*, Alarfaj AA, Rajan M, Benelli G, Arulselvan P, Kumar SS, 3D modelling of the pathogenic Leptospira protein LipL32: A bioinformatics approach, *Acta Trop.*, 176, 433-439 (2017) (Dec) <SCI, Impact factor= 2.218> (査読有)  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.011>
  8. A. Higuchi\*, S. S. Kumar, G. Benelli, A. A. Alarfaj, M. A. Munusamy, A. Umezawa, K. Murugan, Stem Cell Therapies for Reversing Vision Loss, *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(11), 1102-1111. (Nov) <SCI, Impact factor= 11.126> (査読有)  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.016>
  9. C.-C. Yeh, A. Venault, L.-C. Yeh, A. Chinnathambi, S. A. Alharbi, A. Higuchi, Y. Chang, Universal Bioinert Control of Polystyrene Interfaces via Hydrophobic-Driven Self-Assembled Surface PEGylation with a Well-Defined Block Sequence, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 218(19), 1700102 (2017). (Oct) <SCI, Impact factor= 2.500> (査読有)  
<https://doi.org/10.1002/macp.201700102>
  10. Higuchi A, Ku NJ, Tseng YC, Pan CH, Li HF, Kumar SS, Ling QD, Chang Y, Alarfaj AA, Munusamy MA, Benelli G, Murugan K. Stem cell therapies for myocardial infarction in clinical trials: bioengineering and biomaterial aspects. *Laboratory Investigation*, 97(10), 1167-1179 (2017). Oct<SCI, Impact factor= 4.857> (査読有)  
[10.1038/labinvest.2017.100](https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.100)
  11. Krishnan P, Rajan M, Kumari S, Sakinah S, Priya SP, Amira F, Danjuma L, Pooi Ling M, Fakurazi S, Arulselvan P, Higuchi A, Arumugam R, Alarfaj AA, Munusamy MA, Hamat RA, Benelli G, Murugan K, Kumar SS., Efficiency of newly formulated camptothecin with  $\beta$ -cyclodextrin-EDTA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle-conjugated nanocarriers as an anti-colon cancer (HT29) drug. *Sci Rep*. 2017;7(1):10962 Sep <SCI, Impact factor= 4.259> (査読有)  
[10.1038/s41598-017-09140-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09140-1)
  12. S. Muduli, L.-H. Chen, M.-P. Li, Z. Heish, C.-H. Lui, S. S. Kumar, A. A. Alarfaj, M. A. Munusamy, G. Benelli, K. Murugan, H.-C. Wang, D.-C. Chen, S.-T. Hsu, S.-C. Chang, A. Higuchi\*, Stem cell culture on polyvinylalcohol hydrogels having different elasticity and immobilized with ECM-derived oligopeptides, *J. Polym Eng.* 37(7) 647-660 (2017) Sep <SCI, Impact factor= 0.658> (査読有)  
<https://doi.org/10.1515/polyeng-2016-0193>
  13. S. Muduli, H. H.-C. Lee, J.-S. Yang, T.-Y. Chen, A. Higuchi\*, S. S. Kumar, A. A. Alarfaj, M. A. Munusamy, G. Benelli, K. Murugan, C.-Y. Liu, Y.-F. Chen, Y. Chang, B. Moorthy, H.-C. Wang, S.-T. Hsu, Q.-D. Ling, Proliferation and osteogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells, *J. Mater. Chem. B*, 2017, 5, 5345-5354 (Jul) <SCI, Impact factor= 4.543> (査読有)  
[10.1039/C7TB01152K](https://doi.org/10.1039/C7TB01152K)
  14. K. Kalimuthu, C. Panneerselvam, C. Chou, L.-C. Tseng, K. Murugan, K.-H. Tsai, A. A. Alarfaj, A. Higuchi, A. Canale, J.-S. Hwang, G. Benelli, Control of dengue and Zika virus vector *Aedes aegypti* using the predatory copepod *Megacyclops formosanus*: Synergy with *Hedychium coronarium*-synthesized silver nanoparticles and related histological changes in targeted mosquitoes, *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 82-96 (2017) (July) <SCI, Impact factor= 2.905> (査読有)  
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.03.027>
  15. Priya SP, Sakinah S, Ling MP, Chee HY, Higuchi A, Hamat RA, Neela VK, Alarfaj AA, Munusamy MA, Hatamleh AA, Al-Sabri AE, Abdulaziz Al-Suwaillem IA, Rajan M, Benelli G, Marlina, Kumar SS., Micro-anatomical changes in major blood

- vessel caused by dengue virus (serotype 2) infection, *Acta Trop.* 2017;171:213-219 (July) <SCI, Impact factor= 2.218> (査読有) 10.1016/j.actatropica.2017.04.010
16. Sujitha V, Murugan K, Dinesh D, Pandiyan A, Aruliah R, Hwang JS, Kalimuthu K, Panneerselvam C, Higuchi A, Aziz AT, Kumar S, Alarfaj AA, Vaseeharan B, Canale A, Benelli G, Green-synthesized CdS nano-pesticides: Toxicity on young instars of malaria vectors and impact on enzymatic activities of the non-target mud crab *Scylla serrata*, *Aquat Toxicol.* 2017;188:100-108 (July) <SCI, Impact factor= 4.129> (査読有) 10.1016/j.aquatox.2017.04.015
17. A. Venault, Y.-C. Huang, J. W. Lo, C.-J. Chou, A. Chinnathambi, A. Higuchi, W.-S. Chen, W.-Y. Chen and Y. Chang, Tunable PEGylation of branch-type PEI/DNA polyplexes with a compromise of low cytotoxicity and high transgene expression: in vitro and in vivo gene delivery, *J. Mater. Chem. B*, 2017, 5, 4732-4744. (June) <SCI, Impact factor= 4.543> (査読有) 10.1039/C7TB01046J
18. Govindaraj, D; Rajan, M; Munusamy, MA; Alarfaj, AA; Higuchi, A; Kumar, SS, Carbon nanotubes/pectin/minerals substituted apatite nanocomposite depositions on anodized titanium for hard tissue implant: In vivo biological performance, *MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS*, 194, 77-89 (2017). (June) <SCI, Impact factor= 2.084> (査読有) <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.03.039>

〔学会発表〕(計 8 件)

- 樋口亜紺, Proliferation and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Cultured on Biomaterials having Nanosegments, 2017 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-America Meeting (Termis-AM), 2017年 (招待講演)
- 樋口亜紺, Xeno-free culture of human pluripotent stem cells on oligopeptide-grafted hydrogels with various molecular designs, 2017 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-Asia Pacific Meeting (Termis-AP), 2017年 (招待講演)
- 樋口亜紺, Current Status of Clinical Trials of Human Pluripotent Stem Cells and Human Pluripotent Stem Cell Culture on Biomaterials Immobilized with Extracellular Matrix, The 4th International Symposium of Materials on Regenerative Medicine in conjunction with The Second Russia-Taiwan Symposium on Nanomedicine and Radiology, 2017年 (招待講演)
- 樋口亜紺, Human pluripotent stem cell culture on hydrogels grafted with nanosegments for

- feeder-free culture, 2017 International Symposium of Biotechnology on Biomaterials, Stem cells and Tissue Engineering, 2017年 (招待講演)
- 樋口亜紺, Current status of clinical trials of human pluripotent stem cells and culture and differentiation of human pluripotent stem cells on biomaterials having nanosegments, 2nd International Anatomical and Biomedical Scientific Conference 2017, 2017年 (招待講演)
  - 樋口亜紺, Human Pluripotent Stem Cell Culture on Hydrogels Grafted with Nanosegments for Feeder-free Culture, Asia Pacific Society for Materials Research 2017 (APSMR 2017), 2017年 (招待講演)
  - 樋口亜紺, Human stem cell culture and differentiation on surface immobilized thermoresponsive copolymers, The 6th International Conference on Bio-based Polymers (ICBP 2017) Joint Symposium with The Annual Meeting of Biomaterials and Controlled Release Society (BCRS), 2017年 (招待講演)
  - 樋口亜紺, Human Pluripotent Stem Cell Culture on Hydrogels Grafted with Nanosegments for Feeder-free Culture, International Membrane Conference in Taiwan 2017, 2017年 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 樋口 亜紺 (HIGUCHI, Akon)  
 国立研究開発法人理化学研究所・  
 伊藤ナノ医工学研究室・客員研究員  
 研究者番号：30189766

