

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16398

研究課題名(和文) 脊髄損傷治療のための活性酸素消去ポリマーの新規合成とその機能評価

研究課題名(英文) Design of biomaterials for treatment of spinal cord injury

研究代表者

吉富 徹 (Yoshitomi, Toru)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：20585799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、L体とD体のアミノ酸からなるペプチドナノファイバーゲルに骨髄系の間葉系幹細胞を封入し、ゲル内での細胞の分化状態について調べた。その結果、幹細胞はL体のペプチドナノファイバーゲル内でよく増殖し、また細胞が伸展し、脂肪・神経・骨髄細胞への分化が起きやすいことを明らかにした。一方、D体のペプチドナノファイバーゲル内では、未分化状態が維持されやすいことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、間葉系幹細胞の機能が足場材料の光学活性にも影響されることが明らかとなった。今後、再生医療向けの足場材料の開発が重要になってくることから、本研究結果は、今後の足場材料の設計において、非常に有用な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Chirality effects on stem cell fate were investigated in three-dimensional culture using soft fibrous hydrogels consisting of self-assembled l- and d-form Fmoc-Phe-Phe-Cys networks photo-cross-linked by poly(ethylene glycol) (l- and d-gel, respectively). Encapsulated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells were all alive, spread, and grown in both hydrogels. Interestingly, the cells preferably spread and grew in l-gel compared to in d-gel under mixed induction, and cell osteogenesis and adipogenesis differentiation in d-gel were suppressed compared to in l-gel. These results revealed that stem cell function and fate can be regulated in three-dimensional hydrogel culture systems with chiral motifs.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ペプチドナノファイバー 間葉系幹細胞 光学活性 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

損傷した脳や脊髄は再生能力が低く、一度損傷したら修復しないと考えられてきた。しかしながら、近年、神経幹細胞の移植や軸索伸長抑制環境の改善などによる中枢神経経路の再建が報告され、中枢神経障害の治療に兆しが見えつつある。この幹細胞移植では、損傷後、培養して増やした間葉系幹細胞を点滴することで、移植された幹細胞から分泌される神経栄養因子によって治療効果を示すと考えられている。しかしながら、投与された細胞のうち、ほとんどの細胞が患部に到達しないため、損傷部位に直接幹細胞を注射する技術が必要となる。また損傷部位は、炎症が生じており、移植した細胞もダメージを受ける。そこで、損傷部位の炎症を抑制し、移植した幹細胞が未分化状態を維持するスキャホールドバイオマテリアルの開発が重要になる。

2. 研究の目的

分化・未分化状態を制御し、酸化ストレスや炎症から細胞を守ることが可能なバイオマテリアルを開発する。

3. 研究の方法

本研究では、液相で大量合成可能な Fmoc 基を有するトリペプチド (Fmoc-FFC: Fmoc-フェニルアラニン-フェニルアラニン-システイン) から成るペプチドナノファイバゲルを新規に作製した。このペプチドナノファイバーの中に、骨髄系間葉系幹細胞を封入し、ポリエチレングリコールの架橋剤を用いて光架橋を行うことにより、細胞の分化挙動を長期間評価可能なゲルを作製した。この封入された細胞の増殖及び接着、分化について調査した。

4. 研究成果

疎水性相互作用を駆動力とする自己組織化ペプチドナノファイバーは、自己組織化直後にはゾル状態であるため、幹細胞を懸濁し、損傷部位に注射すると、ファイバー表面にあるシステイン同士が炎症環境で生じた活性酸素と反応しジスルフィド結合を形成することでゲル化する(図1)。このペプチドナノファイバゲル封入培養が間葉系幹細胞の機能に与える影響を調べた。L体とD体のアミノ酸からなる Fmoc-FFC ペプチドナノファイバゲルに間葉系幹細胞を封入し培養したところ、幹細胞はL体のペプチドナノファイバゲル内で細胞が良く進展するだけでなく増殖速度も高く、脂肪・骨芽・神経などの細胞に分化しやすくなることを明らかにした(図1B、*ACS Applied Bio Materials*, 1(3), 538-543 (2018))。一方で、D体のペプチドナノファイバゲル内で細胞伸展が抑制され、また未分化状態が長期間維持させることが明らかとなった。このようにアミノ酸の光学異性体の種類の違いで、封入された細胞の性質を大きく変化させることを世界で初めて見出した。

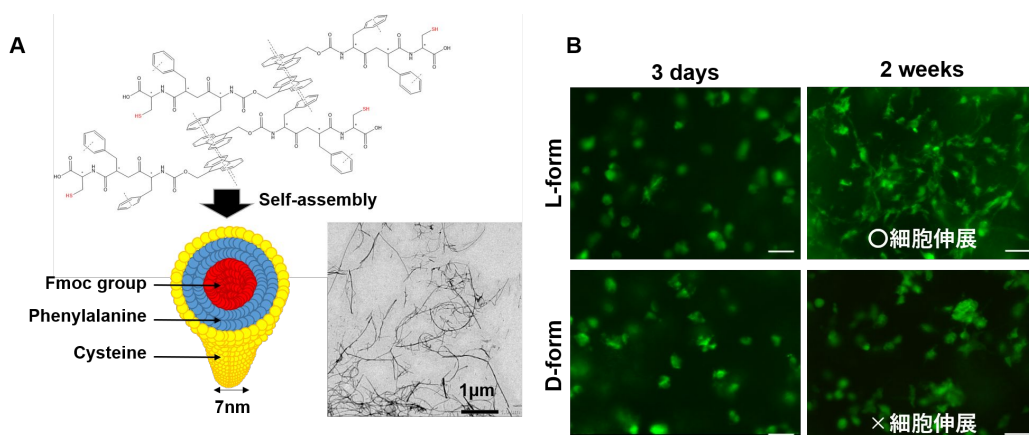


図1:(A)Fmoc-FFC ペプチドナノファイバーの構造式と自己組織化後の電子顕微鏡画像:直径7nmのナノファイバーを形成。(B)Fmoc-FFC ペプチドナノファイバゲルによる間葉系幹細胞の封入(細胞をカルセイン AM で染色している:細胞を緑色に示す)培養開始2週間後の写真から、L体アミノ酸からなるペプチドナノファイバゲル内の細胞数が多く、また細胞が進展していることが確認できる。この結果は、細胞がL体とD体を認識して、細胞接着が起きていることを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Toru Yoshitomi, Fumiya Wayama, Keiko Kimura, Koji Wakui, Hitoshi Furusho, and Keitaro Yoshimoto, Screening of DNA signaling aptamer from multiple candidates obtained from SELEX with next-generation sequencing. *Anal Sci.* 35(1):113-116 (2019). [査読あり]
2. Koji Wakui, Toru Yoshitomi, Akane Yamaguchi, Maho Tsuchida, Shingo Saito, Masami Shibukawa, Hitoshi Furusho, Keitaro Yoshimoto. Rapidly Neutralizable and High Anticoagulant Thrombin-Binding DNA Aptamer Discovered by Microbeads-Assisted Capillary Electrophoresis (MACE) SELEX. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 16: 348-359 (2019). [査読あり]
3. Koji Wakui, Akihito Abe, Toru Yoshitomi, Hitoshi Furusho, and Keitaro Yoshimoto, High Enrichment of Nucleobase-Modified Aptamers in Early Selection Rounds by Microbeads-Assisted Capillary Electrophoresis SELEX. *Anal Sci.* 35(5): 585-588 (2019). [査読あり]
4. Junya Yoshioka, Yu Ohsugi, Toru Yoshitomi, Tomoyuki Yasukawa, Naoki Sasaki and Keitaro Yoshimoto, Label-free rapid separation and enrichment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from heterogeneous cell mixture using a dielectrophoresis device. *Sensors* 18: 3007 (2018). [査読あり]
5. Zheng, Hangyu., Toru Yoshitomi and Keitaro Yoshimoto, Analysis of Chirality Effects on Stem Cell Fate Using Three-dimensional Fibrous Peptide Hydrogels. *ACS Applied Bio Materials* 1(3): 538-543 (2018). [査読あり]
6. Ryo Maruyama, Kurumi Makino, Toru Yoshitomi, Hiroharu Yui, Hitoshi Furusho and Keitaro Yoshimoto, Estimation of G-Quartet-Forming Guanines in Parallel-Type G-Quadruplexes by Optical Spectroscopy Measurements of Their Single-Nucleobase Substitution Sequences. *Analyst* 143: 4022-4026 (2018). [査読あり]
7. Shunsuke Tomita, Hiroki Nomoto, Toru Yoshitomi, Kazutoshi Iijima, Mineo Hashizume and Keitaro Yoshimoto, Noninvasive Fingerprinting-Based Tracking of Replicative Cellular Senescence Using a Colorimetric Polyion Complex Array. *Anal Chem.* 90(11): 6348-6352 (2018). [査読あり]
8. Yasuhiko Iwasaki, Atsushi Yokota, Akihisa Otaka, Naoyuki Inoue, Akane Yamaguchi, Toru Yoshitomi, Keitaro Yoshimoto and Masashi Neo, Bone-targeting poly(ethylene sodium phosphate). *Biomaterials Science* 6(1):91-95 (2017). [査読あり]
9. Hiroshi Asanuma, Shoji Sanada, Toru Yoshitomi, Hideyuki Sasaki, Hiroyuki Takahama, Madoka Ihara, Yoshiro Shinozak, Hidezo Mori, Masanori Asakura, Atsushi Nakano, Masaru Sugimach, Yoshihiro Asano, Tetsuo Minamino, Seiji Takashima, Yukio Nagasaki and Masafumi Kitakaze, Novel Synthesized Radical-Containing Nanoparticles Limit Infarct Size Following Ischemia and Reperfusion in Canine Hearts. *Cardiovascular drugs and therapy* 31(5-6): 501-510 (2017). [査読あり]
10. Kanako Shiota, Susumu Hama, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki and Kentaro Kogure, Prevention of UV-Induced Melanin Production by Accumulation of Redox Nanoparticles in the Epidermal Layer via Iontophoresis. *Biol Pharm Bull.* 40(6): 941-944 (2017). [査読あり]
11. Yuichi Furuhashi, Toru Yoshitomi, Yuka Kikuchi, Miho Sakao and Keitaro Yoshimoto, Osteogenic Lineage Commitment of Adipose-Derived Stem Cells Is Predetermined by Three-Dimensional Cell Accumulation on Micropatterned Surface. *ACS Appl Mater Interfaces.* 9(11): 9339-9347 (2017). [査読あり]
12. Junya Yoshioka, Toru Yoshitomi, Tomoyuki Yasukawa and Keitaro Yoshimoto, Alternation of Gene Expression Levels in Mesenchymal Stem Cells by Applying Positive Dielectrophoresis. *Anal Sci.* 32(11): 1213-1216 (2016).

[学会発表](計 13 件)

宮川 雅都、吉本 敬太郎、吉富 徹、山口 茜、和久井 幸二、齋藤 伸吾、渋川 雅美、宮内 さおり、古性 均：多価核酸アプタマーに対する中和配列の設計、日本化学会第 99 春季年会 2019、甲南大学、2019 年 3 月 17 日

澤田 燎、和久井 幸二、吉富 徹、吉本 敬太郎：粒子支援型キャピラリー電気泳動法を利用する TNF α 結合 DNA アプタマー群の選抜、日本化学会第 99 春季年会 2019、甲南大学、2019 年 3 月 17 日

林 美彩子、吉富 徹、木村 恵子、和山 文哉、古性 均、吉本 敬太郎：VEGF-A に似た薬理活性とヌクレアーゼ耐性を有する G-カルテット DNA アプタマー、日本化学会第 99 春季年会 2019、甲南大学、2019 年 3 月 17 日

中村 玲、吉本 敬太郎、吉富 徹：ヌクレアーゼ耐性を有する環状トロンピンアプタマーの作製と評価、日本化学会第 99 春季年会 2019、甲南大学、2019 年 3 月 17 日

Hangyu Zheng, Toru Yoshitomi, and Keitaro Yoshimoto: Analysis of chirality effects on stem cell fate in three-dimensional fibrous peptide/polymer hybrid hydrogels, 3rd international symposium on nanoarchitectonics for mechanobiology, Tsukuba, March 7-8, 2019

Ryo Maruyama, Toru Yoshitomi, Fumiya Wayama, Koji Wakui, Koki Makabe, Hitoshi Furusho, Keitaro Yoshimoto: Divalent metal ion-independent cell adhesion events mediated by E-cadherin binding DNA aptamer that forms parallel type G-quadruplex with three long loops, 3rd international symposium on nanoarchitectonics for mechanobiology, Tsukuba, March 7-8, 2019

Misako Hayashi, Toru Yoshitomi, Keiko Kimura, Fumiya Wayama, Hitoshi Furusho, and Keitaro Yoshimoto: Nuclease-resistant, G-Quadruplex DNA aptamer with VEGF A-like activity, 3rd international symposium on nanoarchitectonics for mechanobiology, Tsukuba, March 7-8, 2019

Toru Yoshitomi, Hangyu Zheng, and Keitaro Yoshimoto: Chirality effects on stem cell behavior in three-dimensional nanofibrous peptide/polymer hybrid hydrogels, 第 13 回ナノ・バイオメディカル学会大会, 東京理科大学, 2018

Hangyu Zheng, Toru Yoshitomi, and Keitaro Yoshimoto: Analysis of chirality effects on stem cell behavior in three-dimensional fibrous peptide/polymer hybrid hydrogels, 第 27 回ポリマー材料フォーラム, 船堀, 2019 年 11 月 21 日 (木) ~ 22 日 (金)

吉富 徹、池田 豊、矢口 達也、松村 卓馬、植田 敦志、平山 暁、長崎 幸夫: 安全で効果の高い腹膜透析を実現するシリカ含有レドックスナノ粒子の開発、第 27 回ポリマー材料フォーラム, 船堀, 2019 年 11 月 21 日 (木) ~ 22 日 (金)

Junya Yoshioka, Yu Ohsugi, Toru Yoshitomi, Tomoyuki Yasukawa, Naoki Sasaki, Keitaro Yoshimoto: Rapid enrichment and mechanical stimulation of mesenchymal stem cells using dielectrophoresis devices, 255th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA, United States, March 18-22, 2018 (2018)

Ryo, Maruyama, Toru Yoshitomi, Fumiya Wayama, Koji Wakui, Koki Makabe, Hitoshi Furusho, Keitaro Yoshimoto: Divalent metal ion-independent cell adhesion events mediated by E-cadherin-binding DNA aptamer that forms parallel type G-quadruplex with three long loops, 255th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA, United States, March 18-22, 2018 (2018)

Koji Wakui, Toru Yoshitomi, Maho Tsuchida, Shingo Saito, Masami Shibukawa, Hitoshi Furusho, Keitaro Yoshimoto: Identification of new classes of thrombin-binding aptamers by microbeads-assisted capillary electrophoresis (MACE) SELEX, 255th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA, United States, March 18-22, 2018 (2018)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ブロック共重合体、及びポリマーミセル、並びに薬粧品組成物、及び経皮吸収用製剤

発明者：吉富 徹、吉本 敬太郎、山邊 敦美

権利者：国立大学法人東京大学、株式会社リコー

種類：特許

番号：特許願 2017-040957 号

出願年：2017 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://yoshimotolab.c.u-tokyo.ac.jp/yoshitomi/>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉本 敬太郎 (東京大学大学院総合文化研究科 准教授)

ローマ字氏名：(YOSHIMOTO Keitaro)

研究協力者氏名：Hangyu Zheng (東京大学大学院総合文化研究科 博士後期課程 3 年)

ローマ字氏名：(ZHENG Hangyu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。