

令和元年6月27日現在

機関番号：82670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16414

研究課題名(和文)細胞接着性・高弾性率ゲルマトリクスを用いた3次元包埋による細胞の休眠化

研究課題名(英文)Method of cell quiescence using hydrogel with high modulus and cell adhesion

研究代表者

大藪 淑美(Ohyabu, Yoshimi)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・主任研究員

研究者番号：80587410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：室温で硬い細胞接着性ゲルマトリクスに含まれた細胞が休眠化することを実証し、休眠化に導く因子を明らかにした。さらに、間葉系幹細胞にも同様な現象が認められた。研究代表者らは先行する研究で、室温で強固なゼラチンゲルに包埋した皮膚線維芽細胞シートが1週間形態を変えず、90%を超える生存率を保持して再度培養へと移行した。本研究では、ゲルで包埋された細胞は休止期へ移行しなかったが、その遊走および増殖を停止して休眠化した。弾性率300 Paを超える硬いゲルに細胞を接着させた後、25℃付近の環境に置くと、可逆的に休眠化すると明らかにした。本研究の成果は、安全かつ確実な短期細胞保存システムの創出に期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医工学では、細胞侵襲性を有する凍結保存技術が伝統的に利用され、数十年ほとんど革新されていない。組織工学の飛躍的な進歩により、細胞足場の力学や生化学的特性が接着依存性細胞のlineageを制御することが明らかにされた。

本研究は、細胞工学と生体材料学の協働により、“安全かつ確実な細胞保存方法の確立”という再生医工学のかねてからの課題を解決した。さらに、細胞・組織・器官の保存という生命工学の普遍的課題にも重要な示唆を与え得る。

研究成果の概要(英文)：This study had demonstrated that cells encapsulating in hydrogel with high modulus and cell adhesion at room temperature were induced quiescence and revealed factors that lead to quiescence. Furthermore, similar quiescence had been also observed in mesenchymal stem cells. Previous studies have reported that skin fibroblast sheets embedded in hard gelatin gels at room temperature did not change their shape for a week, and they were transferred to culture again with retention of high viability. In this study, the gel-encapsulated cells have not induced to the resting period, but their migration and proliferation have been suppressed to become quiescence. After attaching the cells to a hard gel with an elastic modulus of more than 300 Pa, it has been found to be reversibly quiescence when placed in an environment around room temperature. The results would expect to create a safe short-term cell preservation system.

研究分野：再生医工学

キーワード：休眠化 ゼラチン 弾性率 細胞接着性 包埋

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療・再生治療における細胞の保存方法としては、数十年の歴史を持つ凍結保存法が改良を加えられながら利用されている。近年は三次元組織を構築する技術が向上し、治療の多くは高次組織の移植となっている。凍結保存は、分散された細胞の長期間保存法として有用な方法であるが、細胞への侵襲性が不可避なため、高次組織の保存には適用できない。

高次組織による再生治療の一般的になるにつれ、組織を数日間～数週間の短期間、侵襲性が低い安全かつ確実に保存する方法の創出が急務となっている。再生治療の実用化が進められ、幹細胞の分化誘導・高次組織の作製・治療技術が花形分野となっている一方で、従来の保存方法が再生治療に適合しないという問題が顕在化していた。

研究代表者は、温和な温度降下でゾル-ゲル転移するゼラチンの物理特性を細胞輸送用マトリクスとして利用できると考え、先行する研究で、液中での細胞輸送にとって最大の問題である“液の振動による細胞侵襲性”をゼラチンゲルで防ぐ方法を報告した(特願 2012-255357、J Biosci Bioeng 2014)。しかし、既存のゼラチンゲルは Tg が低いため、冷蔵 (10°C以下) でゲル化させる必要があった。平成 23-25 年度科学研究費助成事業若手研究 B では 10 万 kDa に満たない低分子量成分を除去して室温 (25°C) でゲル化するゼラチンを開発した。ゼラチンの高分子量化によってゲル化特性が向上することを見出し (Int J Biol Macromol 2013)、構造物性を突き詰め、ついに Tg が 32°C へと飛躍的に向上したブタ由来ゼラチンを開発することに成功した (特願 2015-207399)。このゼラチンは 30°C でも活発にゲル化するため、27°C 前後で親水化してしまう“温度応答性培養皿”で作製された細胞シートを、皿から剥がれない温度においてゲルで物理的に押さえつけることが可能になった。このように、従来のゼラチンでは決してゲル化し得なかった体温近傍 (30~32°C) でゲル化するゼラチンを開発した研究代表者は、細胞シートを輸送するためのゼラチンゲル包埋実験を開始した。その結果、予想しなかった現象を発見した: PBS 中 23°C に置いた細胞は直ぐに死滅するが、30°C でゼラチンをゲル化させ、そのまま 23°C に温度降下すると、細胞形態・細胞数が見かけ上まったく変化しなくなった。そのまま 23°C に 1 週間放置した後、37°C でゼラチンゲルを融解して細胞を回収すると、生存率 92% で増殖へと移行した。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では、室温で硬い細胞接着性ゲルマトリクスに包まれた細胞が休眠化することを実証するとともに、その休眠化機序を明らかにする。そこで、本研究では、以下の仮説を検証する『弾性率 1 kPa を超える硬いゲルマトリクスに細胞を接着させた後、低代謝環境に置くと、細胞周期が休止期へと移行して可逆的に休眠化する』

研究代表者が開発した高 Tg ゼラチン (HTG) を用いて、硬いゲルマトリクスに接着・3 次元的に包埋された線維芽細胞を低温 (低代謝) かつ PBS 溶媒 (貧栄養) 環境に置くと、細胞周期が休止期へと移行することを実証する。また、この休眠化現象にとって線維芽細胞が高弾性率ゲルマトリクス内に 3 次元的に接着していることが必須要件であることを組織学的・生化学的に示し、休眠化機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高 Tg ゼラチンの調製

我々が開発したコラーゲンの分子鎖を保持したままゼラチンを抽出する調製方法 (Y.Ohyabu et al. 2014) を用いて、ブタ腱組織由来コラーゲン水溶液の熱変性により Tg が高いゼラチン (HTG) を製造した。pH7.0 に調製し、緩衝作用のある溶液に溶解して濃度 1~5% に調製した。得られた 3%HTG は回転レオメーターで Tg を測定した。冷却して一定温度に静置した後、貯蔵弾性率 G' が 30 min 後に 50 Pa となる温度を Tg と定義した。

#### (2) ゼラチンの弾性率測定

動的粘弾性測定装置 (Anton Paar 製、MCR302) を用いて、HTG ゲルの弾性率を測定した。50°C で融解した HTG 水溶液を、センサーに添加して、23°C で 60 分間に保持したのち、G' を測定した。

#### (3) 線維芽細胞に影響を与える因子の特定

##### ① マトリックスに含まれる無機イオンの影響

細胞を、異なる溶媒で溶解した HTG で包埋して、23°C での細胞形態を観察して、細胞の生存率を測定した。濃度 1%HTG になるように、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンを含有された D-PBS (+) および含有されていない D-PBS (-) に溶解して調製した。対照として、細胞培養液 (10%FBS 含有の DMEM) を用いた。80%コンフルエントとなったマウス線維芽細胞 NIH3T3 を D-PBS (-) で洗浄したのち、37°C に HTG 水溶液を加えて、23°C で 30 分間、ゲル化させて包埋した。細胞形態を観察し、24 時間後に Cell Counting Kit8 (同人化学研究所製) を用いて、細胞の生存率を測定した。

##### ② マトリックスの弾性率の影響

細胞を、ゲル弾性率が異なる HTG 水溶液で包埋して、細胞形態を観察して、細胞の生存率を測定した。HTG を溶解する溶媒は D-PBS (+) を用いた。線維芽細胞を培養して、37°C で融解したゼラチン水溶液をゲル弾性率が異なる HTG は、濃度により調製し、2%、3% および 6% を用いた (細胞に HTG 水溶液を添加したのち、23°C で 60 分後の G' は 98.7Pa, 396Pa,

および 1290Pa)。前述と同様に、細胞形態を観察した。

### ③ 保存温度

線維芽細胞を、HTG 水溶液で包埋して、4℃および 23℃で保存後、細胞の生存率を測定した。HTG を溶解する溶媒は D-PBS (+) を用い、HTG 水溶液は濃度 3%とした。前述と同様に、線維芽細胞を用意して包埋したのち、4℃および 23℃で 2, 3 日間静置したのち、培養液を添加して再培養して 1 日後に、生細胞数を測定した。包埋直後の細胞数を 100%として、生存率を測定した。

## (4) 包埋された線維芽細胞の挙動

### ① 包埋された細胞の同一視野観察

線維芽細胞を、HTG 水溶液(溶媒は D-PBS (+), 濃度 3%)で包埋して、同一視野にて細胞形態を一定期間観察した。前述と同様に包埋して、23℃で倒立顕微鏡(カールツァイス製, Axio Observer)で 6 日間継続して細胞形態を観察した。観察したのち、培養液を添加して再培養した。

### ② 包埋された細胞の細胞周期の検出

Fucci を導入した線維芽細胞を、HTG 水溶液(溶媒は D-PBS (+), 濃度 3%)で包埋して、同一視野にて細胞を一定期間観察した。線維芽細胞を細胞培養皿に播種して 6 時間静置したのち、Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor (BacMam 2.0)のプロトコルに従い、Fucci を導入した。前述と同様に包埋して、23℃で倒立顕微鏡を用いて、28 時間継続して細胞を蛍光観察した。

### ③ 包埋時間による生細胞数の測定

線維芽細胞を、HTG 水溶液(溶媒は D-PBS (+), 濃度 3%)で包埋して、23℃で一定時間静置したのち、生細胞数を測定した。前述と同様に包埋して、23℃で 0, 4, 5, 7 日間静置したのち、生細胞数を測定した。

## (5) 包埋された間葉系幹細胞の挙動

間葉系幹細胞を、HTG 水溶液(溶媒は D-PBS (+), 濃度 3%)で包埋して、静置したのち、細胞生存率を測定した。前述と同様に包埋して、23℃で 4 日間静置したのち、細胞形態を観察した。包埋された幹細胞の生細胞および死細胞を、Cellstain Hoechst33342 Solution および Cellstain PI Solution (同人化学研究所製)のプロトコルに従って染色して、共焦点レーザー顕微鏡(ライカ製, TSC-CP5)で観察した。生存率は ImageJ を用いて、生細胞数および死細胞数を計測して算出した。

## 4. 研究成果

### (1) 本研究の価値

- ・細胞に休眠を促すトリガーを明らかにし、短期間であるが、細胞への侵襲性が低い保存技術を開発した。従来の凍結保存は長期間に対応できたが、再生医療で用いられる高次組織の保存が難しかった。

- ・本保存技術は、高次組織に加温されたゼラチンを加え、冷却して組織を休眠化させ、再び加温する温和な温度変化のみの簡便な保存技術である。高次組織の種類を問わず、作業者の技術も問わない汎用性の高い。

- ・本保存技術で用いるゲルマトリクスは、細胞外マトリクスであるコラーゲンと化学的に等価なゼラチンを用いており、細胞毒性がなく完全に除去する必要も無いため、医療に用いる時の障壁が低い。従来の凍結保存では、保存液の毒性が高く、完全な除去が必要であった。

### (2) 細胞の休眠化に与える因子

接着細胞の生存は足場との接着の維持が最も重要とされ、生物学的な因子である無機イオン(カルシウムイオンおよびマグネシウムイオン)および温度、物理的な因子であるマトリクスの硬さの 3 因子に着目した。まず、無機イオン含有の有無が異なる溶媒を用いた HTG ゲル内の細胞形態を図 1a b に、細胞生存率を図 1c に示す。無機イオンが含まれない溶媒を用いた細胞は丸く、培養皿からの剥離が確認され、その生存率も明らかに低下した。次に、異なる硬さである HTG ゲルに包埋された細胞の形態を図 2 に示す。300 Pa 以上では、細胞の剥離はなかった。最後に、異なる温度で保存された細胞の生細胞数を図 3 に示す。4℃保存は 3 日目に生細胞数が半減したが、23℃では変化しなかった。従って、細胞を休眠化に誘導する因子は、包埋ゲルには無機イオンを含み、300 Pa 以上のゲル弾性率を必要とし、保存温度は 23℃であることが明らかとなった。

### (3) 包埋が与える細胞への影響

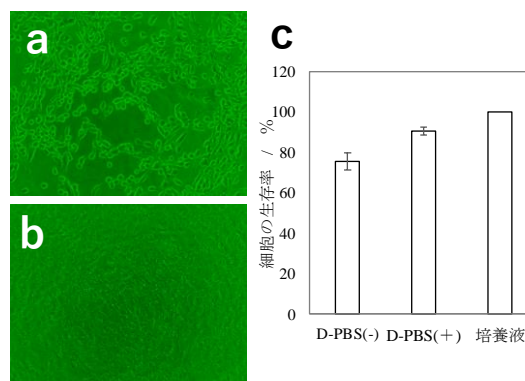


図 1 各種溶媒が与える細胞への影響 (a)D-PBS(-)を用いた細胞の位相差観察像, (b) D-PBS(+ )を用いた細胞の位相差観察像, (c) 細胞の生存率

従って、細胞を休眠化に誘導する因子は、包埋ゲルには無機イオンを含み、300 Pa 以上のゲル弾性率を必要とし、保存温度は 23℃であることが明らかとなった。

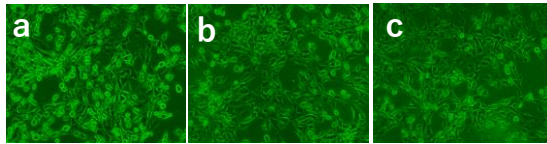


図 2 異なる弾性率のゲルで包埋された細胞の位相観察像  
(a)98.7 Pa, (b)396 Pa, (c)1290 Pa

包埋された細胞が高い生存率を維持した原因を、細胞の活動および細胞周期から明らかにした。まず、包埋前後で細胞の同一視野で追跡し、細胞の形態は6日間変化がなかったが、再培養したところ、一部の細胞は活動を再開したが、一部は凝集した死細胞があった(図4)。次に、包埋された細胞の細胞周期を、保存0, 12, 28時間の細胞の蛍光観察像を図5に示す。保存28時間まで全く細胞周期に変化がなかった。最後に、異なる保存期間で再

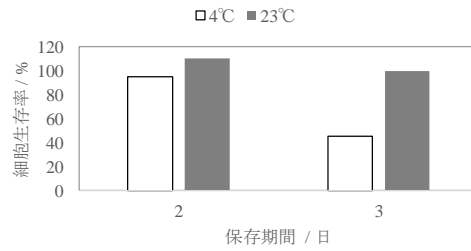


図 3 異なる保存温度による細胞生存率測定結果

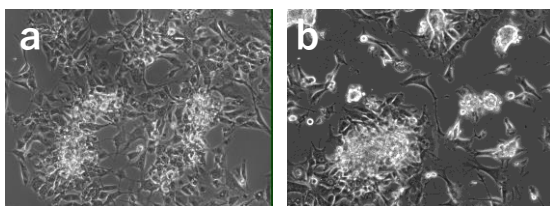


図 4 包埋後に再培養された細胞の位相差観察像  
(a)再培養直前, (b)再培養1日後

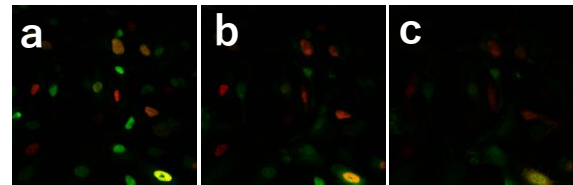
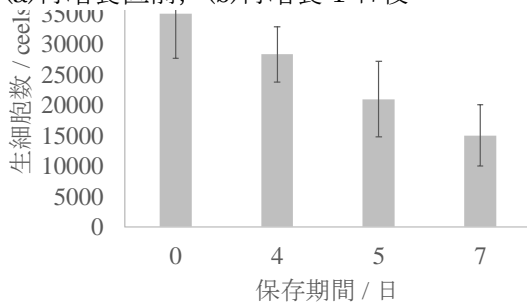


図 5 包埋された FUCCI 導入細胞の保存期間による蛍光観察像  
(a)0 時間, (b)12 時間, (c)28 時間, 赤:G1 期および G0 期(休止期), 緑:G2 期, 黄:S 期

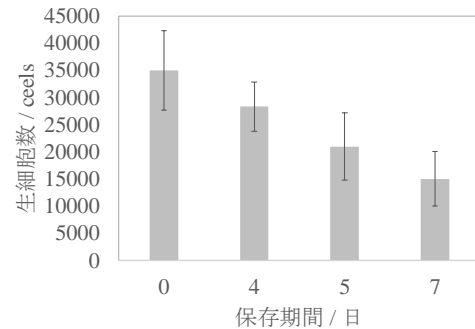


図 6 保存期間による再培養後の生細胞数

#### (4) 間葉系幹細胞への応用

線維芽細胞を用いて包埋による細胞の休眠化を実証した。本保存方法は、期間の上限が3日と短期間であるが、従来法では、貴重な細胞への侵襲性が課題であったが、短期間の保存でも十分な価値がある。そこで、臨床で利用されている間葉系幹細胞に利用できるか検証した。休眠化に誘導できる条件で4日保存した間葉系幹細胞の形態観察像を図7abに、生細胞および死細胞の蛍光観察像を図7cに示す。4日まで細胞形態に変化なく、死細胞もほぼ検出されなかった。従って、高弾性率のゼラチンゲルにて23°Cでの休眠化現象は幹細胞にも認められ、新しい保存方法として期待される。

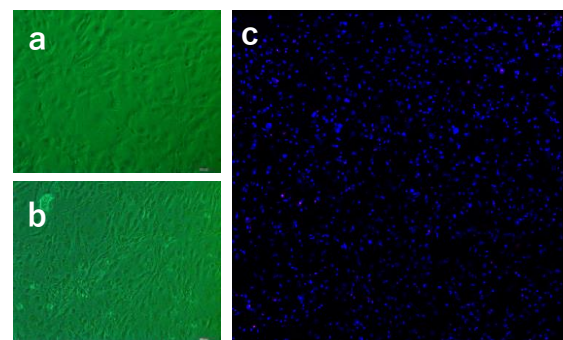


図 7 間葉系幹細胞による休眠化現象の検証結果

(a, b)細胞の位相観察像, (a)包埋直後, (b)保存4日, (c)保存4日の生細胞および死細胞の蛍光観察像, 赤:死細胞, 青:生細胞

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 大藪淑美, 井田昌孝, 伊田寛之, 藤井恭子, 柚木俊二, 平岡陽介 「安全かつ簡易なゼラチンゲル包埋細胞輸送の開発とそのプロトコルの最適化」 第16回日本再生医療学会総

- 会 2017年3月9日 仙台国際センター
- ② 大藪淑美, 井田昌孝、伊田寛之、藤井恭子、柚木俊二、平岡陽介 「ゼラチンゲルを用いた低侵襲な細胞シート輸送システムの提案」 第17回日本再生医療学会総会 2018年3月22日 パシフィコ横浜
  - ③ Yoshimi Ohyabu, Kyoko Fujii, Shunji Yunoki, Hiroyuki Ida, Masataka Ida, and Yosuke Hiraoka “Minimally-invasive cell transportation method for cell sheet based regenerative medicine” 5thTERMIS World Congress 2018.9.5
  - ④ 大藪淑美, 伊田寛之, 平岡陽介, 柚木俊二 「ゼラチンゲルを用いた低侵襲な細胞シート輸送の実証試験」 第18回日本再生医療学会総会 2019年3月22日 神戸国際会議場

〔図書〕(計1件)

大藪淑美, 柚木俊二, 平岡陽介 「細胞輸送用の温度応答性ゲルとしてゼラチンを用いる試み」  
ゲル化・増粘剤の使い方, 選び方 事例集 (株)技術情報協会 340-349 (2017)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6. 研究組織

研究代表者

大藪淑美 (OHYABU Yoshimi)

東京都立産業技術研究センター・主任研究員

研究者番号: 80587410

※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。