

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05009

研究課題名(和文) グラフェンを用いた硬/軟ハイブリッド基質によるヒト間葉系幹細胞の分化誘導

研究課題名(英文) Differentiation Induction of Human Mesenchymal Stem Cells by Graphene Attached Hard/Soft Hybrid Structure Substrates

研究代表者

伴 雅人 (Ban, Masahito)

日本工業大学・基幹工学部・教授

研究者番号：70424059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：超高弾性率・導電率という特異な特性を持つグラフェンを付着させた軟質基質を伸展することでグラフェンを微細なドメインに断片化させた「硬/軟ハイブリッド基質」を作製し、これを用いたヒト間葉系幹細胞の培養試験を実施した。弾性率の異なる基板や基本培地のほか神経分化誘導培地での培養などの様々な条件において、グラフェンが、大きな細胞増殖促進効果をもつことを明らかにした。細胞分化に関してはグラフェンには明らかな誘導効果は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞足場として使用する基質の表面にグラフェンを付着させることで、ヒト間葉系幹細胞を大幅に増殖させることができることが明らかになった。この効果は、基質が軟質なPDMSだけでなくガラス基板においても、また、基本培地のほか分化誘導培地を使用した場合においても認められた。このことは、グラフェンが、ヒト間葉系幹細胞細胞の高効率な増殖用足場として使用できる可能性を示しており、培養時間の短縮を図るための有力なツールになることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hard/soft hybrid structure substrates attached graphene with discriminating properties, extremely thin sheet-like structure, high elastic modulus and electric conductivity, were fabricated, and using these as the scaffolds culture tests of human mesenchymal stem cells were conducted. The substrates were obtained by fractionating the attached graphene into fine domains by means of applying a tensile strain. It was found that the graphene had a profound effect on promotion of cell proliferation at various conditions, substrates with different modulus, and basic medium and neuronal differentiation induction medium. Graphene did not indicate a significant effect on induction of differentiation into neuronal cells.

研究分野：材料工学

キーワード：グラフェン 幹細胞 増殖 分化

1. 研究開始当初の背景

細胞治療・再生医療には、細胞の機能維持や増殖さらには分化を誘導するための培養環境となる足場材料の開発が大きな鍵を握る。その大きな課題の一つである幹細胞の分化については、現在までに生化学因子(細胞増殖因子、サイトカインなど)を用い様々な細胞への分化が実現可能であることが実証されてきた。しかし、幹細胞をその細胞供給源として利用する場合、必要となる細胞数が膨大であることとそれを得るための生化学因子のコスト、さらに生化学因子の体内での影響が、細胞治療・再生医療実現のための大きな障壁となっている。そのため、生化学因子の減量や未使用での分化の方法が模索され、その有力な戦略の一つとして、材料工学的・物理的な視点から細胞分化を制御する手法、すなわち、足場材料の表面構造・特性を利用し物理刺激を細胞に与え分化を誘導することが挙げられ、ナノ・マイクロ構造により分化誘導を実現する多数の報告がなされてきた。

一方、細胞供給源としての幹細胞としては、ドナー(本人を含む)から入手しやすく、骨、軟骨、脂肪などの細胞に分化するヒト間葉系幹細胞(hMSC)があるが、hMSCは、非間葉系となる神経系細胞にも分化することが報告された[1]ことから、近年、神経系疾患への細胞供給源としてのポテンシャルに大きな期待が集まっている。Discherらは、弾性率が0.1~40kPaのアクリルアミドゲル上で培養したhMSCが、基質の硬軟により異なる細胞種に分化誘導されることを示し、特に0.1~1kPaの軟質基質上で細胞は糸状足が伸びた形態をとり神経細胞に分化されることを報告した[2]。この研究が発端となり、様々な材料や構造の基質の細胞挙動への影響が調べられてきた。我々は、2013年度より、高い弾性率(1TPa)、導電率(10^6 S/cm)および極薄膜といった特異な特性を持つグラフェンを足場基質に応用する研究を進め、表面波励起マイクロ波プラズマCVD法によりPDMS(ポリジメチルシロキサン)上に形成したグラフェン膜の表面形態(フラット、クラックが存在、断片化している)がhMSCの増殖や形状変化(面積増大)に大きな影響を持つことを見出した。さらに、導電性のグラフェンは電気活性である神経細胞の突起の発芽・伸展に効果があること、導電性のカーボンナノチューブが胚性幹細胞の神経系細胞への分化を促進したこと、 π 電子雲が表面に存在するグラフェンは分化誘導タンパク質や低分子量化学物質の吸着に有利であることなどの興味ある報告が続々となされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、神経系疾患に対する細胞治療技術に資するための神経系細胞供給源として、ヒト間葉系幹細胞をより短時間で効率的に神経系細胞への分化誘導が可能な細胞足場用基質を提供することを全体構想とする。この中で、超高弾性率・導電率という特異な特性を持つグラフェンを付着させた軟質基質を伸展しグラフェンを微細なドメインに断片化させた「硬/軟ハイブリッド基質」を作製し、これを用いたヒト間葉系幹細胞の培養試験により、神経系細胞への分化誘導に対し、生化学因子を用いる手法の代替あるいはその効果を相乗的に高めることが可能な足場基質を設計することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、プラズマCVD法により成膜した高弾性率・導電率の高品質グラフェンを軟質材料となるPDMSに転写付着させ、この基質を伸展させることによりグラフェンを微細なドメインに断片化させた「硬/軟ハイブリッド基質」を作製する。そして、これらを足場として用いたhMSCの培養試験を行い、細胞の形態変化および神経系細胞への分化について、顕微鏡観察、蛍光染色法、免疫蛍光染色法などの評価により明らかにする。

4. 研究成果

(1)グラフェンを断片化させた「硬/軟ハイブリッド基質」を作製するにあたり、まず、足場となるPDMS上にグラフェンが存在することによる細胞の挙動変化について検証を行なった。

プラズマCVD法を用いて銅箔基板上にグラフェンを蒸着させ、これをPDMS(硬化剤10%)に貼り付け、過硫酸アンモニウムにて銅をエッチングすることで、グラフェン転写PDMS基板(G/PDMS)を作製した。また、グラフェン転写のないPDMS基板を比較のため準備した(PDMS)。作製した基板を足場としてhMSC(Lonza社:PT-2501)の培養実験を行った。培地には、標準増殖培地MSCGM(Lonza:PT-3001)および分化誘導培地(MSCGMにレチノイン酸(RA)30 μ M含)を使用し、CO₂インキュベータ(37 $^{\circ}$ C)で14日間まで培養した。培養した細胞は、DAPIで細胞核、ファロイジンでF-アクチンの染色を行った。

図1に、標準増殖培地(-RA)および分化誘導培地(+RA)にて培養したときの、DAPIの染色画像から計測した細胞核数(細胞数)の結果を示す。7日目と14日目また-RAと+RAの何れにおいてもG/PDMSの細胞数は

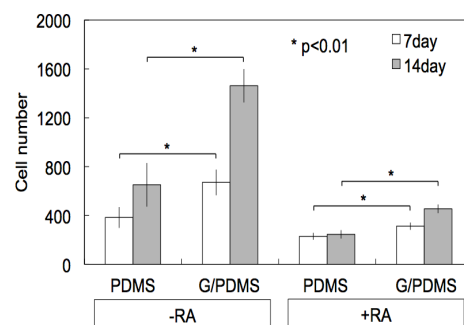


図1 細胞数計測結果

PDMS よりも多く、このことから、PDMS 上のグラフェンの存在が細胞の増殖に大きな効果をもつことが明らかになった。蛍光顕微鏡による観察にて取得した、染色した細胞核および F-アクチンの画像から ImageJ による画像解析を行い、細胞形態を評価した。F-アクチンは細胞骨格を反映しているため、染色された領域を細胞区画として（投影）面積および真円度を計測した。図 2 に、細胞 1 個あたりの (a) 面積および (b) 真円度（1 が真円で 0 に近づくにつれ形は細長くなる）を示す。G/PDMS 上の細胞の面積は、両培地（-RA と +RA）にて、PDMS 上の細胞よりも明らかに大きいことがわかる。真円度については、-RA では両者に違いはなく、+RA では G/PDMS が大きい。また、-RA と +RA を比較すると、+RA で培養した細胞の面積および真円度は、より大きくなった。以上のことから、グラフェンが PDMS 上に存在することにより、細胞はより伸展することがわかった。また、培地にレチノイン酸を添加すると、細胞の伸展度合いはさらに大きくなり、界面にグラフェンが存在するときは、より円形状に広がることが推測された。

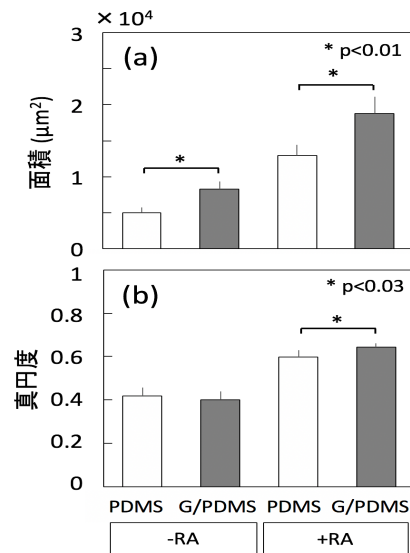


図 2 細胞形態評価結果

(2) グラフェンが PDMS 基質上に存在することにより細胞が大幅に増殖することが見出されたため、さらに異なる基質においてその効果を検証した。

(1) と同様の工程にて、グラフェン転写基板を作製した。基質には 2 種類の PDMS 基板（硬化剤割合 5%、10%）およびカバーガラス（glass）を用意し、それぞれ、Gr/PDMS5%、Gr/PDMS10% および Gr/glass とした。作製した各基板を細胞足場とし hMSC の培養試験を行った。比較としてグラフェン転写のない PDMS 基板（PDMS10%）および glass を用意した。標準増殖培地（MSCGM）を培地とし、CO₂ インキュベーター（37°C）内で 8 日間培養した。培養した細胞は、DAPI にて細胞核を染色した。

図 3 に、各基板上で培養した後の細胞数計測結果を示す。PDMS および glass に対し、Gr/PDMS および Gr/glass では大幅な細胞数の増加が見られた。このことから、弾性率や材質の異なる基板においても、表面のグラフェンが hMSC の増殖に大きく寄与することがわかった。なお、グラフェンが転写された 3 種類の基板での細胞数には有意差はなく、基板の弾性率や材質の細胞増殖への影響は小さいと考えられる。

グラフェンによる増殖の促進効果には、細胞の基板への接着性向上が起因しており、これには細胞接着に先行して起こるタンパク質のグラフェンへの吸着が関与していると考えられ、グラフェン構造中の π 電子や付与された官能基、さらにグラフェンの結晶粒界や欠陥部との水素結合を介したタンパク質の吸着などのメカニズムの究明が今後の課題として残された。

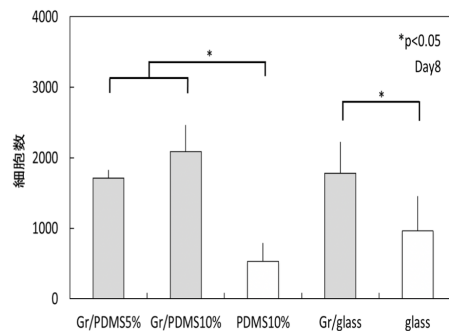


図 3 細胞数計測結果

(3) グラフェンを断片化させた「硬／軟ハイブリッド基質」を作製し、この構造による神経系細胞への分化誘導効果について免疫蛍光染色法により検証した。

グラフェンが微細なドメインに断片化して付着した PDMS 基板を作製するために、グラフェンが転写された PDMS に直交 2 方向に引張歪みを印加する手法を試みた。その結果、図 4 に示す形状解析レーザー顕微鏡による表面観察画像（a: 引張無、b-d: 引張有）が示すように、数～20 μm サイズのウロコ状のグラフェン断片が並んだ表面構造を創り出すことができた。ウロコ形状（b の Y 部）およびウロコ-ウロコ間（b の X 部）をラマン分光分析した結果、ウロコ形状から、グラフェンに起因する G バンド（1600cm⁻¹ 付近）と 2D バンド（2700cm⁻¹ 付近）が観察された。引張歪により、グラフェンは、成膜時の多結晶性に起因するドメイン境界で分断されたと考えられる。

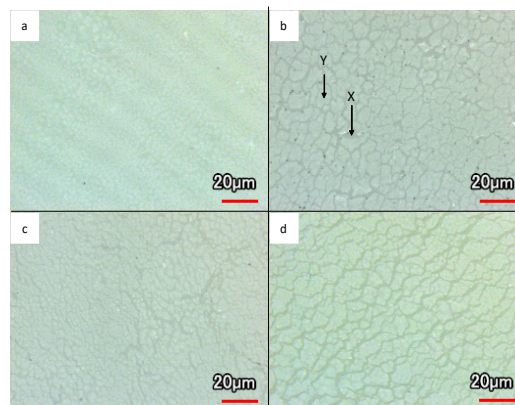


図 4 断片化グラフェン表面観察画像

このグラフェンを断片化させた「硬／軟ハイブリッド基質」を用い、hMSC の培養試験を実施した。比較として、断片化されていないグラフェン付着 PDMS 基板、グラフェン転写のない PDMS 基板 (PDMS10%) および glass を用意した。培地には、標準増殖培地 MSCGM および分化誘導培地 (MSCGM にレチノイン酸 (RA) 30 μ M 含) を使用し、CO₂ インキュベータ (37°C) で 11 日間まで培養した。培養した細胞は、免疫蛍光染色にて神経系細胞マーカーとなる MAP2、Tuj1、GFAP および nestin の発現について調査された。その結果、ニューロンマーカーである Tuj1 の発現が観察されたものの、グラフェンの有無、グラフェン断片化有無、培地中 RA 有無および基板の違いに対し有意な差が確認されず、PDMS 上に存在するグラフェンまたその断片化が神経系細胞への分化誘導に効果を示す明らかなデータを得ることはできなかった。

<参考文献>

- [1] Woodbury, et.al., J. Neurosci. Res., 2000.
- [2] Engler, et.al., Cell, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ban Masahito, Tobe Satoshi, Takeuchi Louie	4. 巻 90
2. 論文標題 Effects of diamond-like carbon thin film and wrinkle microstructure on cell proliferation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diamond and Related Materials	6. 最初と最後の頁 194 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.10.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahito Ban, Yuuya Kogi, Taichi Hirose	4. 巻 249
2. 論文標題 Fabrication of Arrayed Microwells with Wrinkle Microstructure by Ink-jet and Diamond-like Carbon Thin Film Deposition Process	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering B	6. 最初と最後の頁 114422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.mseb.2019.114422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lingyun Lyu, Kazuhiro Kirihara, Yuki Okigawa, Masataka Hasegawa, Wuxiao Ding, Ying Wang, Masakazu Mukaida, Ying Zhou, Qingshuo Wei	4. 巻 78
2. 論文標題 Extracting Carrier Mobility Using a Photoinduced Charge Transfer Reaction: From conducting polymers to nanocarbon materials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Electronics	6. 最初と最後の頁 105615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.orgel.2020.105615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 石原正統、水谷亘、山田貴壽、沖川侑揮、長谷川雅考	4. 巻 71
2. 論文標題 グラフェン	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 表面技術	6. 最初と最後の頁 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Masahito Ban, Masatou Ishihara, Yuki Okigawa, Masataka Hasegawa
2. 発表標題 Stem Cell Behavior Control by Surface Wave Plasma CVD Graphene Attached on PDMS
3. 学会等名 International Conference on Diamond and Carbon Materials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴雅人、戸辺悟司
2. 発表標題 DLC薄膜成膜による微細凹凸構造のヒト間葉系幹細胞の挙動への効果
3. 学会等名 表面技術協会第138回講演大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴雅人、下田亮太、石原正統、沖川侑揮、長谷川雅考
2. 発表標題 CVDグラフェン転写PDMS基板によるヒト間葉系幹細胞の培養
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴雅人、竹上優
2. 発表標題 DLC成膜微細凹凸構造によるヒト間葉系幹細胞の分化
3. 学会等名 表面技術協会第139回講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田亮太、石原正統、沖川侑揮、長谷川雅考、伴雅人
2. 発表標題 CVDグラフェン転写PDMS基板によるヒト間葉系幹細胞の分化
3. 学会等名 表面技術協会第139回講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹上優、伴雅人
2. 発表標題 パターンニング成膜されたDLC薄膜によるヒト間葉系幹細胞の挙動制御
3. 学会等名 表面技術協会第139回講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴雅人
2. 発表標題 カーボン系薄膜を用いた細胞足場の開発
3. 学会等名 表面技術協会関東支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahito Ban, Louie Takeuchi, Ryuki Arayama
2. 発表標題 Effect of diamond-like carbon thin film and wrinkle microstructure on cellular behavior
3. 学会等名 28th European Conference on Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹内瑠維、戸辺悟司、伴雅人
2. 発表標題 DLC薄膜および微細凹凸構造の培養細胞への効果 その2
3. 学会等名 表面技術協会第136回講演大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伴雅人、吉澤利哉、石原正統、沖川侑揮、長谷川雅考
2. 発表標題 CVDグラフェン転写基板によるヒト間葉系幹細胞の培養評価
3. 学会等名 表面技術協会第137回講演大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴雅人、戸辺悟司、竹内瑠維
2. 発表標題 DLC薄膜成膜による微細凹凸構造の寸法と細胞増殖の関係
3. 学会等名 表面技術協会第137回講演大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖川侑揮、加藤隆一、山田貴壽、石原正統、長谷川雅考
2. 発表標題 プラズマ処理を用いたグラフェン合成におけるアウトガスの影響
3. 学会等名 グラフェン・酸化グラフェン合同シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahito Ban, Ryouta Shimoda, Masatou Ishihara, Yuki Okigawa
2. 発表標題 Behaviors of Mesenchymal Stem Cells on Graphene Attached Soft Material Structure
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress (TERMIS-AP + ABMC7 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴雅人、竹上優
2. 発表標題 DLC薄膜成膜微細凹凸構造を用いた間葉系幹細胞の培養における効果
3. 学会等名 第39回化学とマイクロ・ナノシステム研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴雅人、陳静
2. 発表標題 DLC成膜微細凹凸構造による神経芽細胞腫の培養
3. 学会等名 表面技術協会第140回講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田亮太、石原正統、沖川侑揮、伴 雅人
2. 発表標題 断片化したCVDグラフェン転写PDMS基板によるヒト間葉系幹細胞の培養評価
3. 学会等名 表面技術協会第140回講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴 雅人
2. 発表標題 ダイヤモンドライクカーボン (DLC) 薄膜の細胞足場への応用
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田亮太、石原正統、沖川侑揮、伴 雅人
2. 発表標題 グラフェン付着ソフトマテリアルの細胞増殖への効果
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原正統、沖川侑揮、伴雅人、長谷川雅考
2. 発表標題 高品質プラズマCVDグラフェン
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田亮太、石原正統、沖川侑揮、伴雅人
2. 発表標題 CVDグラフェンによる ヒト間葉系幹細胞の増殖
3. 学会等名 グラフェン・酸化グラフェン合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴雅人、下田亮太
2. 発表標題 DLC薄膜を用いたナノプラスチックの神経細胞毒性評価
3. 学会等名 表面技術協会第141回講演大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下田亮太、石原正統、沖川侑揮、伴雅人
2. 発表標題 カーボン系薄膜パターンニング基板の作製
3. 学会等名 表面技術協会第141回講演大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 J. Kihara, M. Ishihara, Y. Okigawa, S. Koura
2. 発表標題 Thermoelectric Characteristics of Graphene for Recovery of Low Temperature Waste Heat
3. 学会等名 Thermoelectric Characteristic (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Okigawa, T. Yamada, M. Hasegawa, K. Watanabe, T. Taniguchi
2. 発表標題 Relationship between Mobility and Raman Spectra for Plasma CVD Graphene on HTHP h-BN
3. 学会等名 Recent Progress in Graphene and Two-dimensional Materials Research Conference (RPGR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Ishihara, M. Hasegawa
2. 発表標題 Dry Transfer of Chemical Vapor Deposition Graphene onto Silicon Wafers Treated by Silan Coupling Agents
3. 学会等名 European Graphene Forum 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖川侑揮、谷口尚、渡邊賢司、長谷川雅考、山田貴壽
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたCVDグラフェンの移動度散乱機構の解明
3. 学会等名 第33回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原正統、長谷川雅考
2. 発表標題 アミノシランで処理したシリコンウェハへのCVDグラフェンの転写と評価
3. 学会等名 表面技術協会第140回講演大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吾郷浩樹、齋藤理一郎、Jari Kinaret、Vladimir Fal'ko、Zhongfan Liu、Young Hee Lee、黒部篤、長谷川雅考、沖川侑揮、山田貴壽、他多数	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 558
3. 書名 グラフェンから広がる二次元物質の新技术と応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	冲川 侑揮 (Okigawa Yuki) (50635315)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究員 (82626)	
研究分担者	石原 正統 (Ishihara Masatou) (70356450)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	