

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20220010

研究課題名（和文）

次世代幹細胞治療のための生物機能改変技術の開発

研究課題名（英文）

Development of Technology to Manipulate the Biological Functions of Stem Cells for Cell Therapy of Next Generation

研究代表者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

研究成果の概要（和文）：

細胞増殖因子とプラスミドDNA・カチオン化ゼラチンコンプレックスを加えたセラミクス粉末を力学補強ゼラチンスポンジ内で骨髄由来幹細胞の遺伝子導入培養を行ったところ、通常の遺伝子導入に比較して、より効率の高い細胞の遺伝子改変が可能となった。さらに、培養液循環型のバイオリアクタの利用により、さらに改変効率が高まった。この方法はsmall interfering RNAにも適用でき、幹細胞の生物機能改変のための有用な技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：

A cationized gelatin of gene transfection was prepared by chemical introducing spermine to gelatin. Gelatin sponge scaffolds mechanically reinforced by ceramic granules incorporation were combined with growth factors and a complex of cationized gelatin and plasmid DNA. Bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) were cultured for gene transfection in the sponge prepared. Comparing with the conventional gene transfection, a higher efficiency of MSC genetically engineering was observed. Upon combining with a bioreactor of culture medium circulating system, the engineering efficiency was further improved. This culture technology is applicable for small interfering DNA, and demonstrated to be a promising engineering technology of cell bioactivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	29,400,000	8,820,000	38,220,000
平成 21 年度	36,000,000	10,800,000	46,800,000
平成 22 年度	22,400,000	6,720,000	29,120,000
平成 23 年度	20,800,000	6,240,000	27,040,000
平成 24 年度	20,800,000	6,240,000	27,040,000
総計	129,400,000	38,820,000	168,220,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

再建外科治療と臓器移植の2大先端医療に限界が見えてきている状況の中で、細胞の増殖分化能力を最大限に活用、生体のもつ自然治癒力を介して、自己の生体組織、臓器の再生修復を促進する試みがある。この再生医療が実現できれば、人工臓器も免疫抑制剤も用いない第3の治療法となり、入院期間の短縮による医療費削減、従来の治療法の適応拡大や難治性疾患治療への道も開かれ、その経済的、社会的な意義が大きいことは疑いない。再生医療には2つのアプローチがある。1つ目は、細胞移植による生体組織の再生誘導である。2つ目が、バイオマテリアルと医工学技術を利用して、細胞の増殖分化を促し、生体組織の再生誘導を起こす生体組織工学アプローチである。この2つのアプローチは、これまで別々に行われてきたが、これらをうまく組み合わせることで、より治療効果が高まることが期待される。

幹細胞およびそれに関連した基礎生物医学研究が進歩し、すでに、幹細胞移植による骨再生や血管新生治療が行われている。しかし、体内に移植された細胞の生存率や生物機能の発現効率が低く、必ずしも期待通りの治療効率が得られているとはいえない。この現状を改善し、細胞移植の治療効率を上げるためには、移植細胞の再生誘導能力を高めることが必要である。このためには2つの方法論が考えられる。1つ目は、移植部位に血管を作り、細胞への栄養、酸素を供給、細胞の移植部位の状態をよくすることである。2つ目の方法は、細胞自身の生物機能を強化するアプローチである。移植のための幹細胞の研究が進み、いかに優れた細胞が得られたとして

も、移植後の細胞の治療能力を高めるためのしくみを考え、工夫しなければ、幹細胞移植治療の効果は上がらず、再生医療はただの絵に書いた餅で終わってしまう。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、移植に用いる幹細胞の生物機能を高めるための生体組織工学技術の開発である。本研究では、幹細胞へ遺伝子物質を導入する材料と培養技術を開発するとともに、幹細胞の生物機能の改変、増強について、*in vitro* および *in vivo* 動物実験で評価する。幹細胞に対する遺伝子導入は、生物医学研究分野で盛んに行われているが、そのほとんどがウイルスを用いた方法である。ウイルスを用いる場合には、得られた研究成果の臨床応用へのバリアが高く、また、ウイルスの利用のための特別な施設が必要となる。そこで、本研究では、幹細胞移植による再生医療を目的とした幹細胞の機能増強のためのウイルスを用いない幹細胞への物質の導入技術を開発する。非ウイルス性の細胞内導入材料のデザイン、合成に関する研究とともに、導入効率に大きく影響を与えると考えられる培養方法、培養技術についての検討をする。本研究の独創的な点は、導入材料と導入のための培養技術との組み合わせによる効率的な幹細胞の機能改変である。細胞の状態が悪ければ、その機能改変、増強はうまくいかない。そこで、細胞の状態に大きく影響を与える細胞培養基材（例えば、基材の化学組成や力学的性質など）、あるいは細胞への栄養、酸素の供給にかかわる培養方法の改良（例えば、培養条件の変化やバイオリアクタの利用）などを積極的に取り入れる。これに

よって、良い培養状態の下で、幹細胞に遺伝子を導入し、その生物機能の増強を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究は、遺伝子導入のための非ウイルス性材料のデザインと作製、遺伝子導入培養のための幹細胞培養基材、培養方法のデザインと創製、幹細胞の機能改変の評価、そして機能改変幹細胞を用いた再生誘導治療効果の動物実験による評価の4つの柱からなっている。

田畑は、細胞の培養基材、培養技術に関するこれまでの研究の多くの積み重ねがあり、基材のデザインと作製を担当する。山本は、薬や遺伝子のドラッグデリバリーシステム(DDS)とその再生医療への応用の研究をこれまでに精力的に進めてきている。遺伝子導入のための非ウイルス性材料のデザインと合成、さらにその物理化学的な評価を担当する。

梅澤は組織幹細胞の日本の第1人者であり、幹細胞の基礎生物医学研究およびそれらの細胞の臨床応用に対しても豊富な経験と知識をもっている。未分化骨髄間葉系幹細胞の機能改変の評価を行う。出沢は、骨髄由来間葉系幹細胞の神経系細胞および筋肉細胞への分化技術に対して優れた業績をもっている。動物モデルを用いて、機能改変細胞を用いた再生治療効果を調べる。

(1) 遺伝子導入のための非ウイルス性材料として、プルランやデキストランなどの多糖類およびゼラチンヘスペルミンなどのジアミン化合物を反応させることによって、カチオン化多糖およびカチオン化ゼラチンを作製する。カチオン化多糖およびカチオン化ゼラチンとプラスミドDNAとのコンプレックスを含む培養液中で、骨髄由来の未分化間葉系幹細胞を培養、遺伝子発現活性を評価する。用いる遺伝子はルシフェラーゼのプラスミド

DNAである。多糖およびゼラチンの分子量、アミン化合物の導入率などが遺伝子発現レベルに与える影響について検討する。

(2) ゼラチンと $\beta$ -トリカルシウムリン酸( $\beta$ TCP)粉末との複合体から3次元のゼラチンスポンジを作製する。 $\beta$ TCP粉末とゼラチンとの混合比の足場スポンジ材料の力学特性に与える影響について評価する。

(3) (1) で作製したコンプレックスとともに細胞接着物質を組み込んで作製した3次元足場スポンジ内へ未分化間葉系幹細胞を播種、培養、遺伝子発現を調べる。この時、スポンジの性質が遺伝子発現パターンに与える影響について調べる。

(4) 3次元スポンジにコンプレックスと細胞接着因子を組み込んだ後、subfection法による遺伝子導入を調べる。幹細胞への遺伝子導入、発現に与える培養条件の最適化を行う。振とう、旋回、培養液の循環型の培養装置(バイオリアクタ)を用いた培養を行う。放射性同位体を用いて、プラスミドDNAの幹細胞内への取り組み、細胞内動態について解析する。また、細胞の状態について生化学的、分子生物学的に評価する。

(5) 骨形成因子(BMP)などの骨軟骨分化に関係する細胞増殖因子のプラスミドDNAを用いて、(3)、(4)と同様の検討を行う。加えて、プラスミドDNA導入による細胞の骨、軟骨分化を生化学的に評価する。骨分化は、アルカ

リホスホターゼ活性、カルシウム沈着、オステオカルシン活性など、軟骨分化は、硫酸化多糖やコラーゲンタイプIIの分泌と産生などについて、それぞれ生化学的に調べる。

### 4. 研究成果

(1) 遺伝子導入のための非ウイルス性材料として、プルランやデキストランなどの多糖類ヘスペルミンなどのジアミン化合物を反応さ

せることによって、カチオン化多糖を作製した。カチオン化多糖とプラスミドDNAとを水溶液中でコンプレックスを形成させ、それを培養液に加えた後、通常の培養プラスチックシャーレで、骨髄中に存在する未分化骨髄間葉系幹細胞とともに培養、遺伝子発現活性を評価した。市販の非ウイルス性遺伝子導入試薬であるカチオン化リポソームやポリエチレンジオキサンに比較して、細胞毒性が低いことがわかった。

次に、有意に高い遺伝子発現が認められ、かつ得られた非ウイルス性遺伝子導入試薬であるカチオン化多糖とGFPのプラスミドDNAとからなるコンプレックスによる細胞への遺伝子導入に大きく影響すると考えられる培養方法について検討した。その1つ目として、コンプレックスとともに細胞接着物質であるプロネクチンを培養プラスチックシャーレ上にコーティングした。その後、その上で幹細胞を培養、遺伝子発現を調べた。この遺伝子導入法(subfection法)は、細胞培養液にコンプレックスを加える通常の遺伝子導入法とは異なり、細胞は常に、コンプレックスと接触した状態で培養されるため、コンプレックスの細胞内への取り込みと遺伝子発現効率は高まる。GFPプラスミドDNAとカチオン化プルランとのコンプレックスをコーティングした培養皿上で、ラット骨髄由来の未分化間葉系幹細胞(MSC)を遺伝子導入培養したところ、通常の遺伝子導入法に比較して、有意に高い遺伝子発現レベルが認められた。また、この際、細胞の毒性も有意に低減された。加えて、遺伝子発現期間の延長が認められた。これはMSCの近傍にコンプレックスが存在することで、プラスミドDNAの細胞内取り込み効率が上昇したこと、プラスミドDNAの細胞への供給がより効率よく、さらにより長期に可能になったことが理由として考えられる。このsubfection法はオリジナルな技術を用いてサルMSCの神経細胞への分化誘導に成功した。

これによって、細胞の生存率を下げることなく、サルMSCのドーパミン分泌神経細胞への分化誘導が可能となった。この研究成果は、非ウイルス性遺伝子導入試薬を用いた幹細胞の神経分化誘導についての世界で初めての報告であり、その学術的なインパクトはきわめて大きい。

(2) 次に、細胞足場を2次元から3次元に変え、より生体内に近い状態で幹細胞への遺伝子導入を目指した。生体適合性があり、分解吸収性のゼラチンから3次元のスポンジを作製した。足場スポンジ材料の力学特性が細胞の増殖、その生物機能に影響を与えることが知られているため、作製されたスポンジの力学特性を評価した。ゼラチンのみからなるスポンジでは、力学強度が低く、遺伝子導入培養中にスポンジが変形、スポンジ内部の細胞が死滅してしまう。そこで、スポンジに繊維あるいはセラミックス粉末を組み込んだ。この工夫によってスポンジの力学物性は改善され、遺伝子導入培養時においても、スポンジの変形が抑制され、細胞の生存率が高まることがわかった。この繊維を組み込んで力学補強したゼラチンスポンジに、GFPプラスミドDNAとカチオン化多糖コンプレックスを組み入れ、遺伝子導入可能な新規の3次元足場をデザインした。遺伝子導入実験を行った結果、2次元に比較して、3次元スポンジ足場を用いることで、ラットMSCへの遺伝子導入効率が高まり、かつ遺伝子発現が増強されることがわかった。また、この際、培養方法がその遺伝子発現に大きく影響を与えた。遺伝子導入培養を静置で行ったところ、スポンジ内部の細胞は死滅し、遺伝子発現が見られなかった。これに対して、MSCを旋回および振とう培養することにより、細胞の生存率と遺伝子発現効率は有意に改善された。

次に、コンプレックスをスポンジに含浸した後、熱処理を行った。この処理によってコンプレックスがスポンジ材料のゼラチンとの間で

化学結合が形成され、スポンジからのコンプレックスの放出、細胞内への取り組み、遺伝子発現が変化する。熱処理時間の増大とともにコンプレックス放出時間が延長した。また、それにともない遺伝子発現期間の延長が見られた。骨形成因子 (BMP) -2のプラスミドDNAを用いて、同様の検討を始めた。その結果、期待通り、BMP-2プラスミドDNAコンプレックスと3次元スポンジを組み合わせ、ラットMSCを培養することにより、MSCの骨や軟骨分化誘導を実現できることがわかった。

さらに、遺伝子導入による幹細胞の生物機能改変のための新規技術として、プラスミドDNAの細胞内徐放技術を考案した。ゼラチンにエチレンジアシンを化学導入することでカチオン化ゼラチンを作製した。このカチオン化ゼラチンからなる直径数百ナノメートルのカチオン化ゼラチンハイドロゲルナノ粒子を調製した。このナノ粒子にプラスミドDNAを含浸させた後、ラットMSCと培養した。その結果、ナノ粒子は細胞内に取り込まれ、ナノ粒子の分解とともにプラスミドDNAが細胞内で徐放された。ナノ微粒粒子作製時におけるカチオン化ゼラチンの架橋条件によってナノ粒子の分解性は変化し、ナノ粒子の分解がナノ粒子からのプラスミドの徐放性をコントロールした。加えて、プラスミドDNAの細胞内徐放期間の延長とともに、遺伝子発現期間は延長した。この細胞内徐放技術によりsmall interfering RNA (siRNA)の生物機能発現レベルを高めるとともに、発現期間をコントロールすることも可能となった。

#### 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 15 件)

- ① Ishikawa H, Nakamura Y, Jo J, Tabata Y. Gelatin nanospheres incorporating siRNA for controlled

intracellular release. *Biomaterials*. **33(35):9097-104** (2012) 査読 : 有、  
10.1016/j.biomaterials.2012.80.032

- ② Kido Y, Jo J, Tabata Y. A gene transfection for rat mesenchymal stromal cells in biodegradable gelatin scaffolds containing cationized polysaccharides. *Biomaterials*, **32(3) 919-25(2011)** 査読 : 有、  
10.1016/j.biomaterials.2010.09.056
- ③ Matsuse D, Kitada M, Ogura F, Wakao S, Kohama M, Kira J, Tabata Y, Dezawa M. Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and fibroblast growth factor (bFGF) releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. **17(15-16):1993-2004(2011)** 査読 : 有、  
10.1089/ten.TEA2010.0585
- ④ Nagane K, Jo J, Tabata Y. Promoted adipogenesis of rat mesenchymal stem cells by transfection of small interfering RNA complexed with a cationized dextran. *Tissue Engineering*, **16(1) 21-31(2010)** 査読 : 有、  
10.1089/ten.TEA2009.0170
- ⑤ Jo J, Okazaki A, Nagane K, Yamamoto M, Tabata Y. Preparation of cationized polysaccharides as gene transfection carrier for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Sciences Polym Eds*, **21(2) 185-204(2010)** 査読 : 有、  
10.1163/156856209X415495
- ⑥ Nagane K, Kitada, M, Wakao S, Dezawa M, Tabata Y. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A*, **15(7) 1655-65(2009)** 査読 : 有、  
10.1089/ten.tea2008.0453

[学会発表] (計 31 件)

- ① 上田真澄、田畑泰彦 : 細胞への遺伝子導入に与える培養基材の影響. 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6.12-14 横浜)
- ② 石川英史、城潤一郎、田畑泰彦 : コアセルベーション法による siRNA 含有ナノ粒子の作製. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 (2011.6.9-10 東京)
- ③ Tabata Y. Biomaterial technology to

manipulate stem cells for regenerative medicine and therapy. TERMIS-AP 2010 (2010.9.15-17 Sydney Australia)

- ④ Jo J, Nagane K, Kido Y, and Tabata Y. Promoted adipogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells by transfection of small interfering RNA complexed with a cationized dextran. 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (2010.7.10-14 Oregon USA)
- ⑤ 木戸祐一郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場を利用した組織幹細胞の遺伝子改変. 第31回日本バイオマテリアル学会大会 (2009.11.16-17 京都)
- ⑥ Dezawa M: Efficient induction system of neural precursor cells and dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells. Academy for Multidisciplinary Neurotraumatology (AMN) The Hong Kong Neurosurgery Society (HKNS) Conjoint Congress (2009.11.14 新界 (香港))
- ⑦ 木戸祐一郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場内の幹細胞への新規遺伝子導入法の開発. 第25回日本DDS学会 (2009.7.3-4 東京)
- ⑧ 山本雅哉, 田畑泰彦: 生体シグナル因子を組み込んだバイオマテリアルによる3次元組織構築. 第8回日本再生医療学会 (2009.3.5-6 東京)

[図書] (計3件)

- ① 城潤一郎, 田畑泰彦: 第2編: 再生医療に必要な“技術”とは 第4章 細胞の遺伝子改変技術. ものづくり技術からみる再生医療 - 細胞研究・創薬・治療 -. 2011, 125-132
- ② 城潤一郎, 田畑泰彦. 遺伝子医学 MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術. 株式会社メディカルドゥ, 2009, 369
- ③ 城潤一郎, 田畑泰彦, 株式会社メディカルドゥ, 大阪, 遺伝子導入法「進みつつける細胞移植治療の実際(上巻) 遺伝子医学 MOOK 別冊 再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解」, 2008, 218-225

[その他]

新聞掲載 (計16件)  
幹細胞 骨→脂肪へ路線変更. 産経新聞 2010.1.31

パンフレット (計3件)

ーよくわかる再生医療に必要なものづくり

ー再生治療と細胞研究を支えるものづくりガイドブック. 2011.2月発行. 4000部

ーよくわかる再生医療に必要なものづくりー再生治療と細胞研究を支えるものづくりガイドブック. 2010.6月発行. 4000部

公開行事 (計14件)

- ① 田畑泰彦: モノづくり技術から見た再生医療ビジネス - 再生治療と再生研究の違い -. ー専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP Part V - (2012.9.26 京都)
- ② 田畑泰彦: モノづくり技術が支える再生医療の実用化 - 細胞研究, 創薬研究, 治療 -, ー専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP Part IV (2011.9.21 京都)
- ③ 田畑泰彦: モノづくり技術からみた再生医療. バイオの都・関西セミナー ~ 再生医療の未来を拓く関西 ~ (2010.12.9 大阪)
- ④ 田畑泰彦: 再生医療の基本概念と再生医療分野の研究開発とモノづくり技術との関係. 再生医療を支えるものづくりシンポジウム. (2010.8.31 京都) 300人

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号: 50211371

(2) 研究分担者

山本 雅哉 (YAMAMOTO MASYA)  
京都大学・再生医科学研究所・准教授  
研究者番号: 10332735

出沢 真理 (DEZAWA MARI)  
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 50272323

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIKO)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・部長  
研究者番号: 70213486

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: