

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09994

研究課題名（和文）間葉系幹細胞のStemnessを維持する代謝系制御培養基板の開発

研究課題名（英文）Development of Metabolic System Controlled Culture Substrates to Maintain Stemness of Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

平田 伊佐雄（Hirata, Isao）

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：40346507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、代謝系制御機能を有するbFGFやCripto-1等のサイトカインを培養基板表面に固定化することを目指す。

本研究において、基板に固定するタンパクが大量に必要となる。キメラタンパクの回収量を増大される発現・精製条件が確定することができた。また、タンパク構造予測を行うAlphaFold2を導入することで、CDスペクトル測定を元にした発現タンパクの二次構造の予想精度が向上し、また、タンパクの発現を行う前に、設計したキメラタンパクとレセプターとの結合可能性を事前に予測することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝系制御機能を有するキメラタンパクの発現・回収量を十分に行える合成条件を確定できた。これらのキメラタンパク質は、基板上に容易に固定することが可能であり、発現量も十分であることから本研究だけでなくバイオマテリアル表面へのサイトカイン固定化など、大量のサイトカインが必要な研究に役立つことが期待できる。また、タンパク質構造予測にAlphaFold2を用いることで測定結果と比較することで発現タンパクの二次構造の精度が上がった。また、発現タンパクとレセプターとの結合構造の予測を行うことで、発現前にキメラタンパクのレセプター結合の検討も可能となった。

研究成果の概要（英文）：This study aims to immobilize cytokines such as bFGF and Cripto-1, which have metabolic system regulatory functions, on the surface of culture substrates.

In this study, a large amount of proteins to be immobilized on the substrate is required. We were able to determine the expression and purification conditions that will increase the recovery of chimeric proteins. In addition, the introduction of AlphaFold2, which predicts protein structure, improved the accuracy of predicting the secondary structure of the expressed protein based on CD spectral measurements, and also allowed us to predict in advance the binding potential of the designed chimeric protein to the receptor before the protein is expressed.

研究分野：生体材料学

キーワード：タンパク発現 間葉系幹細胞 幹細胞性 代謝

1. 研究開始当初の背景

現在、多能性幹細胞(iPS)や胚性幹細胞(ES)、造血幹細胞(HSC)そして間葉系幹細胞(MSC)をはじめとする幹細胞を用いた再生医療が注目を集めている。これらの幹細胞を用いて肝硬変(肝細胞)・糖尿病(膵内分泌細胞)・歯周病(顎骨・歯槽骨)・変形性関節症(軟骨)・脊髄損傷(中枢神経細胞)などの難治性疾患の治療を目指す研究が全世界で行われている。その中でも、患者自身の体組織から採取・分離が可能なMSCは、骨・軟骨・脂肪等への分化能が知られており、ES細胞のような倫理的な問題がなく、また、iPS細胞のような遺伝子導入や特別な処理が不要なため、最も再生医療の事業化に近い細胞である。

MSCは骨髄・骨膜・口腔組織などから容易に取得可能であり、なおかつ未分化のMSCはそのまま顎骨・歯槽骨などの組織再生に用いることができる。しかしながら、骨組織再生には大量のMSCが必要となるが、取得した組織細胞中のMSCは1万~10万分の1と非常に少ない。また、これら少量のMSCを大量に培養するにあたり、増殖細胞の品質維持は極めて需要である。そのため、MSCの細胞品質を維持しつつ短期間で大量にかつ培養する技術が求められている。MSCは標準的な培養方法で簡易に取り扱える細胞であるが、培養中に細胞老化を起こしやすく継代毎に増殖能及び分化能が劣化しやすい。

近年、幹細胞のStemnessの維持および細胞老化の抑制における代謝系調整・制御の重要性が多く報告されている。MSCにおいてはbFGFやCripto-1などのサイトカインがMSCの代謝系を制御することで、細胞増殖能や細胞品質の維持が行われていることが報告されている。

これらのことから、MSCの細胞品質を維持しつつ短期間で大量に培養する技術の確立のためには、代謝系の制御が必要であると考えられる。

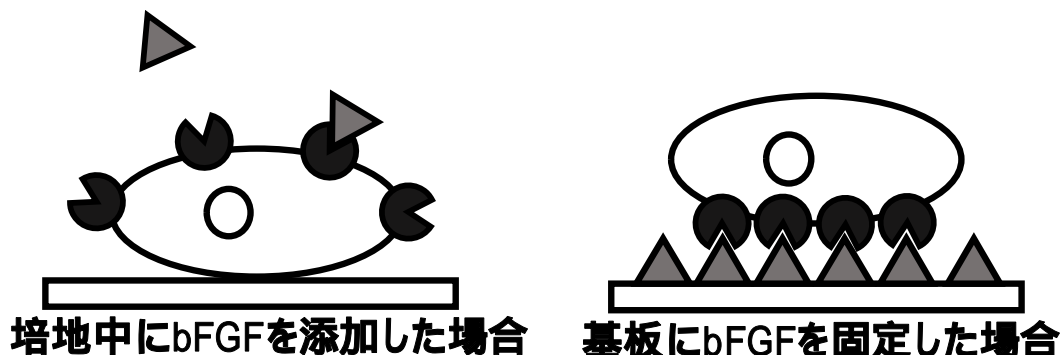
2. 研究の目的

本研究は、近年の生化学・分子生物学的な視点を踏まえた上で、表面改質による代謝系制御機能を付与したMSC培養基板、すなわちbFGFやCripto-1等のサイトカインを培地ではなく培養基板表面に固定化することでMSCの高品質大量培養に最適化された基板の設計・開発を目指す。申請者は培地では無く基板表面に固定化した方がサイトカインの効果を効率よくMSCに与えることができると想定している。

MSC培養においてbFGFの培地添加は、細胞増殖能の向上を促すのでよく行われている。しかしながら、培地中でのbFGF濃度は低く、そのため細胞膜近傍でのbFGF濃度は微量であり、細胞表面のbFGFレセプター(bFGFR)との結合によるbFGF/bFGFR複合体形成量は少ない。これに対し、bFGFを基板表面に多く固定化することにより、細胞膜近傍にbFGFを極めて高い濃度で曝露することが可能となり、bFGF/bFGFR複合体形成量の大幅な上昇、そしてMSCの増殖能の向上が期待できる。

また、代謝的な視点においても幹細胞のStemness維持には嫌気性解糖系の活性化が重要であること、具体的にはbFGF/bFGFRやCripto-1/GRP78等のサイトカイン/レセプター複合体形成によるMSCの解糖系の活性化及び細胞内代謝生成物である活性酸素種(ROS)の減少がStemness維持に重要であることが報告されている。ミトコンドリアは酸素を利用することでATPを解糖系よりも効率よく生産するが、同時に大量のROSを発生させる。HSCやMSCにとって、ROSが過剰になると過増殖・分化異常・細胞老化を引き起こし、Stemnessおよび増殖能が低下する。よって、これらのサイトカインを基板表面に多く固定化することでサイトカイン/レセプター複合体形成量の大幅な上昇によるMSCのStemness維持が期待できる。

MSCを用いた再生医療においてStemnessの維持は極めて重要な課題である。本研究の代謝系制御培養基板はこの課題を改善するだけでなく、他の再生医療に用いる幹細胞培養系での基礎研究・臨床応用への展開が期待できる。



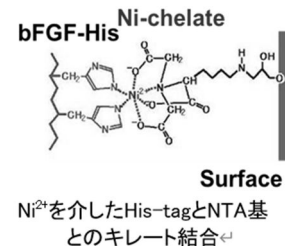
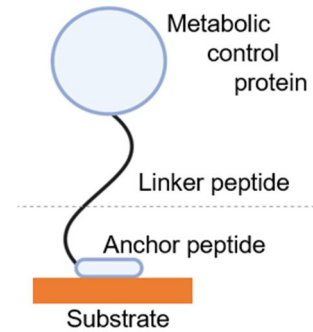
3. 研究の方法

・ サイトカインをベースとしたキメラタンパクの設計

ベースとなるサイトカインの DNA 配列は、Cripto-1 においては NM_003212, NP_003203 を参照のもと、Leu31-Thr172 のペプチド配列を Cripto-1 とした。当初、Human Genomic Library より Cripto-1 発現 DNA 配列の取得を試みたが得ることができなかつたため、人工遺伝子合成サービスを利用することとした。末端部に制限酵素配列とフラップ・HisTag・ペプチドリンカー・ストップコドンを導入した FlapN-BamHI-Cripto-(GGGGS)3-HisTag-(Stop)-XhoI-FlapC および FlapN-BamHI-Cripto-(GGGGS)3-HisTag-(Stop)-XhoI-FlapC を設計した。また、これらの DNA 配列の N 末端に GST タグを導入するために GSTTag-HRV-BamHI を設計した。

bFGF においては NM_002006, NP_001997 を参照のもと、Met134-Ser288 のペプチド配列を bFGF とし、末端部に制限酵素配列とフラップ・HisTag・ペプチドリンカー・ストップコドンを導入した FlapN-NdeI-HisTag-(GGGGS)3-bFGF-(GGGGS)3-HisTag-(Stop)-XhoI-FlapC を設計した。

設計した DNA 配列は Strings DNA Fragments (Thermofisher) にて合成を行った。



・ ベクターの検討

pET22b+, pGEX-6P-1, pColdI をタンパク発現のベクターとして検討した。

ベクターに設計した DNA 配列を導入する方法として、制限酵素法を用いる予定であったが、導入効率等に難を生じたため、最終的にはシームレスクロニング法を用いた。

Inverse PCR にて、pET22b+および pColdI のリニアベクターを作成および上記の設計した DNA 配列から、Extension PCR により Overlap を導入した DNA を合成し、In-Fusion をもちいてシームレスクロニングを行った。

作成したベクターは、大腸菌株 DH5 に導入し形質転換を行い、Amp(+)-LB 寒天培地にてコロニー作成した。形質転換の確認はコロニー-PCR にてを行い、形質転換が行われているコロニーを Amp(+)-LB 培地にて培養後、プラスミドと形質転換株のストックを作成した。プラスミドは、DNA 配列解析サービスを用いて、設計した DNA が正常に導入されていることを確認した。

・ 発現条件の検討

Cripto-1 および bFGF のキメラタンパクの遺伝子が組み込まれたプラスミドを大腸菌株 BL21-CodonPlus(DE3)-RiPL や Rosetta-gamiB(DE3)pLysS に導入し、形質転換を行った。形質転換の確認はコロニー-PCR にてを行い、形質転換が行われているコロニーを Amp(+)-LB 培地にて培養後、形質転換株のストックを作成した。

タンパク発現は、pET22b+系においては形質転換株を 200ml の Amp(+)-LB にて 37 °C で培養し、菌濃度が必要値に達した段階で、IPTG を適量添加し、3 時間程タンパク発現誘導を行った。

pCold 系においては、形質転換株を 200ml の Carbenicillin(+)-LB にて 37 °C で培養し、菌濃度が必要値に達した段階で、氷水にて急速冷却し、15 °C で 30 分振とう後、IPTG を適量添加し、15 時間で 24 時間ほどタンパク発現誘導を行った。

・ 発現タンパクの回収及びリフォールディング条件の検討

発現したキメラタンパクの回収およびリフォールディングを行い、最適な条件を探索した。また、発現タンパクは二次構造の変異をなるべく避けるため封入体ではなく可溶体としての回収を試みた。

・ AlphaFold2 と CD spectrum を用いた発現タンパクの 2 次構造評価

機械学習によるタンパク質二次構造予測を行うアプリケーションである AlphaFold2(ver2.2; deep mind)を PC(CPU; i7-8700K, Memory: 32GB, GPU: RTX3060, OS: Ubuntu) 上に構築し、設計したキメラタンパクの二次構造予測を行った。予測された二次構造から予測される CD (Circular Dichroism) スペクトルを PDBMD2CD(pdbmd2cd.cryst.bbk.ac.uk) にて取得し、実際に測定した CD スペクトルと比較し、二次構造の評価を行った。

・ AlphaFold2 を用いた発現タンパクのレセプター結合性の検討

AlphaFold2 を用いて、発現したキメラタンパクとレセプターとの結合性の検討を行った。

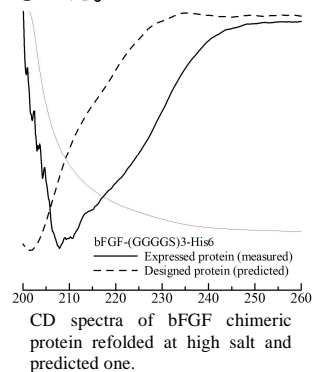
4. 研究成果

本研究において、基板表面にサイトカインを固定化するため、必要な発現タンパクの量は培地中に用いる実験系と比較して大量に必要となるため、発現量を増やす工夫は必須となる。しかしながら実験開始時の予想と異なり、設計したタンパクの発現量を増やす条件の選定は非常に困

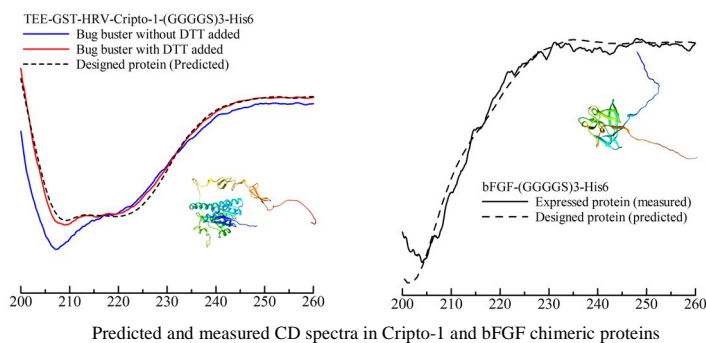
難であった。当初、pET22b+に Cripto1 及び bFGF のキメラタンパク(ペプチドリンカー+HisTag)を発現させようとしたが、Cripto-1 は発現タンパクの回収量、bFGF の方はリフォールディングに困難を生じた。

Cripto-1 系は、発現タンパクが封入体でしか回収できなかったため、水溶性を付与する目的で GSTTag を N 末端側に付与した GST-HRV-Cripto1-(GGGGS)3-HisTag を設計した(その他複数の Cripto1 導入キメラタンパクも設計・発現)。GSTTag を付与したことにより可溶性は上昇したが、それでも封入体およびそれも含めての発現量は予定よりもかなり少量であった。そこで、正常な二次構造の発現タンパクを得るために、ベクターを pET22b+ から pColdI に、大腸菌株を BL21 系から Rosetta-gami 系に変え、低温環境下でタンパクを発現させることにより、可溶体と封入体を合わせた多い量の Cripto1 系キメラタンパクを取得できた。また、大腸菌からタンパクの回収時に DTT を 10mM 程加えると、封入体の量が劇的に減らせることが分かった。最終的に、GST-HRV-Cripto1-(GGGGS)3-HisTag は 200ug/ml を超える量で回収できるようになった。

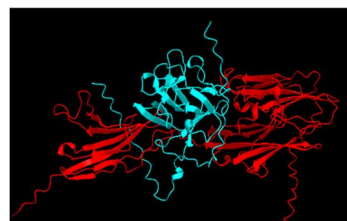
bFGF 系は、発現タンパクは可溶体として回収できるがリフォールディング時に塩濃度が低下すると沈殿体になった。この時に残存する可溶体の量は、bFGF に付与したペプチドリンカーにかなり依存し、本研究内においては、付与するペプチドが多ければ多いほど、低い塩濃度での可溶体の量は激減した。設計した bFGF-(GGGGS)3-HisTag(その他複数の bFGF 導入キメラタンパクも設計・発現)では、最終濃度が 10ug/ml を割り込む量しか回収できなかった。様々な検討を行う内、塩濃度を維持する限り沈殿を生じないことが判明したため、高い塩濃度を維持したまま bFGF キメラタンパクの回収を試み、200ug/ml を超える量で回収できた。しかしながら、発現した bFGF の二次構造は正常な構造ではなかった。bFGF はリフォールディング時に pH5.0 の 20mM クエン酸バッファにて二次構造を正常な状態にするが、このとき、バッファ中の塩濃度が高いままだとリフォールディングが不能であることが CD スペクトルより分かった。よって、bFGF キメラタンパクのリフォールディングは透析法ではなく、希釈法を用いることとした。希釈法により bFGF キメラタンパクを 500-1000ml のクエン酸バッファに滴下し、リフォールディング終了後、塩濃度を上げ、その後、HisTrap にてタンパクを濃縮・回収を行った。最終的に、bFGF-(GGGGS)3-HisTag は 100ug/ml を超える量で回収できるようになった。



Cripto-1 系および bFGF 系のキメラタンパクの二次構造予測は AlphaFold2 を用いて行った。予測された二次構造から求めた予想 CD スペクトルと実際に発現したキメラタンパクの CD スペクトルを比較検討したところ、スペクトルはほぼ一致した。これより AlphaFold2 で予測したタンパクの二次構造は正確である可能性があることが示された。



また、発現タンパクとレセプターとの結合性の予測も AlphaFold2 上にて行ったところ、bFGF-(GGGGS)3-HisTag は FGFR2 と問題なく結合する可能性が高いことが示唆されたが、GST-HRV-Cripto1-(GGGGS)3-HisTag は ALK4 と結合するためには、必ず HRV3C プロテアーゼを用いて GST タグを除去しておかないといけないことが示唆された。



(Cyan) bFGF-(GGGGS)3-Histag
(Red) FGFR2



(Yellow) Cripto1-(GGGGS)3-Histag
(Red) ALK4 (binding domain)

最後に、これらのキメラタンパクの発現・精製条件の検討が遅れたこととコロナ禍の影響により基板固定プロセス以降が準備段階となってしまったが、キメラタンパクの発現・回収量を十分に行える合成条件を確定できた。これらのキメラタンパク質は、NTA 基が導入された基板上に固定することが可能であり、発現量も十分であることから本研究だけでなくバイオマテリアル表面へのサイトカイン固定化など、大量のサイトカインが必要な研究に役立つことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	金輪 真佐美 (福永真佐美) (Kanawa Masami) (00284208)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教 (15401)	
研究分担者	森田 晃司 (Morita Koji) (30555149)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	加藤 功一 (Kato Koichi) (50283875)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関