

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22592

研究課題名（和文）ナノセルロースで創り出す幹細胞の未分化維持培養基材

研究課題名（英文）Development of nanocellulose substrate for undifferentiated culture of mesenchymal stem cells

研究代表者

畠山 真由美（HATAKEYAMA, Mayumi）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：20871437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：樹木由来セルロースナノファイバー（CNF）の結晶表面にカルボキシ基を導入することで、生体内で細胞を取り囲んでいる細胞外マトリックスの模倣を目指し、間葉系幹細胞（MSC）の培養を行った。その結果、MSCの増殖に優れた細胞培養基材の創出に成功した。MSCの無血清培養に必要な増殖因子の基材への固定化を目指し、セルロース分解酵素のセルロース結合モジュール（CBM）が表面修飾したCNFに結合可能であるか評価するため緑色蛍光タンパク質（GFP）を付加したCBM融合GFPを作製し、表面カルボキシ化CNFへの結合を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織工学分野において、細胞培養基材の研究に大きな注目が集まっており、非動物性材料を用いた基材開発の機運が高まっている。本研究では、天然に豊富に存在する樹木由来の多糖であるセルロースナノファイバー（CNF）の固体ナノ形状と表面カルボキシ化による糖鎖界面構造に着目し、CNFの新たな細胞培養基材としての可能性を見出した。さらに、無血清培養を可能とするための増殖因子を安定的に固定化するためのセルロース結合モジュールの有効性の確認にも成功した。今後、増殖因子の固定化と組み合わせることで、細胞培養研究で希求されている無血清培養に適した基材としての利用に期待が持たれる。

研究成果の概要（英文）：Wood-derived cellulose nanofibers (CNFs) were used to culture mesenchymal stem cells (MSCs) by introducing carboxy groups on the crystal surface of CNFs to mimic the extracellular matrix that surrounds cells in vivo. As a result, we succeeded in creating a cell culture substrate with excellent proliferation of MSCs. To immobilize the growth factors necessary for serum-free culture of MSCs onto CNF substrates using a cellulolytic cellulose-binding module (CBM), we first evaluated the ability of CBM to bind to surface-modified CNFs. By preparing the CBM-fused green fluorescent protein (GFP), we confirmed that the CBM can bind to surface carboxylated CNFs.

研究分野：多糖ナノマテリアル科学

キーワード：セルロース セルロースナノファイバー 細胞培養基材 幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞を用いる再生医療の実現には、未分化状態を維持した細胞増殖や適切な分化誘導の技術が必要である。幹細胞は生体内では幹細胞ニッチと呼ばれる特殊な微小環境下に存在しており、幹細胞ニッチが未分化維持や分化を決定すると考えられている。そのため、生体外での幹細胞の未分化培養や分化制御に向けて、ニッチ環境の再構築が重要な認識が高まっている。幹細胞ニッチは細胞外マトリックス (ECM)、細胞増殖因子 (GF)、周りのニッチ細胞などで構成されていることから、動物から抽出した ECM 成分を用いたニッチ環境の構築などが試みられているが、ロット間での差が大きいことや、感染症のリスクなどを抱えている。

(2) 林産系ナノ素材として注目されている樹木由来セルロースナノファイバー (CNF) は、天然に豊富に存在する構造多糖類であり、ナノメートルオーダーの明確な規則的構造を持つ「人工合成不可能な」天然新素材としてのポテンシャルがある。また、CNF を TEMPO 触媒で酸化することで、結晶界面に規則的にカルボン酸を導入できることが明らかになり、この規則的に導入されたカルボキシ基を起点に触媒を担持させる試みはあったものの、既存の単なる触媒担体としての利用では優位性がなく、材料利用する場合でも合成高分子を上回る性能は達成されていない。CNF を使うことで初めて発現する未知機能の発見と、新しいマテリアル設計戦略が強く希求されている。

### 2. 研究の目的

(1) TEMPO 酸化 CNF (TOCNF) のファイバー表面の化学構造は、グルコース 2 残基に 1 つがグルクロン酸となっている。これは、ECM 成分であるヒアルロン酸などに見られるウロン酸構造に類似している。「しなやかな硬さを持つナノ繊維形状 (物理的特性)」と「ウロン酸型の繰り返し構造 (化学的特性)」が、ECM の特徴を備える点に着目し、構造が明確な TOCNF を用いて適切な剛性をもつ培養基材を調製して間葉系幹細胞 (MSC) を培養し、細胞の形態や増殖挙動、遺伝子発現挙動を調べて最適な幹細胞ニッチを作り出すことを目的とした (図 1)。

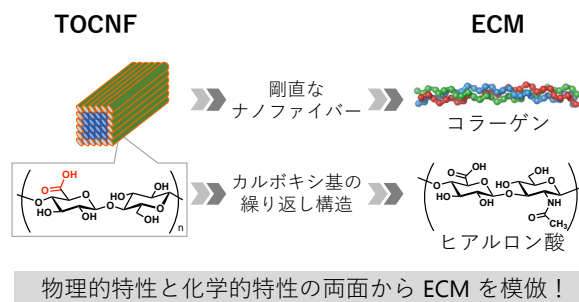


図 1 TOCNF を用いた細胞培養基材の開発

(2) 細胞培養を行う際には、多くの場合でウシ胎児などの動物由来の血清を添加した培地を用いるが、感染症のリスク、血清中の構成成分の不明確さ、ロット間の差などから、無血清培地での培養が希求されている。MSC においては、3 種類の GF を添加することで無血清培養が可能であることが示されている。しかし、GF は安定性が低いため、毎日の培地交換が必要となる。そこで、GF の安定性向上を目的として、セルロース結合能を持たせた GF の作製を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 物理解繊 CNF を TEMPO 酸化し、次亜塩素酸ナトリウムの添加量でカルボキシ基の導入量を制御することで TOCNF (COOH: 0.31–1.60 mmol/g) を得た。繊維長の短い CNF から調製した短繊維 TOCNF (Sf-TOCNF) や、マーセル化処理によってセルロースの結晶形に変化を持たせたマーセル化 TOCNF (Mer-TOCNF) も作製した。各ナノファイバー水分散液 (0.3–0.4 wt%) を 200  $\mu$ L ずつカバーガラス (直径 15 mm) に塗布し、室温で乾燥させたものを基材として細胞培養試験に供した。細胞培養試験では、滅菌した基材を設置した 24-well プレートにヒト不死化間葉系幹細胞 (UE6E7T-11 細胞) を 12,000 cells/well となるように播種し、72 時間培養した。培養後の細胞に対し、Cell Counting Kit-8 での細胞数計測、カルセイン AM とエチジウムホモダイマー III による生細胞・死細胞の同時染色、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量を行った。

(2) 結晶表面にカルボキシ基が導入された TOCNF に対し、セルロース分解酵素のセルロース結合モジュール (CBM) が結合可能であることを確認するため、GF の代わりに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加した CBM 融合タンパク質 (GFP-CBM) の作製を試みた。大腸菌にて異種発現を行い、精製した GFP-CBM を用いて TOCNF 基材への結合能を評価した。続いて、MSC の無血清培養に必要な 3 種類の GF (FGF2, TGF- $\beta$ 1, PDGF) に対し、CBM 配列を付加して大腸菌での異種発現を試みた。培養後の菌体を破碎し、SDS-PAGE により CBM 融合型 GF の異種発現の可否を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) セルロースナノファイバー基材上での間葉系幹細胞の培養

作製した各 TOCNF 基材は無色透明であり、水の接触角を測定したところ、全て 20–30° 程度の親水性表面を有していた。カルボキシ基量が異なる TOCNF 基材上でヒト不死化 MSC を 72 h 培養した結果、カルボキシ基を持たない CNF 基材では、細胞がスフェロイドを形成し、基材上に弱く接着した (図 2)。一方、カルボキシ基が導入された TOCNF 基材では、細胞が基材に接着・伸展しており、カルボキシ基量が 1.0 mmol/g 程度で最も細胞数が増加した。また、繊維長の短い CNF から調製した Sf-TOCNF を用いた基材では、市販のポリスチレンプレート (TCPS) を凌駕する細胞数となった (図 3)。さらに、Sf-TOCNF 基材上の MSC は、細胞が伸展するまでの時間が短く、繊維長が細胞接着・伸展に関与する可能性が示された。さらに、マーセル化処理で得られたセルロース II 型の TOCNF を用いると細胞がスフェロイドを形成したことから、セルロースの結晶形も細胞接着に影響する可能性がある。

続いて、各基材で 72 時間培養した細胞から Total RNA を抽出して各種 GF の mRNA 発現量を定量したところ、カルボキシ基フリーの CNF 基材では肝細胞増殖因子が、カルボキシ基量 1.06 mmol/g の TOCNF 基材では神経栄養因子の発現量が増加していたことから CNF 及び TOCNF で作製する基材が MSC の GF の産生能や分化の方向性を決定づけるバイオアダプティブ基材として有用である可能性が示唆された。

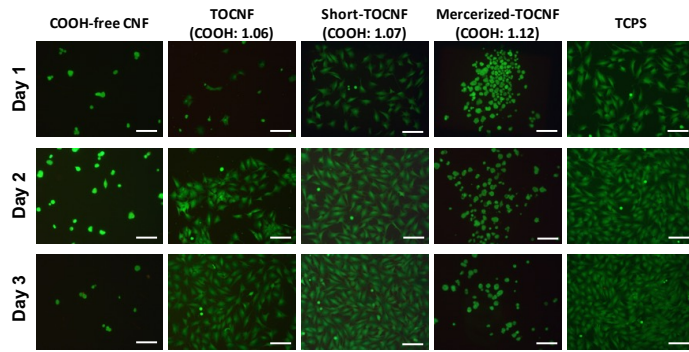


図 2 TOCNF 基材上で培養した MSC の様子  
TCPS: Tissue culture polystyrene. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$ .

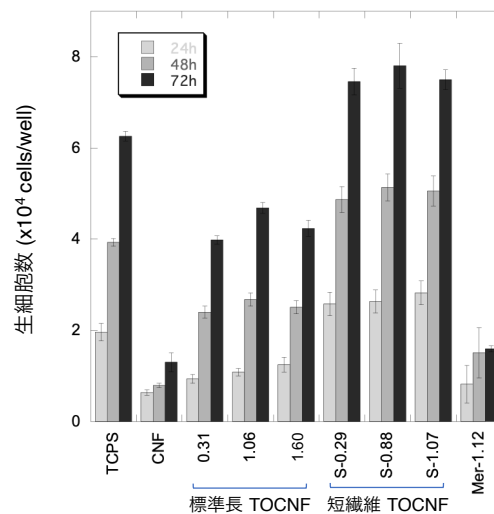


図 3 基材上で培養した MSC の生細胞数

##### (2) セルロース結合モジュールを付加した GF の作製

まず、結晶表面にカルボキシ基が導入された修飾状態の CNF に対して CBM が結合可能かどうか確認するため、GF の代わりに GFP を融合した CBM を作製した。CBM 特異的な吸着が判断するため、CBM 無し GFP も作製して 50 mM HEPES バッファー中で TOCNF 基材と CNF 基材に結合させた。その結果、CBM 無し GFP による物理的な基材への吸着も確認されたが、CBM が付加されたことで、吸着量の増加が見られた。このことから、結晶表面にカルボキシ基を導入した場合においても CBM が結合可能であることが示唆された。さらに、細胞培養用の培地 (10% ウシ胎児血清含有) 中で同様の吸着実験を行なったところ、血清由来するタンパク質が多量に存在するため、CBM 無し GFP では吸着はほとんど見られなかったが、CBM を導入することで、特異的な基材への吸着が確認された (図 4)。続いて、3 種類の GF (FGF2, TGF- $\beta$  1, PDGF) に対し、CBM 配列を付加して大腸菌での異種発現を試みたところ、FGF-2 のみ目的タンパク質の発現が確認された。今後、大腸菌でのタンパク質発現条件を精査することで、残り 2 種類の GF の獲得を行い、TOCNF 基材と組み合わせた無血清培養に取り組む。

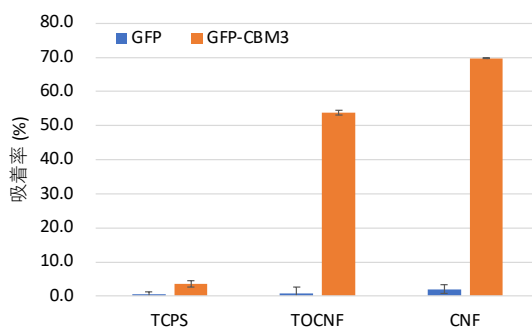


図 4 GFP および GFP-CBM の基材への吸着率 (細胞培養用 DMEM 培地中)

本研究により、樹木由来のセルロースナノファイバーを用いて MSC の生育に適した環境を作り出せる可能性が示唆された。今後、3 種類の増殖因子を用いた無血清培養に取り組むことで、基材と培地ともに全ての成分が明らかな状態での MSC の培養が可能となり、幹細胞ニッチに関する知見が広がると考えられ、再生医療分野での応用にも期待が持たれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kojiro Uetani, Naliharifetra Jessica Ranaivoarimanana, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka	4. 巻 16
2. 論文標題 Inherently distinctive potentialities and uses of nanocellulose based on its nanoarchitecture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioResources	6. 最初と最後の頁 4438 ~ 4473
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Surface-Carboxylated Nanocellulose-Based Bioadaptive Scaffolds for Cell Culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 2869 ~ 2883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10570-021-04154-5	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 Noda Tomoka, Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Combination of Polysaccharide Nanofibers Derived from Cellulose and Chitin Promotes the Adhesion, Migration and Proliferation of Mouse Fibroblast Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 402 ~ 402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano12030402	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 Li Qi, Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Bioadaptive Porous 3D Scaffolds Comprising Cellulose and Chitosan Nanofibers Constructed by Pickering Emulsion Templating	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2200249 ~ 2200249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.202200249	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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面カルボキシ化ナノセルロース薄膜上におけるヒト間葉系幹細胞の培養挙動
3. 学会等名 第88回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qi Li, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Porous cell culture scaffolds composed of cellulose and chitosan nanofibers designed by Pickering emulsion templating
3. 学会等名 第88回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田朋佳、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面カルボキシ化ナノセルロースと表面脱アセチル化ナノキチンからなる細胞培養基材上における線維芽細胞の接着・増殖挙動
3. 学会等名 第88回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田美子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 TEMPO酸化ナノセルロースゲル基材における骨髄由来間葉系幹細胞の培養挙動
3. 学会等名 第88回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田容子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 硫酸化ナノセルロース基材における神経系モデル細胞の増殖・分化挙動
3. 学会等名 第88回紙バルブ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張子霖、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 TEMPO酸化セルロースナノファイバーとキトサンナノファイバーからなるバイオインクの開発
3. 学会等名 第88回紙バルブ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山真由美、野田朋佳、北岡卓也
2. 発表標題 森と海の構造多糖ナノファイバーによるヒト間葉系幹細胞の制御
3. 学会等名 セルロース学会第28回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qi Li, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Fabrication and biofunctional design of porous cell culture scaffolds by polysaccharide nanofibers-stabilized Pickering emulsion templating
3. 学会等名 セルロース学会第28回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田美子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞のニッチ環境を再現するTEMPO酸化ナノセルロースゲル基材
3. 学会等名 セルロース学会第28回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田容子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 神経系モデル細胞の増殖・分化挙動を制御する硫酸化ナノセルロース基材
3. 学会等名 セルロース学会第28回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 エンズイカン、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面改質多糖ナノファイバー基材による間葉系幹細胞の培養
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2021年度九州ブロック学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面カルボキシ化セルロースナノファイバーによる間葉系幹細胞の制御
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李淇、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 Bioadaptive porous 3D-foam scaffolds composed of cellulose and chitosan nanofibers designed by Pickering emulsion templating
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田朋佳、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 天然構造多糖ナノファイバー基材における間葉系幹細胞の培養挙動
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張子霖、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 セルロースナノファイバーとキトサンナノファイバーからなる3D印刷可能なバイオインクの開発
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 エンズイカン、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 フェルラ酸修飾キトサンナノファイバーを用いた間葉系幹細胞の培養
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Mayumi Hatakeyama, Tomoka Noda, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Nanofibers-based biomaterials composed of surface-carboxylated nanocellulose for cell culture applications
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoka Noda, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Nanofibers-based biomaterials composed of nanocellulose and nanochitosan to promote fibroblast cell adhesion and proliferation
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田朋佳、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 森と海の構造多糖ナノファイバー基板における線維芽細胞の増殖挙動
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 大学院農学研究院 環境農学部門 サステナブル資源科学講座 生物資源化学分野  
<https://bm.wood.agr.kyushu-u.ac.jp>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------