

機関番号：12612  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21650104  
 研究課題名（和文） 生きた単一の幹細胞の内部と表面の情報を得るチップ増強ラマン散乱計測法の構築  
 研究課題名（英文） Study on development of in situ tip-enhanced Raman spectroscopy for characterizing the surface and inside of a living stem cells.  
 研究代表者  
 山本 貞明 (YAMAMOTO SADA AKI)  
 電気通信大学・燃料電池イノベーション研究センター・特任教授  
 研究者番号：20374720

研究成果の概要（和文）：表面微細構造を持つハニカムフィルムと FI-PEARL 単粒子焼結膜を培養基材としてラット骨髄間葉系幹細胞の培養を行い、表面形状が間葉系幹細胞の増殖性、接着形態、分裂過程、未分化性保持に及ぼす影響を調べた。その結果、従来用いられているポリスチレン培養基材と同等以上の増殖性が得られことを明らかにした。さらにタンパク質分解酵素を用いることなく細胞を剥離回収出来る可能性を見出した。表面構造が単一の生きた間葉系幹細胞に与える影響を明らかにするチップ増強ラマン散乱計測法の構築に有効なデータを蓄積した。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells from rat adult bone marrow (r-MSCs) were cultured on Honeycomb films and FI-PEARL films without cytokines for cell growth. The anomalous cellular adhesion and division were found in such a way that r-MSCs did not spread at all keeping semispherical original shape along culture and divided directly in the semispherical cell bodies. The proliferative ability on PE-PEARL films was higher than that on a commercially available polystyrene culture plate. These films enabled easy recovery of MSCs by rinsing with water without the conventional trypsin treatment. The present study suggested that both films are promising scaffolds for mesenchymal stem cells which make the bio risk free subculture of MSCs possible. We obtained technical data useful for constructing a sophisticated technique based on tip-enhanced Rama scattering for characterizing the surface and inside of a living mesenchymal stem cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	0	2,500,000
2010年度	500,000	0	500,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,400,000	120,000	3,520,000

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：細胞培養基材、細胞・組織、走査プローブ顕微鏡、移植・再生医療、  
表面・界面物性

### 1. 研究開始当初の背景

「患者の体内に存在する幹細胞を培養し、その細胞を体内に移植し損傷した組織を再生させる」細胞治療はウイルスや感染症など

のバイオリスク、免疫拒絶及び倫理上の問題が無い再生治療として、その実用化が注目されている。体性幹細胞である間葉系幹細胞は哺乳類の骨髄や脂肪などに存在し、自己複製

能を持ち、骨芽細胞、心筋細胞や神経細胞などの組織細胞に分化することが出来、さらにダメージを受けた細胞の活性化因子や血管新生因子を分泌する。間葉系幹細胞は、このような組織再生にとって必要な機能を持ち、しかも骨髄から容易に採取出来るため、細胞治療用の細胞として期待されている。既に脳梗塞の治療に効果があるなど、間葉系幹細胞の治療効果が明らかにされている。

組織内における間葉系幹細胞の頻度は非常に少ないので、細胞治療に用いられるためには、治療に十分な数に細胞数を増やさなければならない。ところが間葉系幹細胞は従来の培養基材では増殖速度が低く、しかも増殖を繰り返す間に自己増殖能と分化能力が著しく低下する問題があった。そのため、バイオリスクのある動物由来の増殖因子を必要とせず、分化能力を失わずことなく間葉系幹細胞を迅速に増やすことの出来る培養基材が望まれている。これまで、PYS-2細胞あるいはウシ角膜内皮細胞が作り出した基底膜様のタンパク質で覆った基板、上皮基底膜タンパク質ラミニン-5で覆った基板、RGDを組み込んだ自己組織化三次元ペプチドナノファイバー、アミノ化ナノファイバー、培養基材のストレッチなどが増殖性向上方法として報告されている。細胞治療に用いることが出来る骨髄間葉系幹細胞の増殖法は、感染症やウイルスの感染がないことや拒絶反応を引き起こす異種タンパク質を持ち込まないことなど、ヒトに安全であるべく厳しい条件が課せられている。

細胞が細胞培養基材表面に応答し、接着形態、運動などを変え、その結果、分化や増殖などに影響を受けることは古くから知られている。この現象は“topographic reaction”とよばれ、マイクロ及びナノサイズの表面構造による *in vivo* 及び *in vitro* での細胞の分化や増殖の制御が調べられてきた。我々は、溶媒の蒸発時にポリマー溶液表面で自己組織的に配列した結露水滴を揮発性鋳型とすることでハニカムフィルム（数 100 nm から数 10 $\mu$ m の範囲にわたり均一な細孔が蜂巢様に規則正しく並んだ多孔性高分子フィルム）を作製し、これを細胞培養基材として種々の細胞培養を行い、細孔のサイズや形態により細胞の増殖、分化、機能が制御されることを見出してきた。ハニカムフィルムを培養基材とすれば、その表面形状によって間葉系幹細胞の増殖を誘導できるのではないかと考え培養を行なったところ、増殖性向上の可能性を見出した。

培養基材の表面構造による細胞の分化・増殖・機能制御とそのメカニズムに関する研究が活発に行なわれている。メカニズム解明のためには、従来行なわれているような平均情報を議論する方法には限界があることが明らかになっている。表面構造による間葉系幹細胞の増殖性

向上の理由として培養基材の表面構造による細胞老化や分裂の制御などが考えられるが、その仮説の検証と、それに基づく最適表面構造の設計には、単一の生きた細胞の老化や分裂、分泌物などに関する情報を得ることが必要であり、それを可能とする分析技術が求められている。

ナノサイズの極めて細い針を細胞内に挿入しても細胞活性は影響を受けないこと、及び金属コート探針によってラマン散乱強度が著しく高まり、高い空間分解能でラマン散乱スペクトルが得られることから、金属コートした原子間力顕微鏡探針を細胞内に導入しチップ増強ラマン散乱スペクトルが測定できれば、生きた状態で、個々の細胞が培養基材表面構造から受ける影響に関する情報を分子レベルで得ることが出来ると期待される。

## 2. 研究の目的

マイクロサイズの孔が蜂巢状に開いたポリマーフィルム（ハニカムフィルム）上で間葉系幹細胞や神経幹細胞の増殖性が表面の平坦なフィルム上に比べ、高まることを見出した。本研究では表面形状による間葉系幹細胞の増殖誘導の可能性を明らかにすることを目的として、ハニカムフィルムに加え FI-PEARL 膜（フェノキシイミン配位子を持つ遷移金属錯体触媒（三井化学 FI 触媒）を用いたエチレン重合で、初めて得られる直径 10  $\mu$ m 以下の超高分子量ポリエチレン微粒子を LB 法で配列して得られた単粒子膜を焼結した表面凹凸構造を持つ膜）を培養基材として増殖因子フリーの培養条件でラット骨髄間葉系幹細胞の培養を行い、ハニカムフィルムの表面形状が間葉系幹細胞の接着形態、増殖性、分裂過程、未分化性保持に及ぼす影響を明らかにする。

骨髄間葉系幹細胞の増殖性が向上する理由として培養基材の表面構造による細胞伸展形態制御、細胞老化や分裂の制御などが考えられる。メカニズムの解明とそれに基づく最適な培養基材表面構造の設計には、単一の生きた細胞の老化や分裂、分泌物などに関する情報を得る必要がある。本研究では、そのような情報を得るための新規な手法として、原子間力顕微鏡探針（チップ）を細胞の極近傍あるいは細胞内部に導入し、チップ増強ラマン効果を用いて、生きた細胞の極近傍や内部のラマン散乱スペクトルを得る方法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) チップ増強ラマン散乱スペクトル測定装置の開発

現有の原子間力顕微鏡装置（Asylum Research MFP-3D）へラマン散乱測定のための分光器を組み込む。ハニカムフィルム表面の凹凸に起因する散乱により、チップ形状等

の条件検討が困難なことが予想されるので、まづはガラス、シリコンあるいはマイカをモデル基板として用い、その表面に、ラマンスペクトルが報告されている物質を固定したものをモデル試料として、励起光強度、照射アラインメント等の測定条件の確立を行なう。細胞内のタンパク分子のモデルとしてLB法でガラス基板等に配列させたDNA一本鎖を試料として測定する。細胞内のラマン散乱スペクトルを得るためには原子間力顕微鏡探針を細胞内に挿入しなければならないので、挿入しても細胞の活性に影響を与えず、同時に高いS/N比で良質なラマンシグナルが得られる探針を検討する。具体的には、収束イオンビーム加工観察装置を用いてサイズ、形状の異なる探針を作製し、細胞内に導入して活性に影響を与えない探針形状・サイズを見出す。次に真空蒸着装置を用いた蒸着や銀鏡反応を利用して探針表面を銀で被覆する。SEM観察によって探針表面及び銀粒子形状を観察するとラマン散乱スペクトルを測定し、高いラマン散乱シグナル強度が得られる探針被覆条件、探針形状を確立する。得られた探針を細胞内に挿入した状態で細胞と探針を接触させた状態で培養を行い細胞活性への影響をみる。ついで、間葉系幹細胞内部のクロマチン、核小体（分化の指標）、細胞劣化の指標物質のラマン測定を行なう。

(2) 細胞培養基材のマイクロ凹凸表面構造間葉系幹細胞の増殖性、接着性に及ぼす影響についての研究

(2)-①増殖性評価

孔径の異なるハニカムフィルム、及び粒子サイズの異なる FI-PEARL 膜を培養基材として培養し、各培養日数での細胞数を計測して増殖性を評価する。レファレンスとして表面が平坦な市販ポリスチレン培養容器を用いる。

(2)-②接着性評価

培養後、培養基材を水洗し、その際剥離した細胞を回収し、その数を数え、トリプシンを用いなくても剥離回収が出来ることを証明する。接着強度評価のためFアクチン、ビンキュリンの染色を行なう。

(2)-②走査型電子顕微鏡及び原子間力顕微鏡を用いて細胞と培養基材との相互作用を示す接着形態の観察を行なう

(2)-③培養細胞のキャラクタリゼーション

- ・増殖性評価のために細胞を数えるときに、トリパンブルーで染色してから細胞数を数える。これによって増殖性ととも死亡率を同時に求める。
- ・継代培養を行って、増殖速度について市販培養基材との相違を明らかにする。
- ・形態観察で細胞対と見えるものが一つの細胞が伸展した形態ではなくて分裂M期にある母娘細胞対であることを証明するた

め核染色 (DAPI 染色) を行い、細胞対に核二つ有るか無いかを見る。

- ・増殖した細胞が骨髄間葉系幹細胞であることを示すために骨髄間葉系幹細胞のマーカーである CD 34, CD 73, 及び CD 105 で染色する。
- ・RT-PCR 評価 (P21, CD73, CD105...) により細胞が元々の特徴を有しているのか (未分化性、分裂能、増殖能など)、表面が平坦な市販培養基材上での培養細胞との違いを明らかにする。増殖抑制の因子が抑制されているかなどを遺伝子レベルでみることにより増殖性が市販培養基材と異なっているメカニズムを明らかにする。
- ・分化能の評価：神経細胞への分化条件で培養を行い神経細胞への分化を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) チップ増強ラマン散乱スペクトル測定装置の開発

原子間力顕微鏡(AFM)観察と共焦点レーザーラマン散乱スペクトル観察を同時に行える装置 Nanofinder30-CombiScope™1000 株式会社東京インスツルメンツ製)を用いて、ハニカムフィルム上に接着したラット骨髄間葉系幹細胞のラマン散乱スペクトルの測定を行った。細胞膜を構成する脂質のC-H振動やタンパク質に由来するアミドIやアミドIII、C-N、C=C伸縮振動などに帰属される散乱ピークがはじめて観察された。C-H伸縮振動に由来するラマン散乱のイメージングとAFM像との比較から、細胞の部位によってラマン散乱強度の異なることがわかった。この結果は、C-H伸縮以外のたんぱく質に関する上記特性ピークの検出とその細胞上の発現部位の情報が高い空間分解で得られることを示す重要な結果である。チップ増強ラマン散乱スペクトルの測定を行ったが、チップで増強された強い蛍光のためチップ増強によるラマン散乱スペクトルは観察できなかった。今後、更にラマン散乱が増強されるチップ表面作製検討(チップ形状、チップ表面に蒸着する金属の選定、蒸着条件の選定など)が必要なことが判明した。今後、AFM観察と共焦点レーザーラマン散乱スペクトル及びチップ増強ラマン散乱スペクトルの測定から細胞内のタンパク質や細胞の増殖、分化あるいはタンパク質産生に関与する外部刺激受容体である膜タンパクの発現とその発現部位に関する情報が得られ、培養基材の表面構造とこれらの情報との相関性から、培養基材の表面構造による細胞機能の制御メカニズムの解明に迫れるものと期待できる。

(2) 細胞培養基材のマイクロ凹凸表面構造が間葉系幹細胞の増殖性、接着性に及ぼす影響に

ついでの研究—

### (2)-①ハニカムフィルム

表面形状による間葉系幹細胞の増殖性向上のメカニズムを明らかにすることを目的として、硬さの異なるポリスチレン (PS) 及びポリブタジエン (PB) ハニカムフィルムを培養基材として増殖因子フリーの培養条件でラット骨髄間葉系幹細胞の培養を行い、ハニカムフィルムの表面形状及びポリマー材質が間葉系幹細胞の増殖性、接着形態、分裂過程、未分化性保持に及ぼす影響を走査型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、及び走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。平膜上では、これまで知られているように一度伸展した細胞が収縮して分裂する。これに対し、ハニカムフィルム上では細胞は伸展せず半球状で接着し、その接着状態で分裂することがわかった。(図2)。PSハニカムフィルム上では増殖性が市販のポリスチレン培養基材に比べ、約1.5倍向上した。PBハニカムフィルム上では増殖性の向上効果がみられなかった。増殖性に対する材質の効果は、材質に依存したハニカム構造の剛性に起因することが考えられる。

微細な凹凸表面上での骨髄間葉系幹細胞の挙動が平坦な表面上と異なっているメカニズムを明らかにするためにハニカムフィルム上で培養しRT-PCR (P21、CD73、CD105) を行って未分化性、分裂能、増殖能など細胞特性を遺伝子レベルで評価した。その結果、表面が平坦な培養基材上に比べ、増殖性抑制物質や細胞老化を誘起する物質産生の遺伝子発現が抑制されていること、未分化性を示すタンパク質を産生する遺伝子が発現していることなど、微細な表面構造を持つ培養基材上での細胞挙動の解明にとり重要な情報が得られた。

### (2)-②FI-PEARL単粒子焼結膜

FI-PEARL 単粒子焼結膜上で、バイオリスクのある増殖因子を用いることなく、ラット骨髄間葉系幹細胞の培養を行い、FI-PEARL 単粒子焼結膜が増殖性、接着形態・強度、分裂過程、未分化性保持に及ぼす影響を SEM、AFM、及び CLSM を用いて調べた。FI-PEARL 単粒子焼結膜は、フェノキシイミン配位子を持つ遷移金属錯体触媒 (三井化学 FI 触媒) を用いたエチレン重合で、初めて得られる直径 10  $\mu\text{m}$  以下の超高分子量ポリエチレン微粒子を LB 法で配列して得られた単粒子膜を焼結した表面凹凸構造を持つ膜である。

SEM 及び AFM を用いた細胞の接着形態の観察から、従来知られている分裂様式とは異なり細胞は伸展せず半球状で接着し、その接着状態で分裂することがわかった (図1)。ウイルス感染などの恐れのある成長因子が無くとも、市販培養基材と同等以上の増殖性が得られた。

加えて接着性が弱くタンパク質分解酵素を用いることなく水洗浄のみで細胞を剥離回収出来る可能性を見出した。

本結果は、FI-PEARL 単粒子焼結膜がウイ

ルス等の感染の恐れがなく迅速に骨髄間葉系幹細胞を増やし、タンパク質分解酵素を用いることなく、容易に剥離回収出来る培養基

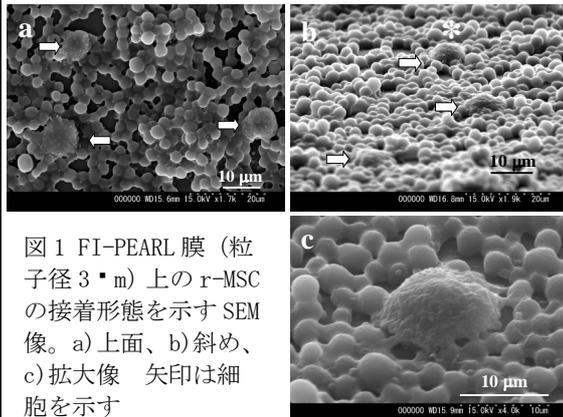


図1 FI-PEARL膜 (粒子径 3  $\mu\text{m}$ ) 上の r-MSC の接着形態を示す SEM 像。a) 上面、b) 斜め、c) 拡大像 矢印は細胞を示す

材である可能性を示唆するものである。

### (2)-③ まとめ

表面にミクロンサイズの微細構造を持つハニカムフィルムと FI-PEARL 単粒子焼結膜はバイオリスクのないヒトに安全な骨髄間葉系幹細胞の増殖用培養基材として期待される。

増殖性向上や二次元培養基材上とは異なる接着形態と分裂プロセスから、ハニカムフィルム及び FI-PEARL 単粒子焼結膜表面に対し骨髄間葉系幹細胞は生体内のニッチといわれる微小環境に対すると同様の応答を示していることが推察された。なぜ、r-MSC がハニカムフィルムや FI-PEARL 単粒子焼結膜上で特異的な接着形態や分裂過程をとるのか? の理由は現在のところ不明である。体性幹細胞は生体内ではニッチと呼ばれる微小な空間に存在し、その増殖と分化が制御され、未分化状態でその場に留まっていると考えられている (通常は増殖・分化を誘起せず、必要時に増殖・分化を促す)。病気や怪我によって生体組織が損傷を受け、その修復が必要になると、成体幹細胞は自己複製と分化を開始し、必要な細胞が損傷した組織に供給される。組織の修復が必要になったときの速やかな細胞の供給のためには、平膜や TC のような二次元細胞培養基板上のような伸展—収縮—分裂—伸展といった分裂のプロセスに比べて、伸展と収縮のプロセスを省いたハニカムフィルムで見られる接着形態や分裂様式は理にかなっているように思われる。生体内の r-MSCs の接着形態や分裂様式については不明であるが、ハニカムフィルム上や FI-PEARL 単粒子焼結膜上の接着形態や分裂様式は成体内 (ニッチ) での骨髄間葉系幹細胞の接着形態や分裂を再現しているのかもしれない。本結果は生体内組織再生メカニズム解明研究にとって科学的に意義ある発見と位置づけること

が出来る。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

(1) ”自己組織化ハニカムフィルムに対するラット骨髄間葉系幹細胞の応答“ 森田有香, 山本貞明, 藪浩, 伊藤絵美子, 本望 修, 居城邦治, 下村政嗣,  
表面科学、31, pp392-399 (2010).

[学会発表] (計3件)

[国内学会招待講演] (計1件)

(1) 山本貞明、“自己組織化ハニカムパターン多孔性高分子薄膜による細胞制御”、09-5 ポリマーフロンティア 21、2010年1月22日、東工大百年記念館 フェライト会議室

[一般発表] (計2件)

(1) Honeycomb-patterned topography regulates cell shape and improves proliferative ability of multipotent adult stem cells, Y. Morita, S. Yamamoto, H. Yabub, E. Ito, M. Tanaka, K. Ijiro, O. Honmoue, M. Shimomura  
2009 7 5 Prague Czech Republic

(2) Honeycomb-Patterned Polymer Films Enhance the Proliferation of Mesenchymal Stem Cell from Rat Adult Bone Marrow, Y. Morita, S. Yamamoto, H. Yabu, E. Ito, K. Ijiro, O. Honmou and M. Shimomrua The 1st FAPS Polymer Congress 2009.10 20 Nagoya

[書籍] (計1件)

(1) 山本貞明 “再生医療の細胞培養基板—ハニカムフィルム“ 日本化学会編 現代界面コロイド科学の辞典 pp 118-119 丸善  
2010年 5月.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 貞明 (YAMAMOTO SADA AKI)  
電気通信大学・燃料電池イノベーション研究センター・特任教授  
研究者番号：20374720