

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24年 6月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680042

研究課題名（和文） 基礎医学研究のツールとしての幹細胞動員・増幅能をもつ体内インキュベータの開発

研究課題名（英文） Development of in vivo incubator having an ability to enhance both the recruitment and the expansion of stem cells as a tool for basic medical researches

研究代表者

山本 雅哉 (YAMAMOTO MASAYA)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：10332735

研究成果の概要（和文）：増殖・分化の能力が高い幹細胞を利用した細胞移植治療や再生医療が期待されている。本研究では、この分野の基礎研究を加速するための新しい実験手法として、幹細胞を体内で集めて増殖させるための材料に関する基礎研究を行った。具体的には、幹細胞を集めるためのタンパク質を効率よく作用させるための徐放化技術、ならびに、集めた幹細胞を効率よく増殖させるための、タンパク質を配向固定化したバイオマテリアルを開発した。

研究成果の概要（英文）：Recently many researches have demonstrated the importance of stem cells with a high potential of proliferation and differentiation to realize cell therapy and regenerative medicine. To this end, new technologies and methodologies to recruit and expand stem cells in the body have been developed to accelerate basic researches on cell therapy and regenerative medicine. In particular, both the controlled release of chemoattractant proteins and the immobilization of growth-promoting proteins for stem cells have been investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

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：幹細胞、人工ニッチ、核酸アプタマー、細胞培養基材、細胞培養技術

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞の高い生物機能を利用した、移植医療や再生医療が期待されている。この状況の中、幹細胞の基礎医学研究は飛躍的に進歩している。この幹細胞研究は、主として、試験管内の培養実験、あるいは、幹細胞を投与した動物に対する組織学的実験をベースにしている。これらの研究を通じて、幹細胞の体内での動きを制御する因子が固定され、

その一部は利用可能となってきた。

本研究の目的は、基礎医学研究を目指した幹細胞生物学の新しい研究ツールの開発である。しかしながら、本研究は、治療に必要な幹細胞を集めて増幅する技術や治療部位への幹細胞の動員による、治療効果の高い再生医療の実現など、再生医学研究の新たな知見や再生治療法の開発にもつながる可能性がある。さらに、本研究は、幹細胞生物学の

さらなる進歩と幹細胞の能力を活用した再生医療の実現に大きく貢献することができると考えられる。

2. 研究の目的

試験管内の培養実験は、幹細胞を単離する必要があり、また、しばしば幹細胞をサポートするフィーダー細胞を共培養する必要がある。一方、動物実験の場合、幹細胞に対する生物活性をもつ生体因子を調べるために、その因子をノックアウトあるいは強制発現させた遺伝子改変動物が必要になる。本研究では、生体内で本来、幹細胞の維持に関わっていないとされている筋肉内などの異所性に幹細胞を動員させ、集まった幹細胞をその場で増殖させる“体内インキュベータ”を開発する。すなわち、幹細胞の動員作用をもつストローマ細胞由来因子 (SDF) -1 や SDF-1 を含んでいる血小板を固定化した生体材料を利用して、生体内の幹細胞を動員し、さらに細胞増殖因子を作用させて増殖させる。これらの研究を通じて、体内インキュベータの key となる、生体材料と幹細胞との相互作用を、細胞増殖因子の放出制御ならびに生体材料の硬さの二つの方法で制御する技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) アプタマーを固定化するための多孔質生体材料の作製

ゼラチン、アルギン酸、ヒアルロン酸などからなるスポンジ状の多孔質材料を作製する。スポンジの架橋は、グルタルアルデヒドなどの化学架橋剤を用いる方法、ならびに熱脱水架橋などの物理的な方法により行い、幹細胞の動員・増幅実験に使用しやすい条件を設定する。

(2) Jagget-1、フィブロネクチン、ラミニン、SDF-1 あるいは SDF-1 を含んでいる血小板表面などを導入した多孔質生体材料の作製

Jagget-1、フィブロネクチン、ラミニン、SDF-1 あるいは SDF-1 を含んでいる血小板表面などを導入した多孔質生体材料について、生物活性などの生化学的評価、ならびに幹細胞の接着・増殖挙動について検討する。幹細胞として、骨髄からの単離が可能で、最もよく研究されている造血幹細胞を用いる。

(3) 幹細胞の増殖作用をもつ SCF や FGF などの細胞増殖因子の徐放化

細胞増殖因子の徐放化技術を利用して、幹細胞因子 (SCF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF)、substance P などの幹細胞の動員や増幅活性をもつ細胞増殖因子を生体材料と混合してマウスへ埋入する。ゼラチン微粒子、ゼラチ

ンハイドロゲル、多孔質足場材料などを作製し、これらの因子を含浸させる。ヨウ素 125 標識した因子を利用することにより、それぞれの徐放性を確認する。

(4) GFP トランスジェニックマウスを利用した細胞動員の評価

緑色蛍光タンパク質 (GFP) トランスジェニックマウスを利用して骨髄置換マウスを作製する。このマウスの大腿筋内に SCF や FGF などの細胞増殖因子を含むゼラチン微粒子と核酸アプタマーにより生体因子を固定化したスポンジを埋入する。GFP 陽性の骨髄由来の幹細胞の動態や増殖を組織学的に評価することにより、生体因子を固定化した多孔質生体材料の体内インキュベータとしての生物学的機能を評価する。

4. 研究成果

(1) アプタマーを固定化するための多孔質生体材料の作製

ゼラチン、アルギン酸、ヒアルロン酸などからなるスポンジ状の多孔質材料を作製後、フィブロネクチンなどの細胞接着分子や細胞増殖因子を固定化するためのヘパリンの固定化を行い、細胞接着性や細胞増殖因子の徐放性について検討した。その一例として、アルギン酸を用いて多孔質材料を作製したところ、1 週間以上にわたって細胞を材料内で維持できることがわかった (図 1)。

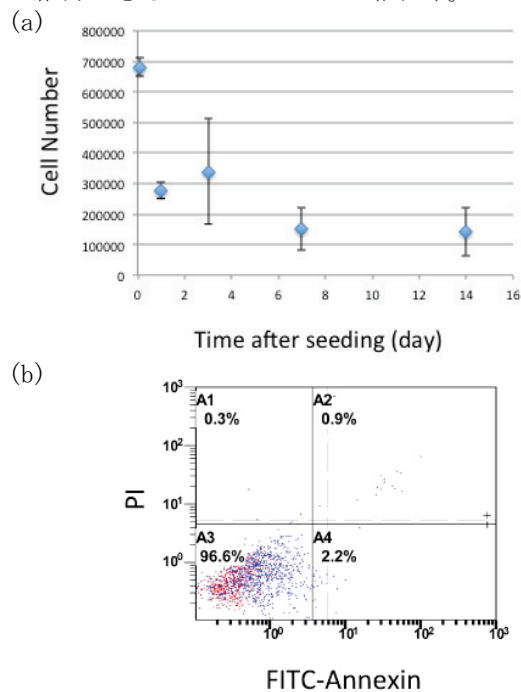


図 1 フィブロネクチン固定化アルギン酸足場材料内での血管内皮細胞の培養

(a) 足場材料内での血管内皮細胞数

(b) 培養 1 週後の足場材料内の血管内皮細胞の生存率

一方、核酸アプタマーを作製するために、細胞接着分子であるフィブロネクチン、ラミニンあるいは細胞増殖因子の一つである幹細胞増殖因子について、RT-PCR法による遺伝子クローニングを行い、大腸菌でタンパク質の発現を確認した。

- (2) Jagget-1、フィブロネクチン、ラミニン、SDF-1あるいはSDF-1を含んでいる血小板表面などを導入した多孔質生体材料の作製

近年、幹細胞の増殖・分化が材料の軟らかさで変化することが明らかにされつつある。そこで、幹細胞の多孔質材料として、刺激に反応して軟らかさなどの物性が変化する生体材料に関する研究を行った。すなわち、糖応答性をもつフェニルボロン酸残基を導入したゼラチンハイドロゲル、あるいは間葉系幹細胞の骨分化にともなって発現するアルカリ性フォスファターゼの酵素刺激に反応するリン酸基を導入したハイドロゲルを設計し、刺激応答性、ならびに軟らかさを評価した。

糖応答性をもつフェニルボロン酸残基を導入したゼラチンハイドロゲルでは、ハイドロゲルに細胞の増殖・分化を制御する細胞増殖因子の一つである骨形成因子(BMP)-2を包含させたところ、糖添加に反応して任意のタイミングで細胞増殖因子を放出することに成功した(図2)。

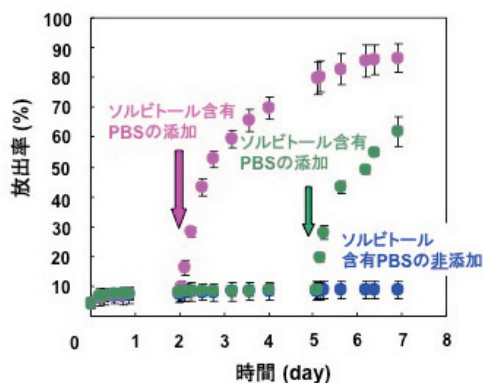


図2 糖応答性ゼラチンハイドロゲル微粒子からの細胞増殖因子の糖刺激応答放出

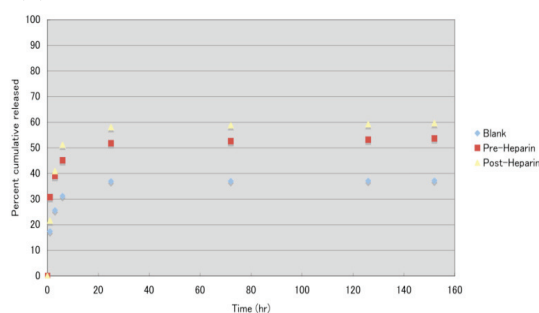
一方、間葉系幹細胞の骨分化にともなって発現するアルカリ性フォスファターゼの酵素刺激に反応するリン酸基を導入したハイドロゲルを作製したところ、アルカリ性フォスファターゼによりハイドロゲルが軟らかくなり、骨分化がより効率よく誘導されることがわかった。これは、細胞の増殖と分化とは、最適なハイドロゲルの硬さが異なるため、硬さを変化させることができる生体材料が有用であることを示唆している。さらに、得られた刺激応答性ハイドロゲル表面に幹

細胞の分化を制御するEphrinB2などのタンパク質を配向固定化し、骨髄間葉系幹細胞の接着と増殖について評価したところ、EphrinB2を配向固定化することにより、通常の化学固定と比較して、より高い生物活性を示し、骨髄間葉系幹細胞の接着形態が変化することがわかった。

- (3) 幹細胞の増殖作用をもつSCFやFGFなどの細胞増殖因子の徐放化

細胞増殖因子の徐放性について、*in vitro*ならびに*in vivo*いずれの場合も2週間以上にわたって徐放化できることを明らかにした。その一例として、図3には、*in vitro*におけるSDF-1の徐放挙動を示す。SDF-1とヘパリンとを混合してカチオン性をもつスベルミンを導入したアルギン酸足場材料へ包含させたところ、アルギン酸足場材料からSDF-1を徐放化することができた(図3a)。また、SDF-1徐放化アルギン酸足場材料をマウス背部皮下に埋入したところ、足場材料周囲に血管が新生していた(図3b)。さらに、徐放化された細胞増殖因子の生物活性について、創傷治癒モデルを用いて評価したところ、生物活性が維持されていることがわかった。

(a)



(b)

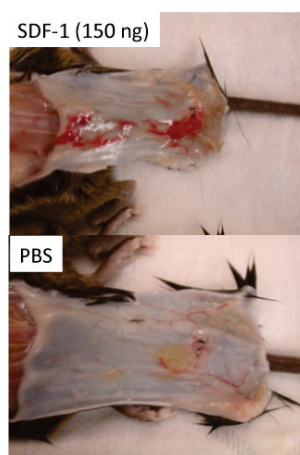


図3 徐放化SDF-1による血管新生
(a) *in vitro*におけるSDF-1の徐放化
(b) 徐放化SDF-1による血管新生
SDF-1: 150 ng
PBS: SDF-1なし(生理食塩水)

(4) GFP トランスジェニックマウスを利用した細胞動員の評価

幹細胞の動員を確認する方法として、蛍光標識した細胞を用いて、多孔質材料内の細胞を観察可能かどうかについて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。その結果、配向ポア構造をもつ多孔質材料と蛍光標識細胞とを組み合わせることにより、材料内における細胞の挙動を観察できることを明らかにした (図4)。

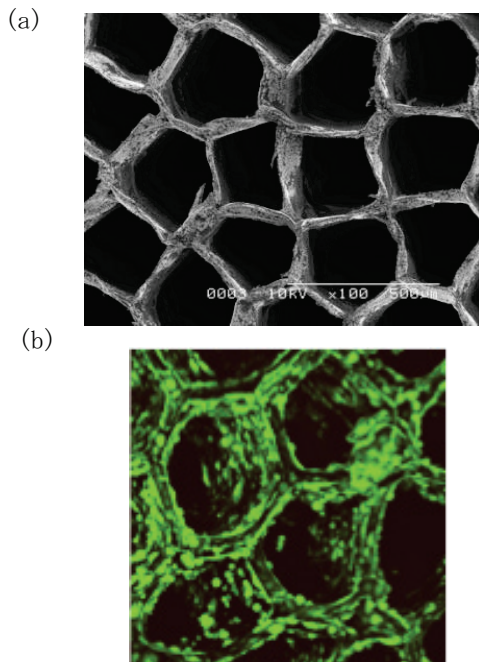


図4 配向ポア構造をもつアルギン酸足場材料内での血管内皮細胞の培養
(a) 配向ポア構造をもつアルギン酸足場材料の走査型電子顕微鏡写真
(b) 配向ポア構造をもつアルギン酸足場材料内の GFP 標識した血管内皮細胞に対する共焦点レーザー顕微鏡観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Stromal-derived factor-1 delivered via hydrogel drug-delivery vehicle accelerates wound healing in vivo. P.W. Henderson, S.P. Singh, D.D. Krijgh, M. Yamamoto, D.C. Rafii, J.J. Sung, S. Rafii, S.Y. Rabbany, J.A. Spector. *Wound Repair Regen.*, 19, 420-425 (2011). 査読有, 10.1111/j.1524-475X.2011.00687.x
- ② Orientation-regulated immobilization of Jagged1 on glass substrates for ex vivo proliferation of a bone marrow cell population containing hematopoietic stem cells. H. Toda, M. Yamamoto, H. Kohara, Y. Tabata. *Biomaterials* 32, 6920-6928 (2011). 査読有り, 10.1016/j.biomaterials.2011.05.093
- ③ Generation of type I collagen gradient in polyacrylamide hydrogels by a simple diffusion-controlled hydrolysis of amide groups., M. Yamamoto, K. Yanase, Y. Tabata, *Materials*, 3, 2393-2404 (2010). 査読有り, 10.3390/ma3042393
- ④ Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. M. Yamamoto, D. James, H. Li, J. Butler, S. Rafii, S. Rabbany, *Tissue Eng Part A*, 16, 299-308 (2010). 査読有り, 10.1089/ten.tea.2009.0010.
- ⑤ Continuous delivery of stromal cell-derived factor-1 from alginate scaffolds accelerates wound healing. S. Y. Rabbany, J. Pastore, M. Yamamoto, T. Miller, S. Rafii, R. Aras, M. Penn, *Cell Transplant*, 19, 399-408 (2010). 査読有り, 10.3727/096368909X481782
- ⑥ Angiogenesis induced by controlled release of neuropeptide substance P. H. Kohara, S. Tajima, M. Yamamoto, Y. Tabata, *Biomaterials*, 31, 8617-8625 (2010). 査読有り, 10.1016/j.biomaterials.2010.07.079

〔学会発表〕(計11件)

- ① M. Yamamoto. Functional Hydrogel Biomaterials for modulation of stem cell behaviors. 日本薬学会国際委員会主催「2011年度第1回西地区英語セミナー」2012年4月3日、京都(招待講演)
- ② 山本雅哉:再生医療のためのバイオマテリアル. 日本材料学会「第34回材料講習会」2011年12月2日、京都(招待講演)
- ③ 山本雅哉:人工細胞外環境としてのバイオマテリアル. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「幹細胞を制御する環境因子の分子基盤」2011年11月30日、大阪(招待講演)
- ④ 山本雅哉:バイオマテリアル分野から見た再生医療の現状. 「平成23年度再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座」2011年11月8日、京都(招待講演)
- ⑤ M. Yamamoto, Y. Tabata. Design of hydrogels with different stiffness as a culture substrate to control cell behaviors. 14th Asian Chemical Congress. 2011年9月8日、バンコク(タイ)(国際会議招待講演)
- ⑥ 山本雅哉:バイオマテリアル・DDSを中心とした再生医療に必要なモノづくり. 近畿経済産業局「再生医療分野モノづくりシンポジウム」2011年2月10日、京都(招待講演)
- ⑦ 山本雅哉:細胞周辺環境としての機能性バイオマテリアル足場の開発. 「第32回

日本バイオマテリアル学会大会 平成 22 年度日本バイオマテリアル学会科学奨励賞受賞者講演」2010 年 11 月 29 日、広島（招待講演）

⑧ 山本雅哉：再生医療におけるバイオマテリアルの重要性. 「福井大学 ものづくり講演会」2010 年 11 月 26 日、福井（招待講演）

⑨ M. Yamamoto, Y. Tabata: Biomolecules-functionalized scaffolds for stem cell growth and differentiation. ISOMRM 2010. 2010 年 11 月 5 日、台北（台湾）（招待講演）

⑩ 山本雅哉：徐放化骨形成因子を組み込んだ機能性バイオマテリアルを用いた放射線照射骨欠損の再生誘導. 「第 2 回日本再生医療学会 YIA 受賞者講演」2010 年 3 月 18 日、広島（招待講演）

⑪ 山本雅哉：機能性足場材料の作製に利用可能な表面ならびに三次元加工技術. 「京都リサーチパーク第 6 回再生医療サポートビジネス懇話会」2010 年 2 月 19 日、京都（招待講演）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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