

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14890

研究課題名（和文）セルロースとキチンのナノファイバーで制御する肝細胞の機能発現

研究課題名（英文）Functional regulation of hepatocytes by cellulose and chitin nanofibers

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：医薬品開発での肝毒性評価に使用するための肝機能を保持した肝細胞を培養する基材開発を目指し、樹木由来のセルロースナノファイバーと水産資源のキチンナノファイバーを用いて肝細胞および肝機能を支える細胞（肝非実質細胞）のそれぞれに適した基材を探索した。その結果、肝細胞のモデルとして肝がん細胞（HepG2）の培養を行ったところ、肝機能の指標であるアルブミン産生能が向上する基材や、肝非実質細胞の増殖因子産生能の向上が期待される基材の発掘に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、セルロースナノファイバーへ導入する官能基量や官能基の種類、繊維長によって肝細胞の凝集塊のサイズ制御や細胞接着性を制御できることがわかり、基材の物性と細胞培養挙動の関係を詳細に検討することで、多糖基材への細胞接着・非接着のメカニズム解明が期待される。また、多糖基材で培養した肝細胞のアルブミン産生能が向上していたことから、肝毒性評価の新たなプラットフォーム構築へとつながり、創薬支援基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：I aimed to develop a substrate for culturing hepatocytes that retain liver function for use in hepatotoxicity evaluation in drug development. I used cellulose nanofibers derived from wood and chitin nanofibers from crab shell to explore suitable substrates for both hepatocytes and cells that support liver function (hepatic non-parenchymal cells). As a result, we succeeded in finding a substrate that improves albumin production, which is an indicator of liver function, and a substrate that is expected to improve growth factor production in hepatic non-parenchymal cells when hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were cultured as a model for hepatocytes.

研究分野：木質科学・生体分子化学・生体医工学

キーワード：セルロース キチン 細胞培養基材

1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体内外の物質の代謝、解毒、排出などに関与する主要な臓器であり、体内に投与された医薬品は主に肝細胞でシトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素により代謝される。薬物の代謝によって生じる肝毒性は、医薬品候補化合物の開発中止となる主要な有害事象である。現在、肝毒性の評価はモデル動物を用いた *in vivo* 試験や、HepG2 細胞などのヒト由来の肝ガン細胞株、ヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 試験が行われている。しかし、動物を用いた試験ではヒト特異的な毒性を予測することは困難であり、HepG2 細胞では CYP 活性が極めて低く、CYP による代謝に関連した毒性を評価できない。また、ヒト初代培養肝細胞は入手機会に限りがあるため高価であり、ロット差が極めて大きいため、安定した毒性評価を行うことが困難である。以上から、安定に使用できるヒト由来の細胞系を用いた肝毒性評価系の確立が望まれている。そこで、無限に増殖が可能なヒト iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞から分化誘導した肝細胞を使用できれば、従来の毒性評価の問題点が克服でき、肝毒性評価のための新しい細胞ソースとして期待されている。すでに、iPS 細胞から肝細胞への分化方法については、様々な研究者により報告されているが、分化させた肝細胞の CYP 活性は初代培養肝細胞に比べて低く、さらなる改善が求められている。

一方、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キシ基を導入できる。また、近年では、硫酸化やリン酸化によるセルロースナノファイバーの調製方法も確立されており、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

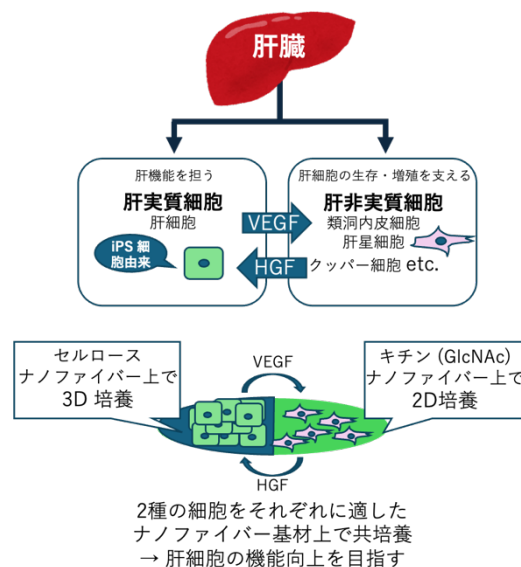
本研究では、ナノファイバー形態のセルロースとキチンを用いて生体内で細胞を取り囲んでいる細胞外マトリックス (ECM) を模倣して、iPS 細胞由来の肝細胞と肝細胞の生存を支える肝非実質細胞である類洞内皮細胞のそれぞれの細胞の生育環境に適した培養基材を作製し、2 種の細胞が相互にコミュニケーションを取れる環境を作ることによって、CYP 活性やアルブミン産生能などの肝細胞機能を向上させることを目的とした。

3. 研究の方法

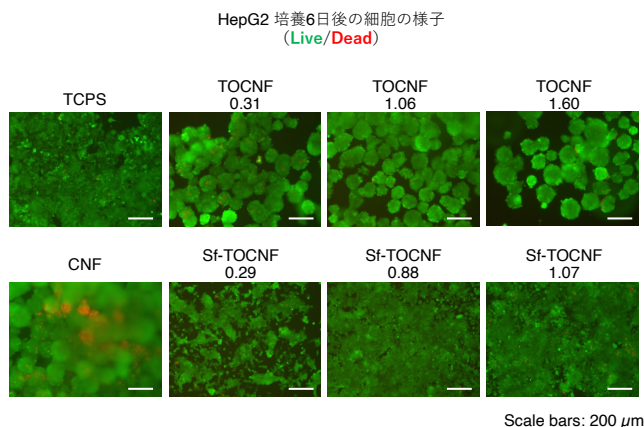
物理解繊 CNF を TEMPO 酸化し、次亜塩素酸ナトリウムの添加量でカルボキシ基の導入量を制御することで TOCNF (COOH: 0.31-1.60 mmol/g) を得た。繊維長の短い CNF から調製した短繊維 TOCNF (Sf-TOCNF) や、マーセル化処理によってセルロースの結晶形に変化を持たせたマーセル化 TOCNF (Mer-TOCNF)、カルボキシメチル化 CNF (CM-CNF) も作製した。各ナノファイバー水分散液 (0.3-0.4 wt%) を 200 μ L ずつカバーガラス (直径 15 mm) に塗布し、室温で乾燥させたものを基材として細胞培養試験に供した。細胞培養試験では、滅菌した基材を設置した 24-well プレートに肝細胞のモデルとして、ヒト肝ガン細胞 (HepG2 細胞) を播種し、3 日間から 9 日間培養した。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 Propidium iodide 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や、ELISA によるアルブミン産生量の定量を行った。また、類洞内皮細胞のモデルとして、不死化ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUEhT-1) をキチンナノファイバー (CtNF) や各種 CNF 基材上で培養を行い、リアルタイム PCR による肝細胞増殖因子の定量を行った。

4. 研究成果

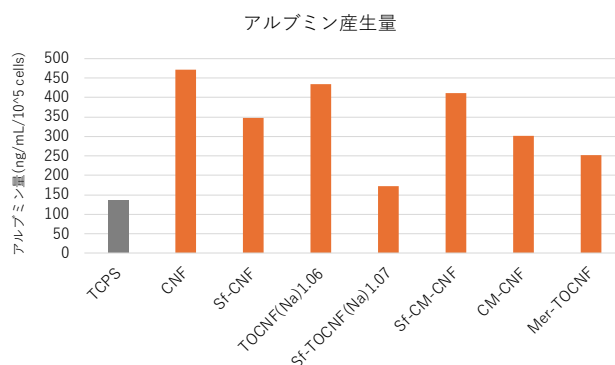
肝細胞は平面で培養する場合よりも 3D 培養を行うことで肝機能が向上することが知られていることから、CNF 基材上でスフェロイドを形成させることで肝機能が向上すると考え、肝細胞のモデルとして HepG2 細胞を用いて、各種 CNF 基材上での培養を行った。その結果、TOCNF



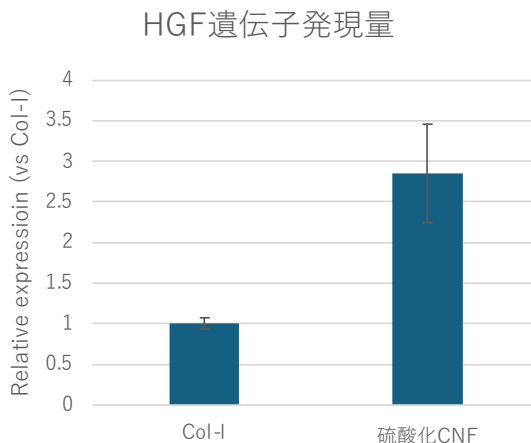
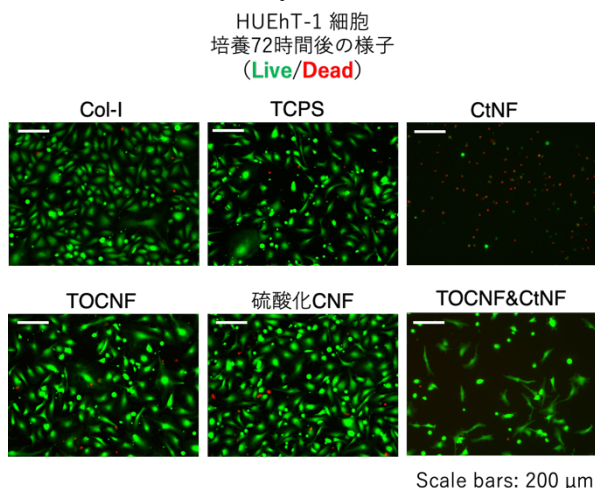
基材上では HepG2 細胞がスフェロイドを形成することが確認された。さらに、マーセル化した TOCNF 基材 (Mer-TOCNF) や、カルボキシメチル化 CNF (CM-CNF) 基材にも細胞は接着せず、TOCNF と比べて大きな凝集塊を形成し、スフェロイド内部は死細胞が多くみられた。これは、凝集が大きくなりすぎたために、内部での酸素や栄養の供給が滞ったことに起因すると思われる。CNF の官能基量や種類によってスフェロイドのサイズ制御が可能であることが示唆された。一方、繊維長の短い TOCNF (Sf-TOCNF) を用いて同様に培養を行ったところ、HepG2 細胞が接着し、良好な細胞増殖性を示した。



続いて、肝機能の評価として、各基材で培養した HepG2 細胞が培地中に分泌したアルブミンを ELISA で定量した。平面培養 (TCPS) と比較して、CNF 基材上で培養した HepG2 細胞はおおよそ 4 倍のアルブミンを分泌していた。一方、TCPS と同様に平面培養された Sf-TOCNF 基材上の HepG2 細胞のアルブミン産生能は、TCPS と同程度であった。



さらに、肝細胞の働きを支える類洞内皮細胞のモデルとして、不死化ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUEhT-1) を用いて、多糖ナノファイバー基材上での培養を行った。当初の予定では、HUEhT-1 細胞は CtNF 基材への接着が可能であると予想していたが、実際に培養を行うと、接着性は見られず、死細胞が多く目立っていた。一方、TOCNF や硫酸化 CNF 基材上で培養を行うと、ポジティブコントロールのコラーゲン (Col-I) と同等の良好な細胞接着性と増殖性が確認された。HUEhT-1 細胞を培養する際に、培地中へ内皮細胞増殖因子を添加しているが、増殖因子は一般的に分解されやすいと考えられている。硫酸化 CNF 基材では、これらの増殖因子が基材へ吸着することで、細胞周辺の局所的な濃度が増加した、もしくは、基材への吸着により安定性が向上し、分解されにくくなったことで HUEhT-1 細胞の良好な細胞増殖性につながった可能性がある。また、肝細胞の働きを支えるための増殖因子として、肝細胞増殖因子 (HGF) の遺伝子をリアルタイム PCR で定量したところ、硫酸化 CNF 基材上で培養した HUEhT-1 細胞では HGF 遺伝子の発現量が増加することが確認された。そのほかにも HepG2 細胞と HUEhT-1 細胞の共培養による肝機能向上の検討も行ったが、細胞数の評価が困難であったことから、今後、それぞれの細胞を識別する色素を保有させた状態で肝機能の評価を行い、肝機能を高度に保持する条件を確定させて、iPS 細胞由来の肝細胞を用いた検討を行うことで、多糖ナノファイバー基材と肝細胞を用いた創薬支援基盤の構築につながると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li Qi, Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Polysaccharide Nanofiber Stabilized Pickering Emulsion Microparticles Induce Pyroptotic Cell Death in Hepatocytes and Kupffer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202207433	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 Tanaka Yuna, Fukuda Naoya, Ranaivoarimanana Naliharifetra Jessica, Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 18
2. 論文標題 Preparation of spherical microparticles composed of cellulose nanofiber and cellulose diacetate via Pickering emulsion templating	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioResources	6. 最初と最後の頁 1482 ~ 1492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15376/biores.18.1.1482-1492	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Qi, Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Biodaptive 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 -

1. 著者名 畠山真由美、原田容子、北岡卓也	4. 巻 45
2. 論文標題 天然多糖のナノ構造が鍵を握る細胞培養基材の新機能創発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 九州大学超顕微解析研究センター報告	6. 最初と最後の頁 155 ~ 156
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 無
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35件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野田朋佳、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 構造多糖ナノファイバー混合基材における動物細胞培養と機能評価
3. 学会等名 繊維学会2022年次大会
4. 発表年 2022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薄膜上での神経系モデル細胞の増殖・分化挙動
3. 学会等名 繊維学会2022年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉啓美、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 リン酸化セルロースナノファイバー基材における動物細胞の培養挙動
3. 学会等名 繊維学会2022年次大会
4. 発表年 2022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よる造血幹細胞のニッチ環境の模倣
3. 学会等名 繊維学会2022年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 ナノセルロース薄膜上における肝ガン細胞の形態および機能変化
3. 学会等名 第89回紙パルプ研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qi Li, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Bioadaptive porous 3D-foam scaffolds comprising cellulose and chitosan nanofibers constructed by Pickering emulsion templating
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田容子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 異なる生体酸性基を導入したナノセルロース混合基材上での動物細胞の増殖・分化挙動
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉啓美、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面リン酸化セルロースナノファイバー基材における骨芽細胞の増殖・分化挙動
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田美子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 造血幹細胞の微小環境模倣に向けたナノセルロースゲル基材の弾性制御
3. 学会等名 セルロース学会第29回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉啓美、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面リン酸化セルロースナノファイバー基材上での骨芽細胞の増殖・分化挙動
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田容子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 生体酸性基を導入したナノセルロース基材上での神経系モデル細胞の増殖・分化挙動
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田美子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 ナノセルロースゲル基材の弾性制御による造血幹細胞の微小環境模倣
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qi Li, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Inflammatory Response of Nanofiber-stabilized Pickering Emulsion and its Application as 3D Porous Scaffolds for Liver Context
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑瀬莉沙、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/キチンナノファイバー混合基材によるTLR2シグナル伝達の活性化
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 甲斐理智、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 構造多糖ナノファイバー基材におけるXeno-freeを志向した間葉系幹細胞の培養
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉啓美、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 表面リン酸化セルロースナノファイバー基材における骨芽細胞の分化誘導制御
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田容子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 生体酸性基導入セルロースナノファイバー基材上での神経系モデル細胞の分化挙動
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田美子、畠山真由美、北岡卓也
2. 発表標題 造血幹細胞の微小環境模倣を志向したTEMPO酸化ナノセルロースゲル基材の弾性制御
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Qi Li, Mayumi Hatakeyama, Takuya Kitaoka
2. 発表標題 Inflammatory response of polysaccharide nanofiber-stabilized Pickering emulsion for liver context
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023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回紙バルブ研究発表会
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 エンスイカン、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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生物資源化学研究室ホームページ 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
---------	---------