

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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500430

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の分化形質転換を誘導するナノ・トレンチ構造培養基板システムの構築

研究課題名（英文） Development of the Novel Nano Trench-Patterned Culture Surface for Initiating Differentiation of Mesenchymal Stem Cell

研究代表者

武田 直也（TAKEDA NAOYA）

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：60338978

研究成果の概要（和文）：従来の生物学的手法（生体シグナル因子添加や遺伝子導入での制御）ではなく、電子線リソグラフィーを基盤に開発したナノスケールの細胞パターンニング基板で培養するだけで、間葉系幹細胞（MSC）を分化誘導する手法を構築した。幅 500 nm の微細な溝状パターンで培養した MSC は、パターンに沿って著しく伸展し核の変形も見出された。さらに、ナノ溝パターンの深さを適切に設定すると、MSC の増殖が抑制されると共に骨や神経の分化マーカー遺伝子の発現が顕著に亢進し、分化誘導を達成した。

研究成果の概要（英文）：The novel cell patterning system was developed by utilizing the electron beam (EB) lithography and the EB-reactive polymer resists. And as a new method, we achieved inducing differentiation of mesenchymal stem cell (MSC) just by culturing at the nano-topographic pattern of a single linear groove in 500 nm width, without transfecting any DNA and/or applying any biosignaling factor like conventional biological methods. MSCs were extraordinarily stretched along the groove, presumably accompanying mechanical stress, and markedly increased gene expression of the neural markers and the osteogenic markers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：電子線リソグラフィー、細胞パターンニング、間葉系幹細胞、分化誘導、人工ニッチ

1. 研究開始当初の背景

多分化能を有する幹細胞（ES 細胞や iPS 細胞、間葉系幹細胞）は、再生医学分野な

どでの活用が大きく期待されている。これら多能性幹細胞を元に移植用などの組織を構築するためには、特定の細胞種への分化誘導

が必須であり、そのための技術開発は世界的に激烈な競争となっている。例えば、骨髄由来の間葉系幹細胞は、発生・分化に関わる Notch 遺伝子を導入しさらに特定のサイトカイン・栄養因子 (bFGF、CNTF、forskolin) を加えることで、神経系細胞へ誘導されることが示されている。しかし、外来遺伝子を細胞に導入しなければならず、臨床応用に向けては安全性の確保が懸念される。

一方、生体内では、細胞の維持・増殖・分化やそれらに基づく生体組織の形成を制御するために、支持細胞や細胞外マトリックスおよび液性因子などから構成される細胞周辺環境 (細胞ニッチ) が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。そこで、このような培養環境を人工的に構築し、遺伝子導入やサイトカインの添加を要せずに幹細胞を分化誘導する技術を開発すれば、従来の分化誘導法の問題点に対する有力な解決策となり得る。よって、この言わば人工細胞ニッチの開発は、将来の再生医学への応用に極めて有用である。さらに、人工ニッチ研究は、細胞周囲環境による細胞機能の制御に関する分子細胞生物学的な理解を一層深め、生体内の細胞ニッチの機構解明にも大きく寄与すると期待される。

2. 研究の目的

独自に構築した電子線リソグラフィ (EB lithography) による細胞パターンニングシステムを応用して、幅 100 nm オーダーの直線状の溝 (トレンチ) 構造パターンを EB 反応性高分子表面に作製する。このナノパターンを微細培養場とし、間葉系幹細胞を接着領域が制限されたこのパターン上で培養するだけで、分化誘導するシステムの確立に取り組む。

間葉系幹細胞は中胚葉由来であるので、筋や骨といった中胚葉由来の組織への分化を評価すると共に、本来は外胚葉由来である神経細胞への分化形質転換誘導 (transdifferentiation) も検討する。

主な検討項目を以下にまとめる。

(1) 分化挙動を、蛍光免疫染色法に加えて RT-PCR による発現遺伝子解析など分子生物学的手法からも明らかにする。

(2) 分化誘導の効率の最大化と機構解明のため、ナノ・溝 (トレンチ) パターン構造の最適化を行うと共に細胞の接着様式や伸展度合いを詳細に解析する。また、抗リン酸抗体による免疫染色により、分化形質転換に関与する細胞内シグナル伝達の解析を試みる。

(3) 細胞には、分化形質が異なると言われていた骨髄由来と胎盤由来の間葉系幹細胞を用い、細胞種の違いによる分化挙動の差異を解析する。

(4) 分化誘導した間葉系幹細胞を実験動物に移植して生体内環境での更なる分化や癌化の有無など細胞挙動を解析し、移植医療での細胞ソースとして有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞の分化誘導効率を最大にするため、ナノ・溝 (トレンチ) パターン幅の条件を最適化する。

(2) 骨や筋ならびに神経など各分化マーカーの発現を、蛍光免疫染色法による解析と RT-PCR 法による遺伝子解析の両面から詳細に検討する。

(3) 分化誘導の機構解明のため、ナノ・溝 (トレンチ) パターンへの細胞接着様式を明らかにする。このため、細胞の接着複合体や接着斑関連タンパク質の局在を、CLSM や TIRF などの顕微鏡観察により詳細に解析する。また、抗リン酸抗体による免疫染色により、分化に関与する細胞内シグナル伝達の解析を試みる。

(4) 胎盤由来と骨髄由来の間葉系幹細胞をナノ・溝 (トレンチ) パターン培養基板上で培養し、細胞種の違いによる分化誘導の差異を比較する。

(5) ナノ・溝 (トレンチ) パターン上で分化形質転換誘導した間葉系幹細胞をラットなどへ移植して生体内での挙動を解析し、移植医療における細胞ソースとしての有効性を検証する。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞の分化を誘導する微細培養場としてのナノ・溝 (トレンチ) パターン基板の構築：

電子線リソグラフィ技術を用いて、ガラス基板上に固定された電子線反応性高分子レジストに一本の細長い溝 (トレンチ) 状のパターンを作製し、微細培養場を用いた。パターンの幅を 100~500 nm とナノレベルでさまざまに変化させ、さらに 1~50 μm とマイクロスケールのパターンも加えて、まずヒト胎盤由来の間葉系幹細胞 (hpMSC) を播種し、これら微少な溝 (トレンチ) パターン上での挙動を観察した。この hpMSC は、いずれのナノ・溝 (トレンチ) パターン上にも接着することが可能であり、細胞の接着率は幅 200 nm から顕著となった。これら細胞は、溝に沿って接着、伸展して、力学的負荷を伴うと考えられる紡錘状の形態を呈した。また、一般的な培養皿での培養と比較して、接着面積の減少、溝に沿ったアクチンフィラメントの配向、核の変形などの特徴も見出された。溝に沿つ

て配列した細胞は単一細胞として存在して隣接する細胞と接着しなかった。このため、従来のパターン基板培養系とは異なり、培養細胞間の接触による情報伝達の影響を排して、基板表面の微細構造が細胞挙動に及ぼす効果のみを評価することが可能となった。一方、幅 5~50 μm のパターン内では細胞が増殖し、細胞同士が密に隣接するコンフルエントの状態となった。

そこで、生体シグナル因子を使用せず、ナノ・溝（トレンチ）パターンで培養するだけで分化誘導が起こるかを評価した。蛍光抗体染色による解析では、播種後 5 日間の培養において、神経分化マーカーである Tuj1 の発現が確認された。そこで、qRT-PCR によって GAPDH の mRNA 発現を基準として Tuj1 の mRNA の相対的発現量を評価した。通常平面培養細胞と比較して幅 500 nm のパターン上で培養した細胞では 1.92 倍の増大が見られ、遺伝子の発現亢進が最も顕著であった。以上より、ナノスケールの微小培養場で通常とは異なる力学的環境において間葉系幹細胞を培養することで、液性因子を用いることなく分化を誘導できることが強く示唆され、その効果は幅 500 nm のパターンで最も顕著となることを見出された。

(2) ナノ・溝（トレンチ）パターン上での分化挙動の詳細な解析：

ナノ・溝（トレンチ）パターン上培養における接着や分化挙動を、hpMSC に加えてヒト骨髄由来 MSC (hbmMSC) についても検討を行い、細胞種による違いを詳細に評価した。パターン幅は、hpMSC での Tuj1 遺伝子発現を顕著に亢進した 500 nm に固定した。

まず、いずれの細胞でも、通常平面培養細胞と比較して、幅 500 nm の溝パターン上で培養した細胞では有意な増殖抑制が観察された。このため、幹細胞の 2 つの能力のうち、自己複製ではなく分化へと活動が傾いていることが推察された。そこで、GAPDH の mRNA 発現を基準とした qRT-PCR による定量的な mRNA 発現解析を行った。hpMSC および hbmMSC のいずれにおいても、神経分化マーカーである nestin ならびに骨分化マーカーである OCN の発現の顕著な亢進が見出された（5 日間培養時で、nestin はそれぞれ約 10 倍と約 7 倍、OCN は約 4 倍と約 3.5 倍）。また、神経細胞の分化系列において、神経幹細胞マーカーの nestin はいずれの MSC で発現亢進しているが、神経前駆細胞ならびに成熟神経細胞マーカーである Tuj1 は hbmMSC では亢進していなかった。すなわち、ナノパターンの微小培養場

で、液性因子を用いることなく分化誘導が可能であること、また分化の方向性は定まっている訳でなく、複数の遺伝子が動いていることが強く示唆された。さらに、hpMSC と hbmMSC の比較においては、Tuj1 の発現の差異が見られ、MSC の種によって分化挙動の異なることを見出された。

(3) ナノ・溝（トレンチ）パターン上での幹細胞分化誘導機構検討と体細胞の挙動制御への拡張：

ナノ・溝（トレンチ）パターンの溝の深さを 100 nm または 400 nm に変化させて、間葉系幹細胞の接着性や分化挙動を比較した。幅は 500 nm に固定した。hpMSC についての qRT-PCR での定量的な mRNA 発現解析では、深さ 400nm において神経分化マーカー nestin および骨分化マーカー OCN の平均発現量が共に 100 nm よりも約 2 倍に増大した。一方、抗 P-paxillin 蛍光免疫染色で評価したパターンへの接着斑形成は、400 nm の方が小さかった。さらに、接着基板からの細胞内へのメカノストレス伝達に関与すると考えられている II 型ミオシンについて、機能阻害剤である blebbistatin を添加しても nestin の遺伝子発現量は顕著に変化しなかった。これらより、これまでに議論のあった「接着斑からアクチンストレスファイバー/ II 型ミオシンを介したメカノストレス伝達」以外の hpMSC 分化誘導機構の存在が示唆された。

ナノ・溝（トレンチ）パターンで培養した間葉系幹細胞は、現時点では特定の細胞種へ完全に分化誘導制御されず、神経や骨の複数の遺伝子発現が亢進することが見出された。そこで、実験動物へ移植することでの移植医療における細胞ソースとしての有効性の検証については、特定細胞種への分化制御が達成するまで延期し、ナノ・溝（トレンチ）パターン上培養による細胞挙動制御について、対象とする細胞種を幹細胞から体細胞へと拡張してさらなる検討を進めた。

体細胞には、中枢神経系におけるグリア細胞の一つであるアストロサイトを選択した。アストロサイトは、*in vivo* では線維状突起を伸長させた星状形態を呈し、グルタミン酸トランスポーター GLT1 の発現が亢進する。一方、通常の *in vitro* 平面培養では広く伸展した形態へと変化し GLT1 発現も低下する。ここで、100 nm 幅のナノ溝パターンを十字に組み合わせたパターン上培養でアストロサイトを疑似星状形態へ誘導すると、GLT1 発現が平面培養との比較で 5.7 倍に増大した。すなわち、体細胞であっても、ナ

ノ溝パターンで培養することでメカノストレスを負荷するまたは形態を操作することにより、分化もしくは形質の変化を誘導し得る可能性を見出した。

(4) 総括・将来展望

独自の電子線リソグラフ加工細胞パターンニングシステムを応用し、接着領域が制限されたこのパターン上で間葉系幹細胞を培養するだけで分化誘導する基板を構築した。また、ナノスケールの直線状溝パターンにおける凹凸形状の違いが、hpMSC の接着性、分化挙動に異なる効果を及ぼすことを見出した。特に、接着斑やストレスファイバーを介したメカノストレス伝達もしくはこれら分子形成の動的な変動が間葉系幹細胞の分化を促進するとの仮説に反し、接着が不十分な微小培養場を構築することで間葉系幹細胞の分化を誘導し得ることを見出した。すなわち、メカノストレスに大きく依存しない新たな幹細胞分化誘導機構の存在を示唆すると共に、微小培養場の新たな設計論を提案した。さらに、ナノ溝パターンでの培養が、幹細胞だけでなく体細胞であるアストロサイトの形質の変化も誘導し得ることを示した。

今後は、間葉系幹細胞については、さらに多くの分化マーカーを対象に分化挙動を網羅的かつ詳細に解析し、特定の細胞種へと分化誘導が可能かを検討していく。また、アストロサイトについては、パターン上培養で遺伝子発現が亢進された GLT1 が、タンパク質レベルでも発現が上がりグルタミン酸取り込み能の機能が增大しているかを解析する。これらの取り組みにより、ナノ・溝（トレンチ）パターン微細培養場の設計をさらに進化させていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Naoya Takeda*, Arisa Urata, Takafumi Inoue, Hideki Nakamura, Differentiation of Astrocyte Induced Just by Culturing on the Star-Like Shaped Nano Pattern, Neuroscience Research, in press, 査読有.
- ② Yoshikuni Edagawa, Jun Nakanishi, Kazuo Yamaguchi, Naoya Takeda*, Spatiotemporally Controlled Navigation of Neurite Outgrowth in Sequential Steps on the Dynamically

Photo-Patternable Surface, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 99, 20-26 (2012), 査読有, DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.09.027.

[学会発表] (計 12 件、うち国際学会 3 件)

- ① Aya Tsubokura, Yoshifumi Kawagishi, Satomi Aoki, Naoya Takeda, Differentiation of Mesenchymal Stem Cell on the Single Line Pattern in Nano-Size Fabricated on the Electron Beam Reactive Mask Material, 2nd International Conference of Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2013), 2013 年 3 月 19-20 日, 茨城.
- ② 裏田亜里沙, 中村秀樹, 井上貴文, 武田直也, ナノパターンでの培養によるアストロサイトの星状形態誘導と遺伝子発現操作の検討, 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 27 日, 宮城.
- ③ 坪倉 彩, 川岸祥史, 武田直也, 電子線リソグラフ加工した高分子表面の微細構造によるヒト間葉系幹細胞の分化誘導, 第 2 回 CSJ 化学フェスタ, 2012 年 10 月 16 日, 東京.
- ④ Naoya Takeda, Yoshifumi Kawagishi, Aya Tsubokura, Arisa Urata, Initiating Differentiation of Stem Cell into Neural Cell on the Nano Grooved Single Line Pattern Fabricated by Electron Beam Lithography, Neuroscience 2012, 2012 年 10 月 14 日, New Orleans, USA.
- ⑤ 裏田亜里沙, 中村秀樹, 川岸祥史, 坪倉 彩, 井上貴文, 武田直也, 電子線リソグラフ加工高分子レジスト基板を用いたナノ微細培養場での細胞の分化および機能操作, 第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 20 日, 愛知.
- ⑥ Aya Tsubokura, Yoshifumi Kawagishi, Arisa Urata, Naoya Takeda, Differentiation of Mesenchymal Stem Cells with Culturing on the Nano-Structured Biointerfaces Fabricated by Electron Beam Lithography, IACIS 2012 (International Association of Colloid and Interface Scientists Conference), 2012 年 5 月 15 日, 宮城.
- ⑦ 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, 電子線リソグラフ微細パターンへの接着・伸展による間葉系幹細胞の分化誘導, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011 年 11 月 22 日, 京都.
- ⑧ 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, ナノ

微細加工パターン培養での液性因子を用いない間葉系幹細胞の分化の検討, 第1回CSJ化学フェスタ —2011世界化学年記念大会—, 2011年11月14日, 東京.

- ⑨ 武田直也, 電子線リソグラフ微細パターンによる細胞の運動制御と分化誘導 (Micro/Nano Topography by Electron Beam Lithography to Manipulate Cell Migration and Differentiation), 第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日, 京都.
- ⑩ 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, 一本の微細な細長い溝 (トレンチ) 状ナノパターンでの培養による間葉系幹細胞の分化の検討, 第10回日本再生医療学会総会, 2011年3月2日, 東京.
- ⑪ 裏田亜里沙, 吉野修弘, 武田直也, 電子線リソグラフィを用いたマイクロ・ナノパターンニング培養基板の構築と細胞のナノ構造認識の評価 (Fabrication of Cell Patterning System with Micro-Nano Resolution by Electron Beam Lithography and Adhesion of Single Cell on the Nano Structure), 第20回インテリジェント材料/システムシンポジウム (および第5回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム), 2011年1月6日, 東京.
- ⑫ 武田直也, 吉野修弘, 枝川義邦, 島本直伸, 新規なナノリソグラフィ培養表面での細胞突起の高精細なパターンニングと神経系細胞のネットワーク構築 (Navigation of Neurite Elongation and Fabrication of the Networks of Neural Cells with Fine Resolution on the Novel Cell Culture Surface Patterned by Electron Beam Lithography), Neuro2010 (第33回日本神経科学大会), 2010年9月4日, 兵庫.

[その他]

学会受賞 (学生発表) (計3件)

- ① ICBS2013 Biomaterials Science Poster Prize (sponsored by RSC Publishing) : Aya Tsubokura, Yoshifumi Kawagishi, Satomi Aoki, Naoya Takeda, 2nd International Conference of Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2013), 2013.
- ② 優秀ポスター発表賞: 坪倉 彩, 川岸祥史, 武田直也, 第2回CSJ化学フェスタ, 2012.
- ③ 優秀ポスター発表賞: 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, 第1回CSJ化学フェスタ—2011世界化学年記念大会—, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 直也 (TAKEDA NAOYA)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号: 60338978