

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792282  
 研究課題名（和文） 無血清培地において自己組織化単分子膜が間葉系幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響  
 研究課題名（英文） Effect of mesenchymal stem cells proliferation and differentiation on self-assembled monolayer using serum-free medium.  
 研究代表者  
 平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)  
 広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
 研究者番号：40346507

研究成果の概要（和文）：本研究は、mixed SAM 基板を作製・培養基板とし、無血清培地を用いることにより、化学的に規定された培養基板・培養液中での細胞培養を行った。本培養系は、適切な化学組成を有する培養皿と無血清培養液を組み合わせることによって、増殖や分化などの培養効率を向上することができ、細胞生物学や再生医療に顕著な進歩をもたらすものと期待される。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study is fabrication of chemically-defined cell culture system using a mixed SAM substrate and a serum-free culture medium. By combining a serum-free culture medium and culture plate having a suitable chemical composition, the present culture system, which it is possible to improve the culture efficiency of such proliferation and differentiation, leading to significant advances in regenerative medicine and cell biology.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生医学、表面・界面物性、細胞・組織、間葉系幹細胞、自己組織化単分子膜

## 1. 研究開始当初の背景

現在、多能性幹細胞 (iPS cells; induced Pluripotent Stem cells) や胚性幹細胞 (ES cells; Embryonic Stem cells)、そして幹葉系幹細胞 (MSC) をはじめとする幹細胞を用いた再生医療が注目を集めている。これらの幹細胞を用いて肝硬変 (肝細胞)・糖尿病 (膵内分泌細胞)・歯周病 (顎骨・歯槽骨)・変形性関節症 (軟骨)・脊髄損傷 (中枢神経細胞) などの難治性疾患の治療を目指す研究が全世界で行われている。その中でも、患者自身

の体組織から採取・分離が可能な MSC は、骨・軟骨・脂肪等への分化能が知られており、ES 細胞のような倫理的な問題がなく、また、iPS 細胞のような遺伝子導入や特別な処理が不要なため、最も再生医療の事業化に近い細胞である。

MSC は骨髄・骨膜・口腔組織などから容易に取得可能であり、なおかつ未分化の MSC はそのまま顎骨・歯槽骨などの組織再生に用いることができる。しかしながら、骨組織再生には大量の MSC が必要となるが、取得した組

組織細胞中の MSC は 1 万～ 10 万分の 1 と非常に少ない。また、患者の身体的負荷より MSC を含む組織の取得量は少ないことが望まれる。そのため、MSC の分離および短期間で大量に培養する技術が求められている。

## 2. 研究の目的

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) を無血清培地を用いて、表面特性が厳密に制御された自己組織化単分子膜 (SAM) 基板上における MSC の増殖・分化の能力評価を行い、MSC の培養に最適な表面状態を求める。

細胞培養における表面因子の研究は、1980 年代には幅広く行われていたが、その当時は高度な表面解析装置や表面処理技術が未成熟であった。その後、細胞培養技術は生化学・分子生物学の進歩により優れた培地や添加剤が開発され飛躍的な発展をしたが、それに対する物理化学をベースとした表面因子と生体適合性の研究、すなわち材料と生体分子・細胞・組織との間のバイオインターフェースの評価は前者と比較して遅れ気味となっている。

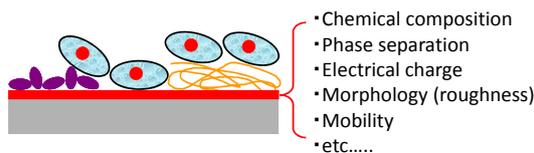


図 1 生体適合性を左右する表面因子

細胞接着・増殖率を決める表面因子は、表面の官能基の比率・相分離・可動性・粗さなど複数あり、それぞれの因子毎に細胞・生体分子との反応性が大きく変化する (図 1)。また、表面因子が同じであっても細胞・組織ごとに接着・増殖・分化能が異なる。故に、医用材料と生体間の相互作用を調べる上では、上記の因子に照らし合わせて表面状態を細かく調べる必要がある。

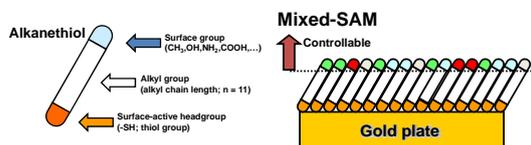


図 2 アルカンチオールと自己組織化単分子膜 (SAM)

SAM は、チオール基と金の吸着性とアルキル鎖間の分子間引力により金表面に生じるアルカンチオールの単分子膜である (図 2)。表面官能基の異なるアルカンチオールを混

合することにより作製した混合 SAM 基板は ① 表面組成を変化させることによって細胞の接着・増殖をコントロールでき、② 同じ表面組成をもつ材料表面でも細胞ごとにその増殖パターンに違いがみられた (科研若手 (B) 18700428: 表面因子アレイチップを用いたバイオインターフェースの迅速解析システムの開発) (図 3)。これらの結果から、必要となる細胞の接着・増殖に特化し、なおかつ不必要な細胞の接着・増殖を抑制する表面組成に制御された生体材料を開発・改良する指針となることが示された。

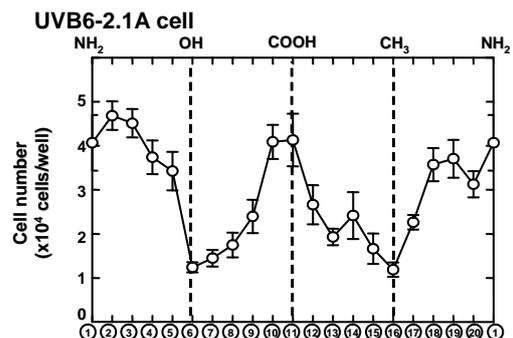
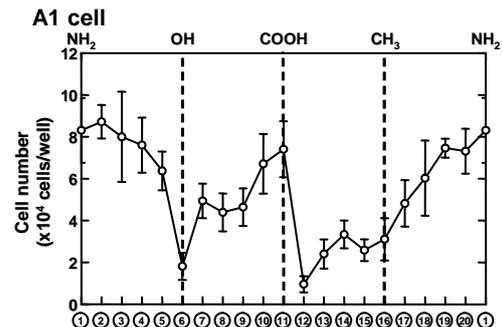


図 3 混合 SAM 上での細胞増殖パターン

よって、本研究は申請者のこれまで培った技術をもとに、表面特性が厳密に制御された SAM 基板上における MSC の増殖・分化の能力評価を無血清培地を用いて行い、MSC の培養に特化した表面状態を求めることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) ナノレベルで制御された表面官能基被覆層を有する SAM モデル表面の作製

・末端に水酸基・メチル基・カルボキシル基・アミノ基などを有するアルカンチオールを用いて、様々な割合の表面官能基を有する SAM モデル表面基板を作製した (図 4)。

・ナノレベルで制御された SAM モデル表面基板の濡れ性・組成などの評価を水接触角測定装置・ESCA で行い、表面状態を厳密に解析した。

No 1.	NH <sub>2</sub>	= 100
No 2.	NH <sub>2</sub> : OH	= 80 : 20
No 3.	NH <sub>2</sub> : OH	= 60 : 40
No 4.	NH <sub>2</sub> : OH	= 40 : 60
No 5.	NH <sub>2</sub> : OH	= 20 : 80
No 6.	OH	= 100
No 7.	OH : COOH	= 80 : 20
No 8.	OH : COOH	= 60 : 40
No 9.	OH : COOH	= 40 : 60
No 10.	OH : COOH	= 20 : 80
No 11.	COOH	= 100
No 12.	COOH : CH <sub>3</sub>	= 80 : 20
No 13.	COOH : CH <sub>3</sub>	= 60 : 40
No 14.	COOH : CH <sub>3</sub>	= 40 : 60
No 15.	COOH : CH <sub>3</sub>	= 20 : 80
No 16.	CH <sub>3</sub>	= 100
No 17.	CH <sub>3</sub> : NH <sub>2</sub>	= 20 : 80
No 18.	CH <sub>3</sub> : NH <sub>2</sub>	= 40 : 60
No 19.	CH <sub>3</sub> : NH <sub>2</sub>	= 60 : 40
No 20.	CH <sub>3</sub> : NH <sub>2</sub>	= 80 : 20

図4 混合SAM作製に用いるアルカンチオール溶液の混合比

(2) SAMモデル表面上での生体分子相互作用のリアルタイム解析

・自作・改良を施した表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析装置を用いて、無血清培地中に含まれる生体分子とSAMモデル表面基板との吸着・脱離過程の解析を行い、表面因子に対する生体分子の吸着パターンを求めた。

(3) SAMモデル表面上でのヒト・マウスMSCの接着・増殖・分化状態の検討

・表面特性や生体分子相互作用が厳密に解析されたSAMモデル表面上でのマウスおよびヒトMSCの接着・増殖・分化状態の反応パターンを測定した。

#### 4. 研究成果

混合SAMの表面組成は、最外層の官能基の組成比により親水性・疎水性および正負の静電荷電を自由に調節できると考えられる (図5)。

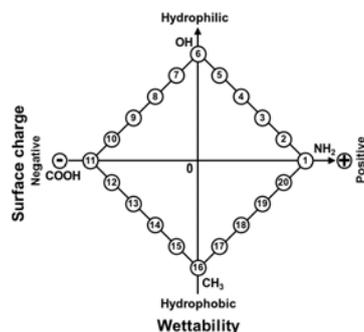


図5 混合SAMの最外層表面の状態図

これらの混合SAM表面の最外層官能基の組成比をESCAで測定したところ、アルカンチオール溶液調製比とほぼ対応した組成比となった (図6)。このことから、混合SAMの最外層官能基の比率調整は、アルカンチオール溶液調製比を調整することで容易にできることが可能であることが示唆された。

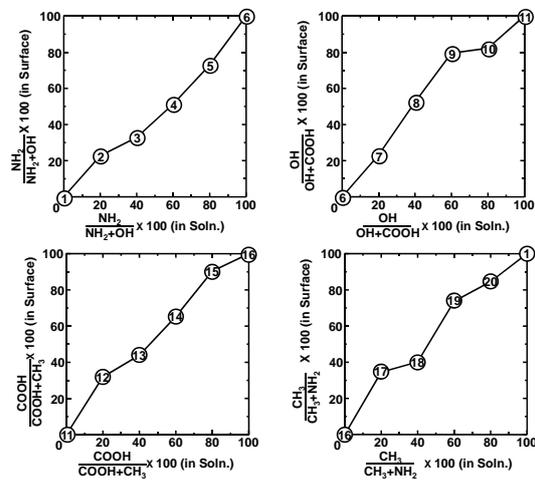


図6 アルカンチオールの溶液比と表面官能基の比率の関係

つぎに、濡れ接触角を測定したところ、表面の親水・疎水官能基に対応するような濡れ性のパターンが得られた (図7)。

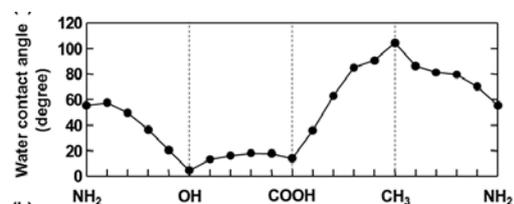


図7 混合SAM上での濡れ接触角パターン

またこの結果から示されるように、表面官能基組成がNo4とNo12のように全く異なっても、同じ濡れ性を示す状態があることを強く示した。

細胞培養において、細胞培養皿の表面は培養液に含まれる様々な血清成分に暴露されることにより、まず液中成分 (主にタンパク質) の吸着を生じ、次にそのタンパク吸着層上に細胞が接着する。成分が規定化された無血清培養液も液中に様々なタンパク質を含んでおり、これらも血清培養液と同様に表面に吸着する。混合SAM上に無血清培養液を暴露することで吸着するタンパク質量をSPRで測定した (図8)。

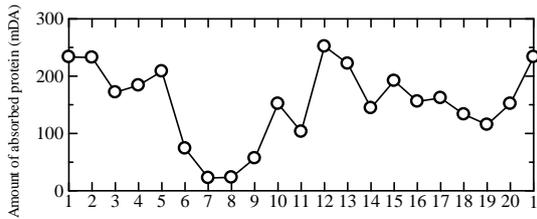


図8 混合SAM基板上への無血清培養液中のタンパク質吸着

タンパク質吸着量のパターンは濡れ性のパターンとおおよそ似た状態を示し、No7 および No8 の水酸基とカルボキシル基の混合 SAM 上でもっともタンパク質の吸着量が低くなることが示された。

混合 SAM 基板上での MSC 培養を血清培養液および無血清培養液で行ったところ、細胞増殖パターンは全く異なっていることが示された (図9)。

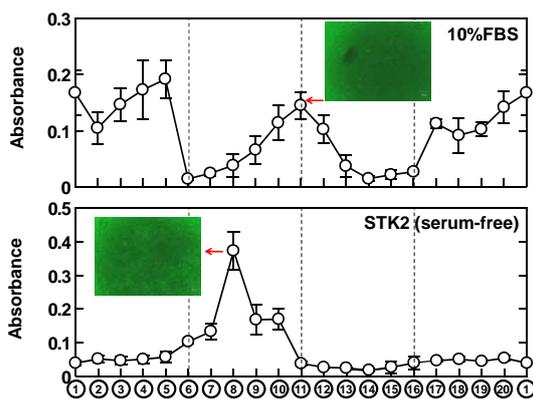


図9 混合SAM基板における血清培養液および無血清培養液中でのMSCの増殖数

血清培養液において、細胞増殖数はカルボキシル基単体の No11 を中心とした山およびアミノ基が混合している No17-20 および No1-5 に偏った。これは血清培養液中における MSC 増殖数は表面に含まれるネガティブチャージのカルボキシル基の量に依存するパターンと、ある程度の量のポジティブチャージのアミノ基が含まれていればそれなりに増殖することがわかった。このことより血清培養液中においては基板表面にポジティブもしくはネガティブチャージを有することが必要になることを示した。

対して、無血清培養液中での細胞増殖パターンは血清培養液と全く異なっていた。増殖のピークも No8 近傍に集中し、No6-10 以外ではほとんど細胞の接着・増殖はみられなかった。No8 は無血清培養液中のタンパク質吸着量が

最も低かった結果からも鑑み、No8 は限られた吸着タンパク質が MSC 接着・増殖に効率よく働き、それ以外では細胞接着・増殖を抑止するタンパク質がついてしまったからだと考えられる。また、MSC のプライマリー培養において No8 においては一般に用いられている細胞培養皿よりもきわめて高い細胞増殖能を有することも示された (図10)。

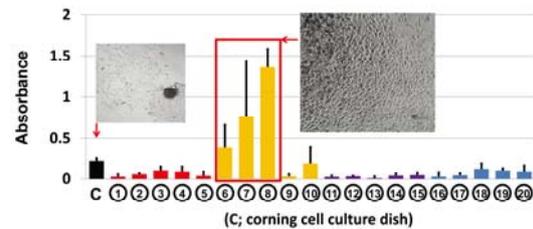


図10 混合SAMの無血清培養液中でのプライマリーMSC増殖 (コントロール; コーニング製培養皿)

水酸基単体の No6 も細胞・増殖が確認できたので、No6 と No8 での MSC 接着をレーザー強焦点顕微鏡で観察した (データ未提示)。細胞骨格のアクチン、接着斑に現れるピンキュリン、核を蛍光染色し、像を観察したところ、No6 の方が No8 よりも細胞接着斑がはっきりと出ており、これより細胞接着能は No6 のほうが No8 よりも高いことが示された。これより、細胞増殖能が高い No8 は、細胞接着能を有するタンパク質の吸着が No6 よりも低いが、それ故に細胞増殖能が向上したと考えられる。別データとして細胞接着ペプチドである RGD を導入した混合 SAM でも同様の実験を行ったところ、強い細胞接着能ときわめて低い細胞増殖能を確認した (データ未提示)。これらのことより、無血清培養液中においての MSC の培養は、細胞増殖能を有しつつ、細胞接着能をある程度落とした表面官能基状態を有する細胞培養基板を用いることで、特異的に細胞増殖数を向上させることが強く示唆できた。

No8 の混合 SAM での MSC の軟骨および脂肪分化を行ったところ図11 および図12の結果を得た。

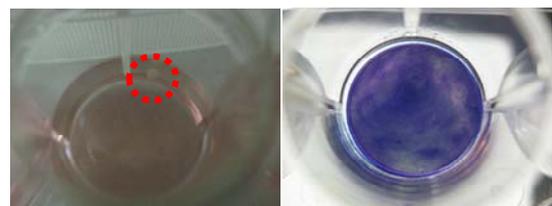


図11 無血清培養液中でのMSCの軟骨分化 (左; 一般培養皿, 右; No8 混合SAM) 一般培養皿では凝集塊, No8 ではシート状

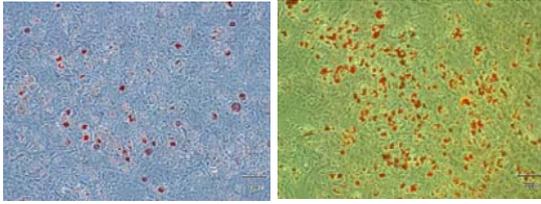


図 12 無血清培養液中での MSC の脂肪分化  
(左；一般培養皿、右；No8 混合 SAM)

一般培養皿と比較して、No8 の混合 SAM 上では軟骨および脂肪細胞への分化は効率よく行われた。特筆すべき点として、No8 表面上での軟骨分化は一般的な凝集塊ではなく未分化の細胞と同じくシート状で行われた点にある。軟骨細胞は代謝能が低く、外部に細胞外マトリックスを形成するため、細胞自体の大量培養が難しい細胞であるが、No8 だと効率よく大量に軟骨分化細胞を得られる可能性があることが示された。

再生医療の実現において必要な細胞の大量培養および培養期間の短縮は極めて重要な課題である。MSC の培養に特化した無血清培地はすでに開発・使用されているが、本研究で得られた MSC の培養・分化に特化した表面状態と組み合わせることにより、この課題をさらに改善し、MSC を用いた再生医療の研究を産業化レベルまで引き上げることが期待できる。また、本培養系は、適切な化学組成を有する培養皿と無血清培養液を組み合わせることによって、各種の細胞に対して、完全に規定された培養システムを提供することに初めて成功した。これは、細胞生物学や再生医療に顕著な進歩をもたらすものと期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. Hirata I., Saskianti T., Kanawa M., Kawamoto T., Kato K., Kato Y. : Evaluation between Surface Chemical Composition and Cell Proliferation using Mixed Self-Assembled Monolayers: 9th World Biomaterials Congress, 1-5 Jun 2012, Chengdu China.

2. 加藤幸夫, 平田伊佐雄 : 培養環境全体の完全化学規定化 : 臨床で有用な高性能ヒト幹細胞の供給 : BIOTECH 2012: 第 11 回 国際バイオテクノロジー展/技術会議, 4 月 25-27 日 2012 東京.

3. 平田伊佐雄, Tania Saskianti, 金輪真佐美, 河本 健, 加藤功一, 加藤幸夫 : 化学的に規定された培養液と培養基板での幹葉系幹細胞の増殖の向上 : 第 25 回日本軟骨代謝学会, 3 月 9-10 日 2012 名古屋.

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号 : 40346507

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :