

## 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 4月19日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23850009

 研究課題名（和文） ナノファイバーを用いたバイオハイブリッド材料の創製と  
幹細胞の微小環境制御

 研究課題名（英文） Development of bio-hybrid scaffold by using nanofibers and  
microenvironmental control of stem cells

研究代表者

藤田 聡 (FUJITA SATOSHI)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60504652

研究成果の概要（和文）：

本研究では、幹細胞の培養の足場に適したバイオハイブリッド材料の創製を目的に、異方性構造を有するナノファイバー基材上での間葉系幹細胞の分化制御をおこなった。生体組織の微小環境はナノメートルサイズの繊維構造が配向した構造から成る細胞外マトリクスで構成されていることから、配向性を有したナノファイバーに着目した。細胞としては、造血支持能を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を用いた。まず、エレクトロスピンニング法を用いて、配向性の異なるナノファイバー基材を作製し、この上での細胞分化挙動への影響を検討した。その結果、配向性の違いによって分化が異なることを見出した。さらに高密度培養を可能とする足場材料への展開を目的に、配向性ナノファイバー基材の積層により3次元培養をおこなった。その結果、厚みがありかつ異方性を有するバイオハイブリッド材料の構築に成功した。得られたバイオハイブリッド材料は、幹細胞の高密度培養足場への応用が期待された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have tried to control of the differentiation of mesenchymal stem cells on the bio-hybrid scaffold with anisotropic geometry to develop nanofiber scaffold for the culture of stem cells. We focused on nanofibers with anisotropy because the microenvironment of living tissues is composed of extracellular matrices which have aligned and nanometer-sized fibrous structures. We have used mesenchymal stem cells (MSC) derived from human bone marrow because they have hematopoietic support activity. First, we have examined the geometric effect of cell differentiation on anisotropic nanofibers fabricated by electrospinning method. As a result, we have found that the fiber alignment affected the MSC differentiation. Then, we have cultured cells on the three-dimensional scaffold by overlaying the anisotropic nanofiber scaffold to apply the scaffold to high-density culture. As a result, we have successfully built thick bio-hybrid scaffold with anisotropy. The bio-hybrid scaffold that we have created was expected for the application of high dense culture of stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：機能材料・デバイス

キーワード：ナノファイバー、生体材料、幹細胞、増殖、分化

### 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、白血病などの難治性血液疾患の治療や次世代の再生医療に有効な細胞ソースとして期待されている。造血幹細胞は骨髄や臍帯血から採取されるが、ドナー不足や一度に少量しか採取されないという課題がある。この問題を根本的に解決するために、造血幹細胞の効率的な増幅培養手法が強く望まれている。しかしながら、その未分化能を維持したまま増幅することは、今なお実現していない。造血幹細胞は、生体では骨髄中に局在し、その周辺環境は細胞外マトリクスと呼ばれる構造から構成されている。細胞外マトリクスは、コラーゲンなどのタンパク質や、グルコサミノグルカンなどの多糖類から成るナノサイズの繊維状の構造を有する。これらの細胞外マトリクス中には、間葉系細胞 (MSC) が存在し、さまざまなサイトカインや成長因子などの生理活性物質を分泌している。したがって、骨髄中のこうした構造を模倣することで、造血幹細胞の効率よい増幅が期待される。

ハイドロゲルや多孔体などの3次元環境を利用した培養環境についてはこれまでも報告されている。一方で、支持細胞との共培養系も血液細胞の培養ではよく知られた手法である。しかしながら、両者を統合し、支持細胞との共培養系を3次元培養系に拡張して造血幹細胞の増幅に応用しようという試みは、その有効性がこれまでほとんど示されてこなかった。その理由は、細胞の配向や液性因子の担持という観点からの根拠に立脚した材料設計が行われなかったからと考えられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、合理的な設計根拠をもとにナノファイバー上でMSCをハイブリッドさせ、造血幹細胞の増殖を制御する因子を担持させた材料の創製を目指す。これにより従来達成され得なかった、造血幹細胞の効率的な増幅を可能とする培養基材の構築が期待される。臍帯血由来造血幹細胞は、難治性の血液疾患の移植治療に用いられているが、細胞数の不足から移植が適用されないケースも多い。本課題で創製する基材で培養することで、こうした患者の救命にもつなげられると期待される。

今回、この目的に適したナノファイバー基材を開発すべく、配向性の異なるナノファイバー基材上でMSCの増殖および分化を評価

し、さらにこの基材を用いて3次元培養への展開をおこなった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 配向性ナノファイバー基材の作製

エレクトロスピンニング法を用いて、ポリウレタン溶液からナノファイバーを基板上に作製した。配向性を有するファイバーはコレクタ回転速度をコントロールして紡糸することで作製した (図1)。

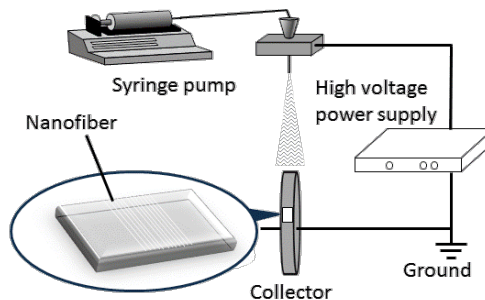


図1 エレクトロスピンニング装置の概略図

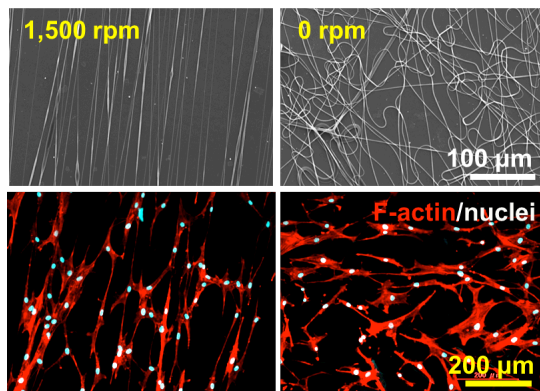


図2 ファイバーの電子顕微鏡像およびファイバー上での細胞の伸展

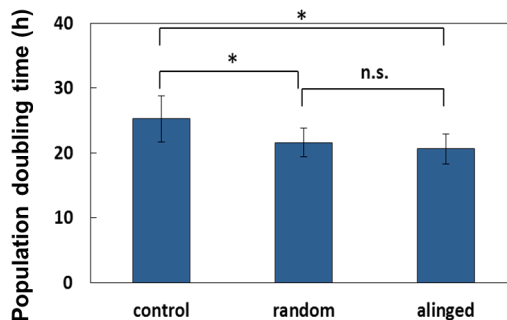


図3 ファイバー上での細胞増殖

(2) 配向性ナノファイバー基材での MSC の伸展・増殖

作製したナノファイバーに酸素プラズマ処理を施したのち、MSC を播種し、インキュベータ内で培養した。播種後 24h、48h に F-アクチンおよび細胞核を染色し (図 2)、その蛍光画像より細胞数及び細胞の伸展面積・方向を定量した。また、細胞数の増加から倍加時間を算出した (図 3)。

(3) ナノファイバー基材上での MSC の分化

ナノファイバー基材に酸素プラズマ処理を施したのち、MSC を播種し、6 時間後に、脂肪細胞誘導培地と骨芽細胞誘導培地に培地交換し、分化誘導を開始した。分化 7 日後に脂肪細胞は Oil Red-O 染色で、骨芽細胞は ALP 染色で細胞の分化を観察した (図 4、5)。分化 1、3 日後に RT-PCR でそれぞれの細胞の遺伝子発現を調べた (図 6)。さらに DNA マイクロアレイにより配向性基材上で特異的に発現する遺伝子をスクリーニングした。

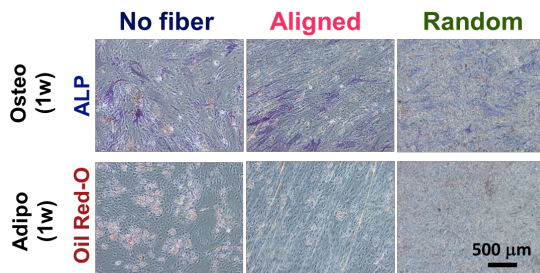


図4 配向性ナノファイバー基材上での間葉系幹細胞分化

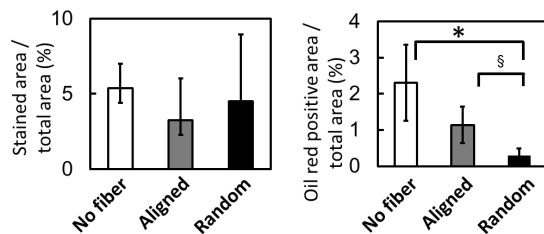


図5 配向性ナノファイバー基材上での分化方向の選択性

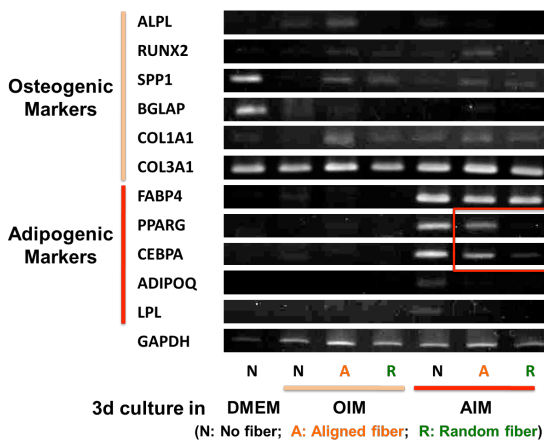


図6 配向性ナノファイバー基材上での分化(RT-PCR)。

(4) 三次元足場基材の開発

レーザー加工機を用いて、PMMA 板を加工し、積層用の細胞培養基材を作製した。これは、ポリカプロラクトンナノファイバーを担持した足場基材と、それを固定するための治具から成る (図 7)。

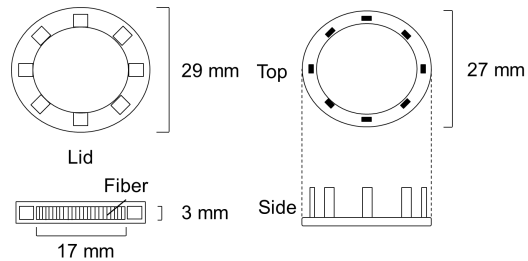


図7 積層用3次元培養基材の設計

(5) 足場基材上での細胞培養

作製した足場基材に酸素プラズマ処理を施した後、マウス由来筋芽細胞 C2C12 を播種した。細胞が接着後、足場基材を治具にセットし培養を行った。培養 48 時間後、ファイバー足場基材 2 層を直交する方向に積層し、培養を行った。培養後、カルセインおよび PI で免疫染色し観察を行った (図 8)。

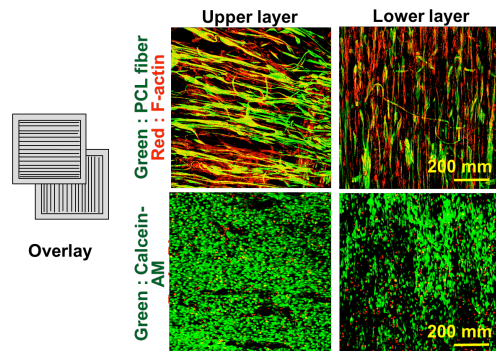


図8 積層ファイバー基材を用いた厚みのある培養

#### 4. 研究成果

MSC は配向性を有するファイバー上では、細胞もファイバー同様に一方方向に揃って配向していたのに対し、ランダムなファイバー上では細胞にも方向性はみられなかった。また細胞の面積は倍加時間と相関がなかったのに対し、ファイバーの配向性は細胞の増殖と相関がみられた。細胞の向きが一定方向に揃い、伸展することで細胞の増殖速度が向上したものと推測される。

骨芽細胞への分化は、配向性を有するナノファイバーおよびランダムなナノファイバー上では、差はみられなかった。一方、脂肪細胞への分化は、ランダムなナノファイバー上では分化培地にかかわらず、分化が抑制された。RT-PCR でも同様の分化マーカーの発現パターンがみられた。

したがって、ランダムなファイバー上では

間葉系幹細胞は骨芽細胞と脂肪細胞の両方の方向への分化が誘導されるが、配向性を有するナノファイバー上では、骨芽細胞方向への選択的な分化が起こることを示している。骨芽細胞は、造血幹細胞の足場として有用であるため、配向性を遊羽するナノファイバースキャフォールドは造血幹細胞の足場材料としても期待できる。DNA マイクロアレイの結果では、インターロイキン等の分泌性のタンパク質の発現が足場基材の配向性に影響されることを見出した。

さらに、ナノファイバー基材を積層することで、厚みのある培養基材を構築できることを示した。ここまでの知見により、造血幹細胞の高密度培養に適した足場材料をうまく構築できる可能性を見出した。

#### 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 1 件)

1. S. Fujita, H. Shimizu, S. Suye. Control of Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Altering the Geometry of Nanofibers. J. Nanotechnol. 査読有, 2012, Article ID 429890, 2012.

[学会発表] (計 20 件)

1. 藤田聡, ナノファイバーによる細胞形状の制御と医用材料への応用, 大学発・選り抜きバイオセミナー, 東京, 2013. 3. 15.  
2. 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, エレクトロスピンニング法によるカラーゲンナノファイバーの作製における溶媒の検討, 第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 金沢市, 2012. 12. 25.  
3. 久野大地, 吉村英晃, 坂元博昭, 末信一朗, 藤田聡, 筋芽細胞の増殖に対するナノファイバーの配向性の影響の解析, 第 1 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 金沢市, 2012. 12. 25.  
4. 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, ナノファイバーの配向性に基いた間葉系幹細胞の分化方向の制御, 平成 23 年度日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会準備会, 福井市, 2011. 12. 22.  
5. 藤田聡, 高分子ナノファイバーの再生医療への応用, 第 2 回医薬・バイオ応用を目指した高分子ナノ構造研究会, 高岡市, 2012. 11. 21.  
6. 吉村英晃, 坂元博昭, 末信一朗, 藤田聡, 三次元培養を可能とした積層技術の開発, 第 61 回高分子学会北陸支部研究発表会, 福井市, 2012. 11. 18.  
7. 藤田聡, 荻原裕佑, 木村絵里, 末信一朗, 岩田博夫, 細胞外マトリクスのモデルとし

てのナノファイバー, 平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会, 福井市, 2012. 9. 25.

8. 吉村英晃, 鈴木智也, 末信一朗, 藤田聡, 配向性を有したナノファイバー上での筋芽細胞の増殖および分化, 平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会, 福井市, 2012. 9. 25.

9. 清水遥絵, 藤田聡, 末信一朗, 配向性を有したナノファイバー上での間葉系幹細胞の分化制御, 平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会, 福井市, 2012. 9. 25.

10. S. Fujita, H. Yoshimura, H. Shimizu, S. Suye, Cell behavior on nanofiber scaffold with different geometry, 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, 2012. 9. 6.

11. 吉村英晃, 鈴木智也, 坂元博昭, 末信一朗, 藤田聡, ナノファイバー上で培養した筋芽細胞の分化挙動の解析, 第 43 回繊維学会夏季セミナー, 奈良市, 2012. 8. 8.

12. 吉村英晃, 清水遥絵, 鈴木智也, 末信一朗, 藤田聡, 配向性の異なるナノファイバー上での細胞の増殖および分化の解析, 第 41 回医用高分子シンポジウム, 東京, 2012. 6. 25.

13. 藤田聡, 吉村英晃, 清水遥絵, 末信一朗, 幾何構造の異なるナノファイバー基材上で培養した間葉系幹細胞の挙動, 第 23 回プラスチック成形加工学会年次大会, 東京, 2012. 6. 12.

14. 藤田聡, 吉村英晃, 清水遥絵, 末信一朗, 間葉系幹細胞の挙動に対するナノファイバーの配向性の影響, 平成 24 年度繊維学会年次大会, 東京, 2012. 6. 6.

15. 清水遥絵, 藤田聡, 末信一朗, 間葉系幹細胞の分化制御を可能とするナノファイバーの幾何構造の影響の検討, 第 61 回高分子学会年次大会, 横浜市, 2012. 5. 29.

16. 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 培養基材の幾何学的性質が細胞挙動へ与える影響の解析, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都市, 2012. 3. 24.

17. H. Shimizu, S. Suye, S. Fujita, Control of the commitment of mesenchymal stem cells on nanofiber scaffold, Winter Workshop on Biotechnology for SS-SV, Program in University of Fukui, Fukui, 2012. 1. 27.

18. H. Shimizu, S. Suye, S. Fujita, Control of the commitment of mesenchymal stem cells on nanofiber scaffold, Taiwan-Japan Joint Workshop on Biomedicine & Biomaterials, Taichung, 2012. 1. 7.

19. S. Fujita, Cell behavior on nanofiber scaffold with different geometry, Winter Workshop on Biotechnology for SS-SV, Program in University of Fukui, Fukui, 2012. 1. 7.

20. 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, ナノファイバーの配向性に基づいた間葉系幹細胞の分化方向の制御, 平成23年度日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会準備会, 福井市, 2011.12.22

[その他]

ホームページ

<http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/bioeng/suye/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 聡 (FUJITA SATOSHI)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 60504652