

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590365

研究課題名(和文) 移植用の高機能細胞凝集体の調製

研究課題名(英文) Preparation of functional cell aggregates for transplantation

研究代表者

平井 洋平 (Hirai, Yohei)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：00397572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、幹細胞(アクセプター細胞)の分化環境を提供する細胞(ドナー細胞)を作製し、三次的共培養でアクセプター細胞の分化・形態を制御し、ドナー細胞を除去して移植用の高機能細胞凝集体を調製することを目指した。アクセプター細胞の前処理やドナー細胞の選択・加工(種々の因子の強制発現)は予定通りに完成し、共培養によるアクセプター細胞の分化誘導も確認できたが、ドナー細胞の完全除去は困難を極めた。そこで、ドナー細胞が提供する因子をアクセプター細胞に発現調節可能な形で直接導入し、それをを用いて高機能のアクセプター細胞集合体(心筋、表皮、軟骨、乳腺上皮)を調製した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at the establishment of effective methods to prepare the functional cell aggregates by 1) generating cells (donor cells) that provide appropriate microenvironment for the functional differentiation of stem cells (acceptor cells), 2) co-culture with donor and acceptor cells in three dimensional cell aggregates, and 3) effective removal of the donor cells. The processes of step 1 and 2 have been successful, however, the selective elimination of the donor cells (step 3) appeared to be difficult. Thus, an alternative approach was carried out, that is, the preparation of acceptor cells in which genes of proteins from the donor cells responsible for differentiation-induction were expressed under the strict control with tetracycline. By this approach, cell aggregates composed of functional cells, including cardiomyocytes, keratinocytes, chondrocytes and mammary epithelial cells, were prepared.

研究分野：細胞生物学、再生医学

キーワード：細胞・組織 再生医学 生体機能利用 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞などの万能細胞を特定の機能細胞に分化させ、それらを移植することで疾患治療を目指す再生医療は次世代の中心医療になり得ると期待されている。しかし、移植細胞が生体組織に効率よく生着し生命活動に参加するためには、細胞を予め(バラバラに単離された状態ではなく)細胞塊として一定構造を形成させておくことが有効である。

2. 研究の目的

本研究では、未分化細胞の分化を支持する細胞を用いて万能細胞を3次元の細胞集合体として効率よく分化誘導し、その後、万能細胞由来の機能細胞のみを残し、分化を支持した細胞を選択的に除去する技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

機能細胞のもとになる未分化細胞をアクセプター細胞、また、アクセプター細胞の分化を支持する細胞をドナー細胞と位置付け、以下の3つの観点で(アクセプター細胞由来の)機能細胞の集合体調製法を検討した。

(1)ドナー細胞の調製：生体外で細胞分化を支持する胎児由来細胞や、未分化細胞の分化誘導環境を提供するとされる細胞に、アクセプター細胞の形態・成熟を制御するエピモルフィン(とそのファミリー蛋白)等の遺伝子を導入し、アクセプター細胞の分化誘導に必要な3次元の微小環境創成を行う。エピモルフィンやそのファミリー蛋白質は一部が外部刺激に反応して細胞外に呈示され機能を発揮することから、これらの遺伝子はシグナルペプチドを付加してドナー細胞に導入する。また、導入遺伝子の人工的な発現誘導・抑制を行うためにテトラサイクリン誘導システムを用いて精密な分化制御環境の調製を試みる。

(2)(1)で創成した3次元の微小環境にアクセプター細胞の凝集体を組み入れてその分化状態を高精度に制御する。アクセプター細胞としては、ES細胞やiPS細胞の他、各種テラトカルシノーマ細胞や分化誘導可能な細胞をモデルとして取り上げた。ドナー細胞とアク

セプター細胞の3次元共培養は、両者をバラバラの状態ですら混合し、遠心操作で得た細胞塊を多孔性膜上で培養するか、もしくは、非接着処理されたプレート上で浮遊培養することで実施する。

(3)(2)の共培養系からドナー細胞を選択的に除去することでアクセプター由来の機能細胞凝集体の純化を試みる。ドナー細胞の選択的な除去は、アクセプター細胞に予め薬剤耐性遺伝子を発現させ分化後に薬剤処理を行うことを想定した。

4. 研究成果

(1)ドナー細胞に、エピモルフィンやそのファミリー分子の発現操作を行い、細胞凝集体としてのドナー細胞凝集体の培養系を確立した。また、エピモルフィンファミリー分子と他の生理活性物質の細胞内外での発現調節を組み合わせ、さらに遠心法を応用させた3次元培養を行うことで、アクセプター細胞に提供する異なる分化誘導環境を作り出せることが明らかになった。

(2)(1)で調製したドナー細胞の提供する3次元環境を利用することで、アクセプター細胞(分化後に蛍光を発するES細胞や、iPS細胞、F9/P19/ATDC5各種胚性癌細胞)の効率的な分化誘導とその制御に成功した。

(3)アクセプター細胞に予め薬剤耐性遺伝子を導入することで分化誘導後にドナー細胞のみを死滅させることは可能であったが、その後細胞集合体から死滅したドナー細胞を完全に除去することはできなかった。そこで、ドナー細胞が提供する分化誘導因子をアクセプター細胞に発現調節可能な形で直接導入し、それを用いて高機能のアクセプター細胞集合体を調製することにした。具体的には、テトラサイクリンによる発現調節系を用いてドナー細胞が産生するエピモルフィンや関連遺伝子をアクセプター細胞のみからなる細胞集合体に発現させた。これにより、組織特異的な機能を有する細胞集合体をいくつか作成することができた。それらには、心筋、表皮、軟骨、乳腺等の機能細胞集合体が含まれる。

3. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Masuda E, Shirai K, Maekubo K, Hirai Y. (2015) A newly established culture method highlights regulatory roles of retinoic acid on morphogenesis and calcification of mammalian limb cartilage. *Biotechnique*
doi:10.2144/000114299. 査読有り

Kadono N, Hagiwara N, Tagawa T, Maekubo K, Hirai Y. (2015) Extracellularly extruded syntaxin4 is a potent cornification regulator of epidermal keratinocytes. *Mol Med.*
doi: 10.2119/molmed.2014.00234.
査読有り

Miura Y., Hagiwara N, Radisky D.C., Hirai Y. (2014) CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPβ) isoform balance as a regulator of epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells. *Exp Cell Res.* 327:146-55
doi: 10.1016/j.yexcr.2014.05.019 査読有り

Fujimoto S, Takase T, Kadono N, Maekubo K, Hirai Y. (2014). Krtap11-1, a hair keratin-associated protein, as a possible crucial element for the physical properties of hair shafts. *J. Dermatol Sci.* 74(1):39-47
doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.12.006 査読有り

Miyazaki T., Kadono N., Konishi Y., Hagiwara N., Maekubo K., Hirai Y. (2013) Effluent syntaxin3 from dying cells affords protection against apoptosis in epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol.* 22(12):845-847.
doi: 10.1111/exd.12278 査読有り

Hagiwara, N., Kadono, N., Miyazaki, T, Maekubo, K., Hirai, Y. (2013). Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties. *Cell &*

Tissue Res 354(2):581-591
doi: 10.1007/s00441-013-1680-0 査読有り

Bascom, J.L., Radisky, D.C., Koh, E., Fata, J.E., Lo, A., Mori, H., Roosta, N., Hirai, Y., Bissell, M.J. (2013). Epimorphin is a novel regulator of the progesterone receptor isoform-A. *Cancer Res.* Jul 18. 73:5719-5729
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0021
査読有り

Shono, M., Yoshioka, R., Chatani, Y., Hirai, Y. (2013). Ectopic expression of syntaxin3 affects behaviors of B16 melanoma by controlling actin dynamics. *Cell Struct. Funct.*38(1): 97-107 査読有り

Okugawa, Y., Hirai, Y. (2013). Extracellular epimorphin modulates epidermal differentiation signals mediated by epidermal growth factor receptor. *J Dermatol. Sci.* 69, 236-242.
doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.11.006
査読有り

〔学会発表〕(計 24 件)

増田英三、平井洋平 器官培養法を用いたレチノイン酸の骨形成に及ぼす影響の解析 第37回日本分子生物学会 2014.11.25 パシフィコ横浜(横浜市)

白井康太、平井洋平 細胞外 syntaxin4 による乳腺上皮細胞の挙動変化 第37回日本分子生物学会 2014.11.25 パシフィコ横浜(横浜市)

Hagiwara N., Hirai Y. Functional expression of plasmalemmal syntaxins on germ-layer differentiation executed by their extracellular localization. SEBD 2014 annual meeting 2014.10.13 マドリッド、スペイン

Kadono N., Hirai Y. Effect of syntaxin4 and its peptide antagonist ST4n1 on epidermal keratinization. 44th Annual ESDR meeting. 2014.9.10 コペンハーゲン、デンマーク

Hagiwara N., Hirai Y.
Plasmalemmal syntaxins regulate cell
adhesion properties of EC cells,
leading to their cytodifferentiation.
ISSCR 12th Annual meeting 2014.6.18
バンクーバー、カナダ

前窪健司、平井洋平 Temporal
observation of the influence of FGF
signals in somite differentiation 第
46 回発生生物学会 2013.5.30 くにび
きメッセ(松江市)

萩原奈津美、平井洋平
Extracellular syntaxin4 triggers the
differentiation program in
teratocarcinoma F9 cells with impacts
on cell adhesion properties. 第 46 回発
生生物学会 2013.5.30 くにびきメッ
セ(松江市)

田川嵩、平井洋平 細胞膜エピモル
フィン誘発性癌細胞 P19CL6 の心筋分化
を引き起こす 第 47 回発生生物学会
2014.5.28 ウィンク愛知(名古屋市)

高瀬貴久、平井洋平 The
functional analyses of AHF, a potent
regulator of keratin dynamics. 第 35
回日本分子生物学会 2012.12.13 福岡
国際会議場(福岡市)

藤本俊輔、平井洋平 An important
role and the strict expression control
of Hacl-1, a hair follicle specific KAP.
2012.12.13 福岡国際会議場(福岡市)

生野倫子、平井洋平 Syntaxin3
regulates function and morphology of
melanocytes by controlling actin
dynamics 第 35 回日本分子生物学会
2012.12.12 福岡国際会議場(福岡市)

萩原奈津美、平井洋平
Extracellular syntaxin4 induces
differentiation and survival in
teratocarcinoma F9 cells 第 35 回日本
分子生物学会 2012.12.12 福岡国際会
議場(福岡市)

三浦夕佳、平井洋平 Impacts of

two isoforms of C/EBP β LAP and LIP,
on epithelial-mesenchymal transition
in the mammary epithelial cells 第 35
回日本分子生物学会 2012.12.12 福岡
国際会議場(福岡市)

尾嶋満里子、平井洋平 Important
role of insulin/IGF signaling on the
mammalian cartilage morphogenesis
第 35 回日本分子生物学会 2012.12.12
福岡国際会議場(福岡市)

平井洋平 毛にメリハリを与え毛
根に強さを与えるタンパク質の機能調
節 毛髪科学技術者協会 134 回学術大
会 2012.10.19 ホテルニューさがみや
(熱海市)

〔図書〕(計 2 件)

Okugawa Y, Hirai Y. (2013). A
novel three-dimensional cell culture
method to analyze epidermal cell
differentiation in vitro. *Methods Mol.
Biol.* 294(183-190) Springer
doi: 10.1007/7651_2013_45

萩原奈津美、葛野菜々子、平井洋平
(2013) 表皮形成における EGF 受容体と
エピモルフィン 「生体の科学」64
(626)456-457

〔その他〕

ホームページ等

[http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~
hirai/index.html](http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~hirai/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 洋平 (HIRAI, Yohei)

関西学院大学理工学部・教授

研究者番号：00397572

(4) 研究協力者

前窪 健司(MAEKUBO, Kenji)

青野 裕一(AONO, Yuichi)

宮崎 貴文(MIYAZAKI, Takafumi)

尾嶋 満里子(OJIMA, Mariko)

萩原 奈津美(HAGIWARA, Natsumi)

山田 宗治(YAMADA, Muneharu)

Mina Bissell

Derek Radisky