

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651136

研究課題名(和文) 3Dナノ格子構造体を用いたヒト多能性幹細胞培養系の開発

研究課題名(英文) 3D nano-lattices substrate for human pluripotent stem cells culture

研究代表者

陳 勇 (Chen, Yong)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：70512458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では、3次元ナノ格子構造体を用いた新規細胞外足場を開発し、ヒト多能性幹細胞の新規無血清合成培養系の開発を行うことを目的とする。微細加工技術を基にした3次元格子構造を作製することによって、細胞足場における微細構造を厳密に制御することができるようになった。現在、フィーダー、タンパク質を使用せず、新規3次元ナノ格子の上で、ヒトiPS細胞を培養し、細胞の未分化状態を維持することが成功した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSCs) are useful resources for tissue engineering, drug screening, and regenerative medicine. Cellular microenvironmental cues play critical roles in regulating hPSCs functions, but it is challenging to control them with synthetic components. In this project, we focus on developing a 3D nano-lattices scaffold for maintaining pluripotent stem cell culture based on micro-engineering tools and techniques. hPSCs on 3D nano-lattices scaffold showed a growth rate and they retained their pluripotency.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：3次元 スカフォード ヒト多能性幹細胞 フィーダーフリ

1. 研究開始当初の背景

今まで、ヒト多能性幹細胞の培養の基材として、フィーダー細胞は使われていることが一般である。しかし、動物由来の成分が混在していることや、コストが高いことや、2次元しかできないなど問題が既存している。*in vitro* レベルで生体内の3次元微小環境を模倣し、多能性幹細胞培養手法が求められている。最近、広く使用されている細胞培養基材としては、マトリゲルや組換えタンパク質等が挙げられるが、これらの材料はコストが高く、また、ロット間による品質の差が大きいなど安定性に欠けている。このような条件で培養されたヒト多能性幹細胞は不安定な状態になり、その結果、細胞増殖速度の異常、非常に不均一な細胞群への変質、分化能の損失、核型の変異等の異常を引き起こしてしまう。幹細胞の未分化状態を維持するために、フィーダーの代わり、より安定している基材を必要となっている。

2. 研究の目的

本課題では、3次元ナノ格子構造体を用いた新規細胞外足場を開発し、ヒト多能性幹細胞の新規無血清合成培養系の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

私たちの研究グループでは、ゼラチンナノファイバーを用いて、多能性幹細胞の未分化状態を維持するままで長期培養に成功した(Liu, et al., Biomaterial, 2014)。しかし、ゼラチンナノファイバーによって構築された多孔構造のサイズのコントロールすることが難しい。ここで、私たちはマイクロエンジニアリングの手法により、世界初、3次元格子を作製することができるようになった。今まで、3次元構造の密度や厚みなどを均一に保つことや、厳密に制御することが困難である。本プロジェクトにおいて、微細加工技術を駆使

した3次元格子構造を作製することによって、細胞足場における微細構造を厳密に制御することが簡単に出来るようになった。さらに、ヒトiPS細胞に適切な材料を検討し、シリコンの一種であるポリジメチルシロキサン(PDMS)に着目した。PDMSは無色透明で、毒性がないなどの利点があり、分子細胞分野への応用が注目されているが、今まで、PDMSを用いての3次元構造作製方法は報告されていなかった。申請者らは、この材料を用いて3次元格子の作製を試み、世界で初めて成功した(Fig.1)。一方、PDMS材料の上にヒトiPS細胞が接着しないため、ゼラチンコーティング及びCrosslinking処理手順を加えて、シングルヒトiPS細胞が簡単に接着し、コロニーまで増殖した。その結果、細胞との接着力が強く、細胞への毒性がまったくないことが明らかになった。続いて、3次元格子の厚みや間隔、サイズなどを検討し、細胞テストにより、3次元格子構造体作製技術の最適化を行った。最終的に、最適化で見つけた3次元格子を用いた、ヒトiPS細胞培養を行った。その結果、細胞からコロニーまで増殖した(Fig. 3)。さらに免疫染色、FACSなどを行い、未分化マーカーの強い発現を示されている(Fig.4-5)。つまり、ヒトiPS細胞の未分化状態を維持していることを検証した。

4. 研究成果

Fig.1 マイクロエンジニアリング法によって、PDMSで構築された3次元格子構造 (左図: Top view 右図: Site view)

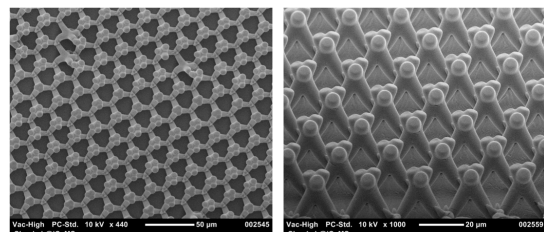


Fig.2 格子で構築した 3 次元構造と 2 次元 Flat 構造と比較して、疎水性特性を示された。

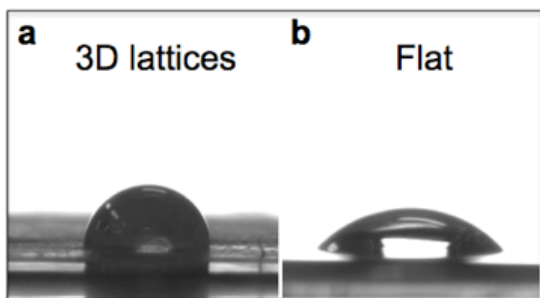


Fig.3 3 次元格子と 2 次元 Flat 上でヒト iPS 細胞を培養した結果、3 次元の上で培養した細胞を丸い構造が見られる。しかし、Flat 上で培養した細胞は Primed 構造が見られる。

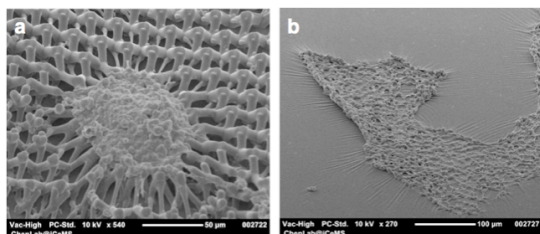


Fig.4 3 次元格子の上で培養された iPS 細胞は未分化マーカー(NAONG, OCT4)を強く発現された。

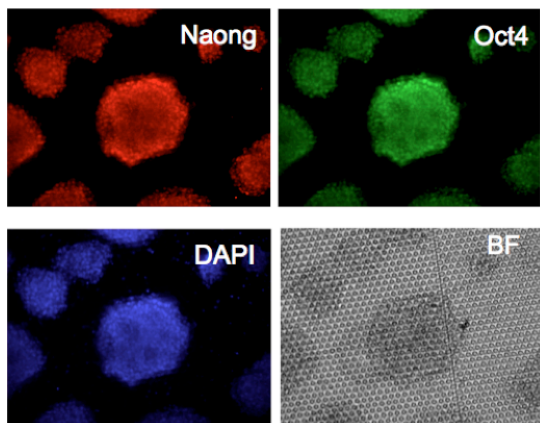
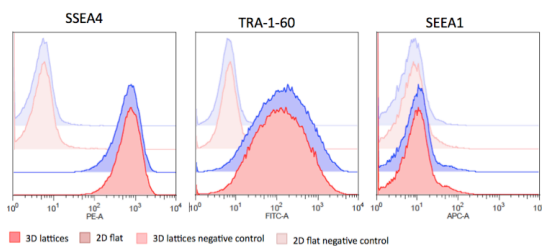


Fig.5 ヒト多能性幹細胞の表面マーカー (TRA-1-60, SSEA4) を用いて、FACS を行った結果、3 次元格子の上で培養されたヒト iPS 細胞は強く未分化マーカーが発現された。



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 3 件)

1. Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells, Li Liu, Momoko Yoshioka, Minako Nakajima, Arata Ogasawara, Jun Liu, Kouichi Hasegawa, Sisi Li, Jianli Zou, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei*, Yong Chen*, Biomaterial (2014) 35, 6259-6267 (2014)
2. Fabrication of gelatin nanopatterns for cell culture studies, S. S. Li, J. Shi, L. Liu, J.J. Li, L. M. Jiang, C. X. Luo, K. Kamei, Y. Chen, Microelectron. Eng. 110 70-74 (2013)
3. Influence of patterned topographic features on the formation of cardiac cell clusters and their rhythmic activities, L. Wang, L. Liu, N. Magome, K. Agladzea, Y. Chen, Biofabrication 5 (3) (2013)

[学会発表] (計 1 件)

11th International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, June 12-16, 2013 Boston (USA), Title: Combinatorial screening of gelatin nanofibers as cellular scaffolds to expand hPSCs for long-term period, Li Liu, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：多能性幹細胞の培養方法及びそのための
の基材

発明者：Li Liu, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen

権利者：京都大学

番号：特願 2012-127580

出願年月日：2012/6/4

国内外の別：国内

名称：ファイバー・オン・ファイバーを用い
た多能性幹細胞の 3 次元培養方法及びその
ための基材

発明者：Ken-ichiro Kamei, Norio Nakatsuji,

Li Liu, Yong Chen

権利者：京都大学

番号：特願 2013-117242

国際特願：S2013-1024

出願年月日：2013/6/3

国内外の別：国際

○取得状況（計 2 件）

名称：多能性幹細胞の培養方法及びそのための
の基材

発明者：Li Liu, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen

権利者：京都大学

番号：特願 2012-127580

出願年月日：2012/6/4

国内外の別：国内

名称：ファイバー・オン・ファイバーを用い
た多能性幹細胞の 3 次元培養方法及びその
ための基材

発明者：Ken-ichiro Kamei, Norio Nakatsuji,

Li Liu, Yong Chen

権利者：京都大学

番号：特願 2013-117242

国際特願：S2013-1024

出願年月日：2013/6/3

国内外の別：国際

〔その他〕

www.chen.icems.kyoto-u.ac.jp

6. 研究組織

(1)研究代表者

陳 勇 (Yong CHEN)

研究者番号：70512458

(2)研究分担者

劉 莉 (Li LIU)

研究者番号：50380093

(3)連携研究者

()

研究者番号：