

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659876

研究課題名(和文) 無血清培地での間葉系幹細胞の分離、増殖、分化を促進する官能基配合培養皿

研究課題名(英文) The development of culture surfaces expressing functional groups that enhance isolation, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells.

研究代表者

加藤 幸夫 (KATO, Yukio)

広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員

研究者番号：10112062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、間葉系幹細胞(MSC)の無血清培養に至適な培養皿官能基組成をもつ自己組織化分子膜(SAM)を作製した。OH基とCOOH基とを60:40の比でもつSAM-1は、接着斑の形成、接着、増殖を促進した。また骨分化関連遺伝子の発現と基質の石灰化を支持した。すなわち、SAM-1と無血清培地を組み合わせることにより、世界で初めて培養環境全体を化学的に規定化できた。この新培養系は、基礎研究のみならず将来の臨床研究でも有用であると期待される。さらにSAM-1は、ミトコンドリア関連遺伝子の多くを下方制御して、嫌氣的解糖系を促進し、TCAサイクル系を抑制した。

研究成果の概要(英文)：To improve adhesion in serum-free media, we developed self-assembled monolayer expressing OH and COOH at 60:40 (SAM-1). SAM-1 enhanced reorganization of adhesion plaques, adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells (MSC) in a serum-free medium. Furthermore, the expression of bone-related genes, along with calcium accumulation, was markedly enhanced in MSC cultures on SAM-1 after exposure to a serum-free osteogenesis-induction medium. In addition, SAM-1 enhanced anaerobic glycolysis and suppressed TCA cycle activity in MSC by down-regulating mitochondria-related-genes, which may be related to MSC stemness. These findings indicate that a combination of a serum-free medium and SAM is useful in basic studies on cell-substrate interactions and clinical studies towards MSC-based cell therapy.

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：間葉系幹細胞 培養皿 無血清培地 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(幹細胞治療) ウサギ抜歯部位に MSC と BMP 2 を移植すると歯が萌出するなど (Biomaterials 2011)、歯科再生医療の機運は高まってきた。しかし移植用 MSC の品質が一定しないため、臨床研究の比較や評価が困難である。(無血清培養液) 無血清培養液は、成分が一定しているため、増幅性能と細胞品質にバラツキが少ない。そこで申請者は、MSC の分離用、増幅用、骨分化用、脂肪分化用の無血清培養液 STK1,2,3,4 を開発した (発明人: 加藤幸夫ら、特許番号: 特許第 4385076 号 / PCT/JP2007/050232、発明人: 加藤幸夫ら、出願番号: 特願 2008-289146 号)。意外にも、これらの性能は 10%血清含有培地より顕著に高かった。STK1,2,3 は市販され、研究用として用いられているのみならず、東京や福岡の病院で臨床にも使用されている。また STK2 は歯髄幹細胞の増殖をも促進した。(培養皿) STK 開発中に、通常培養皿には大きな問題があることがわかった。プラズマ照射でイオン化した通常培養皿の官能基組成は一定せず、ロット毎に、無血清での MSC 培養に影響した。(官能基配合 SAM 培養皿) 官能基アルカンチオールは、チオール基で金基板と結合し、またアルキル基は隣接する分子間で疎水結合する。したがって、金蒸着基板上(16mm)に、官能基のみが表層に露出した自己組織化分子膜(SAM)を作成できる。

2. 研究の目的

無血清培養液は、間葉系幹細胞 (MSC) の安定増幅に役立つものの、通常のプラズマ処置培養皿(表面化学組成不定)を使用すると、とくに初代培養系で増殖速度が低下することが多く、移植治療に障害がでる。そこで本研究では、表面の官能基配合を規定化した培養皿と無血清培養液を組み合わせる。そして培養環境全体を化学的に規定化 / 至適化して、幹細胞の分離、増幅、分化を促進する。この世界初の完全化学規定化培養法は今後の世界標準になると期待される。

3. 研究の方法

- (1) SAM 培養皿に配合する官能基の種類を増やし、かつ官能基 2 種混合(N1-28)以外に 3 種混合 SAM および RGD ヘプチド配合官能基 SAM も作製して、培養皿の増殖性能をより高める。
- (2) 直径 16 mm 以外に 35mm、90mm の金蒸着基板を作製し (大阪金属工業に依頼) 大量に MSC を無血清培養する。そしてマウスに移植して骨形成能を評価する。
- (3) 細胞接着、伸展、増殖に及ぼす官能基配合の影響の分子機構は、接着分子との相互作用

用、接着斑、細胞骨格、インテグリンの分布や、MAP キナーゼ活性などを測定して追究する。

4. 研究成果

(1) 24 年度

我々は、すでに間葉系幹細胞用の無血清培養液 STK1 (分離、初代用) STK2 (増殖用、継代培養用) STK3 (骨分化用) を開発した。しかし、間葉系幹細胞を化学的に規定化した培養システムで培養するためには、無血清培養液に加えて、培養皿表層の化学組成を規定化する必要がある。従来のプラズマ処置プラスチック培養皿は化学的に規定化されていない。そこで我々は、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、メチル基のうち、2 種類の官能基をさまざまな割合で組み合わせ、混合自己組織化単層分子膜(SAM)を作製して、カルボキシル基、水酸基の組み合わせ (No 8 SAM) が、無血清での間葉系幹細胞の増殖を促進することを見いだした。

24 年度は、(No 8 SAM で培養した間葉系幹細胞が、脂肪分化能、軟骨分化能、骨分化能を示すことをさらに確認した。次いで、カルボキシル基のかわりの陰イオンとしてリン酸基を SAM に導入した。リン酸基と水酸基の混合 SAM はカルボキシル基と水酸基の混合 SAM (No 8) より少し活性が弱いもののほとんど同等の増殖促進作用を示した。つまり水酸基と陰イオンの組み合わせが、間葉系幹細胞の増殖に至適であることが判明した。

また、カルボキシル基と水酸基の混合 SAM (No 8) に加えて、フィブロネクチンの細胞結合ドメインである RGD ペプチドをもつアルカンチオールを配合した 3 種 SAM を作製した。RGD ペプチドの導入は細胞接着を促進したものの、増殖を抑制した。強力すぎる接着は、増殖を抑制的に作用することが示唆された。

(2) 25 年度

(SAM アルキル鎖長の影響) 特定の官能基のアルキル基部分の鎖長を延長することにより、その官能基を表面から突き出る形となる混合自己組織化単層分子膜 (SAM) を作成して、MSC の接着と増殖の促進を試みた。しかし、表面の凸凹は MSC の接着と増殖を抑制した。

(表面官能基の接着促進の分子機構) 安定的な細胞接着と増殖には、接着斑とストレスファイバー形成が必須である。これを追求するため、NH₂, OH, COOH, CH₃ single SAM 上に MSC を播種して 24 時間後に接着斑を抗 vinculin 抗体と microfilament に結合する rhodamine phalloidin で、ストレスファイバーを rhodamine phalloidin で染色した。表面 OH 基はこれらの形成に必須であった。

他の官能基はこれらの形成を支持しなかった。ただしOH:COOH混合SAMはOH SAMと同様に形成を支持した。

(再生医療でのMSCの増幅) 化学的に規定化された培養皿と培養液にてMSCを大量増幅するためには、無血清での細胞の剥離と播種による継代が必要であるが、現在のところSAM上での継代は困難である。原因を調査中。

(完全化学規定化培養法他細胞への応用) ラット骨髄MSC, ラット骨芽細胞、ヒト線維芽細胞を無血清培地とSAMを使用し培養することに成功した。

(糖鎖の影響) 北海道大学の篠原教授との共同で、化学規定化無血清培地が、MSCの糖脂質合成系酵素の遺伝子発現を介して、糖脂質の組成を変化させることを見いだした。

(遺伝子発現に及ぼすSAMの影響) マイクロアレー解析にて、SAMはMSCでのミトコンドリアの酸化リン酸化経路の遺伝子発現を選択的に抑制した。したがって、SAM培養では、解糖系が亢進するとともにTCAサイクルが低下した。すなわちミトコンドリアでのROS産生が抑制され、幹細胞のstemnessの維持に有利であった。

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 12件)

Yamanaka K, Yamamoto K, Sakai Y, Suda Y, Shigemitsu Y, Kaneko T, Kato K, Kumagai T, Kato Y. Seeding of mesenchymal stem cells into inner part of interconnected porous biodegradable scaffold by a new method with a filter paper. *Dental Materials Journal*, 査読有, in press 2014.

Goriki A, Hatanaka F, Myung J, Kim J, Yoritaka T, Tanoue S, Fujimoto K, Kato Y, Matsubara A, Forger D, Takumi T. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. *PLoS Biol*, 査読有, 2014 Apr 15;12(4):e1001839. doi: 10.1371/journal.pbio.1001839.

eCollection 2014.

Honda KK, Kawamoto T, Ueda HR, Nakashima A, Ueshima T, Yamada RG, Nishimura M, Oda R, Nakamura S, Kojima T, Noshiro M, Fujimoto K, Hashimoto S, Kato Y. Different Circadian Expression of Major Matrix-Related Genes in Various

Types of Cartilage: Modulation by Light-Dark Conditions. *J Biochem. 査読有*, 2013 Oct;154(4):373-81. doi: 10.1093/jb/mvt068.

Kanawa M, Igarashi A, Ronald VS, Higashi Y, Kurihara H, Sugiyama M, Saskianti T, Pan H, Kato Y. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded with fibroblast growth factor-2. *Cytotherapy. 査読有*, 2013 Sep;15(9):1062-72. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.03.015.

Ueno T, Nakashima A, Doi S, Kawamoto T, Honda K, Yokoyama Y, Doi T, Higashi Y, Yorioka N, Kato Y, Kohno N, Masaki T. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling. *Kidney Int. 査読有*, 2013 Aug;84(2):297-307. doi: 10.1038/ki.2013.81.

Mikami S, Nakashima A, Nakagawa K, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Ochi M, Nishimura M, Tsuji K, Kato Y, Goto C, Higashi Y. Autologous Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation and Endothelial Function in a Rabbit Ischemic Limb Model. *PLOS ONE*, 査読有, 2013 Jul 4;8(7):e67739. doi: 10.1371/journal.pone.0067739.

加藤幸夫、本田清昌、中島歩、河本健 ラット変形性関節症モデルでの高分子ヒアルロン酸応答遺伝子の解析 臨床リウマチ 25(3), 査読無, 174-184, 2013.

Sato F, Kawamura H, Wu Y, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- β -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. *Int J Mol Med. 査読有*, 2012 Sep;30(3):495-501. doi: 10.3892/ijmm.2012.1037.

Wu Y, Sato F, Yamada T, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Hakamada K, Abiko Y, Kato Y, Kijima H. The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the

epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. Int J Oncol. 査読有, 2012,41,1337-1346. doi: 10.3892/ijo.2012.1559.

Wu Y, Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. Biomed Res. 査読有, 2012;33(2):75-82.

doi: 10.2220/biomedres.33.75

Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T. Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product. J Tissue Eng Regen Med., 査読有, 2012 Jul;6(7):550-8. doi: 10.1002/term.460

Ozaki N, Noshiro M, Kawamoto T, Nakashima A, Honda K, Fukuzaki-Dohi U, Honma S, Fujimoto K, Tanimoto K, Tanne K, Kato Y. Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by ROR α and their roles in adipogenesis(\dagger). Genes to Cells. 査読有, 2012,17,109-121. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01574.x

〔学会発表〕(計 11 件)

Yukio Kato, Jinchang Shao, Koichro Tsuji, Isolation and expansion of mesenchymal stem cells from various tissues, including the umbilical cord, under serum-free conditions, Asia CORD2013 April 19-20, in Kobe, Japan

加藤幸夫, 無血清で作製した他家ヒト滑膜 MSC (TEC) への期待, 第 12 回 日本再生医療学会, 平成 25 年 3 月 21-23 日, 横浜市

加藤幸夫, 培養環境全体の化学的規定化による移植用間葉系幹細胞の増殖、分化の促進, (公) 新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会・材料分科会 平成 24 年 9 月 18 日 東京都

河本健、能城光秀、藤本勝巳、加藤幸夫, 概日リズムを制御する新規時計エレ

ント EL-box の同定, 第 54 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 平成 24 年 9 月 14-16 日 福島県郡山市

Yukio Kato, Tania Saskianti, Masami Kanawa, Takeshi Kawamoto, Koichi Kato, Isao Hirata, Chemical Optimization of Both Culture Surfaces and Media Markedly Enhances MSC Proliferation, ISSCR Annual Meeting June 13-16, 2012 Yokohama, Japan

中田恭輔、邵金昌、長谷川森一、杉田憲彦、下村和範、深澤賢宏、松本昌也、原真依子、河原裕美、弓削類、加藤幸夫、中村憲正、辻紘一郎, 無血清培地で培養したヒト滑膜由来 MSC の未分化性・軟骨分化能の検討, 第 11 回 日本再生医療学会 平成 24 年 6 月 12-14 日 横浜市

長谷川森一、邵金昌、中村憲正、松下隆、金輪真佐美、鈴木美紀、原真依子、辻紘一郎、加藤幸夫, 各組織由来 MSC の均質性と細胞表面マーカーの発現に及ぼす無血清培地 (STK 培地) の影響, 第 11 回 日本再生医療学会 平成 24 年 6 月 12-14 日 横浜市

邵金昌、長谷川森一、杉田憲彦、森口悠、下村和範、原真依子、桂由紀、坂井将典、河原裕美、弓削類、加藤幸夫、辻紘一郎、吉川秀樹、中村憲正, 無血清培地 (STK 系列培地) を用いた間葉系幹細胞からの Tissue Engineered Construct (TEC) 作成, 第 11 回 日本再生医療学会 平成 24 年 6 月 12-14 日 横浜市

Noriko Goto, Katsumi Fujimoto, Shin-ichi Hasegawa, Kazuko Kitayama, Veronica Sainik Ronald, Katsuyuki Kozai, Yukio Kato Enhanced Proliferation of Stem Cells from Deciduous Teeth in Serum-free Media, STK1/STK2 8th Biennial Conference PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia) May 24 - 26 2012 Bali, Indonesia 1st winner of scientific competition in poster presentation The best winner of scientific competition poster presentation

加藤幸夫、辻紘一郎, 膝関節症とヒアルロン酸への期待, 第 2 回 TOKYO ヘルスコレクション 平成 24 年 3 月 15 日 東京都

加藤幸夫, 再生医療用細胞 (MSC など) の培養条件の完全化学規定化 / 至適化,

第 11 回再生医療の実用化に関する二
ーズ発表会 平成 24 年 2 月 24 日 神
戸市

〔図書〕(計 2 件)

Kato Y, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M. DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 coordinate physiological processes, including circadian rhythms in response to environmental stimuli. bHLH Factors in Development and Disease: Current topics in developmental biology, Elsevier, in press 2014.

加藤幸夫、邵金昌、長谷川森一、西村正宏、桂由紀、中村憲正、辻紘一郎、幹細胞用無血清培地の開発、幹細胞医療の実用化技術と産業展望 第 3 章幹細胞の維持培養と分化誘導 P50-60、2013 年 3 月 (株)シーエムシー出版 刊 293 ページ ISBN : 978-4-7813-0692-6

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 幸夫 (KATO Yukio)

広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員

研究者番号 : 1 0 1 1 2 0 6 2