

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293403

研究課題名(和文)細胞増殖・分化を制御する化学規定化培養基板の開発

研究課題名(英文)Development of Chemically Defined Culture Substrate for Cell Proliferation and Differentiation

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(歯)・助教

研究者番号：40346507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞培養基板の研究は、バイオロジー以外にも表面物理化学の技術・情報が必要なため、その進歩は遅い。しかしながら細胞培養基板は、細胞が生きていく上での足場となるため、この研究は極めて重要である。本研究は、細胞の増殖・分化の精密制御を目的とした、ナノオーダーで表面精密制御された化学規定化培養基板の開発を行い、特に間葉系幹細胞の培養に特化した表面特性およびその増殖向上の原因が幹細胞性の維持によることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A study of cell culture substrates requires the technology of the surface physical chemistry in addition to biology, so these progresses are slow. However this research is very important because the scaffold on which cells to live. This study was aimed precise control of proliferation and differentiation of cells, we developed a chemically defined culture substrate whose surface precisely controlled in nano-order. In particular cause of improvement of proliferation of mesenchymal stem cells on well-defined substrate, it has been suggested to be due to the maintenance of stemness.

研究分野：生体材料学

キーワード：再生医学 表面・界面物性 細胞・組織 ナノ薄膜

1. 研究開始当初の背景

(1)多能性幹細胞(iPS)や胚性幹細胞(ES)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。
 (2)幹細胞医療において、幹細胞の増殖・分化を促すための研究が広く行われている。これらの研究の焦点は、分化や増殖を促すサイトカインやDNAやRNAなど細胞内遺伝子の活動を制御する核酸導入など、細胞の挙動を直接制御する方法にかなり集中し、加速的に進歩している。
 (3)細胞培養基板の研究は、バイオロジー以外にも表面物理化学の技術・情報が必要なため、その進歩は遅い。細胞培養基板は、細胞が生きていく上での足場となるため、この研究は前者と同様に極めて重要である。
 (4)販売されている標準的な培養皿表面の化学特性は公開されておらず、さらに作製会社や作製ロット間でも変動するため、培養皿自体も細胞増殖性能に揺らぎを生じる原因となる。

2. 研究の目的

(1)細胞培養は、基礎研究、再生医療、バイオ医薬品産業で不可欠である。しかし、通常の培養皿では、培養皿表面の官能基組成や構造が不定のため、一部の細胞(不死化細胞株など)には適するものの、大部分の正常細胞や幹細胞の培養には適さない。また増殖性能がロットや培養皿製造メーカーによって大きくばらつくこともある。そこで本研究は、細胞の増殖・分化の精密制御を目的とした、ナノオーダーで表面精密制御された化学規定化培養基板の開発を行う。

3. 研究の方法

(1)混合自己組織化単分子膜(mixed-SAM)の作製・分析
 窒素で脱酸素化したエタノールにアミノ基(NH₂)、水酸基(OH)、カルボキシル基(COOH)、メチル基(CH₃)を末端に有するアルカンチオールを1 mM 溶液をそれぞれ調整し、それらを表1の割合で混合した20種類のアルカンチオール溶液を調整した。金基板をこれらのアルカンチオール溶液に25℃の環境下で24時間浸し、金基板上にmixed-SAMを作製した。これらの表面の特性をX線光電子分光法(XPS)および濡れ接触角測定法で評価した。

NH ₂	= 100
NH ₂ : OH	= 80: 20
NH ₂ : OH	= 60: 40
NH ₂ : OH	= 40: 60
NH ₂ : OH	= 20: 80
OH	= 100
OH : COOH	= 80: 20
OH : COOH	= 60: 40
OH : COOH	= 40: 60
OH : COOH	= 20: 80
COOH	= 100
COOH : CH ₃	= 80: 20
COOH : CH ₃	= 60: 40
COOH : CH ₃	= 40: 60
COOH : CH ₃	= 20: 80
CH ₃	= 100
CH ₃ : NH ₂	= 20: 80
CH ₃ : NH ₂	= 40: 60
CH ₃ : NH ₂	= 60: 40

表1. アルカンチオールの溶液混合比

(2)無血清培地を用いた mixed-SAM 上での幹葉系幹細胞の培養

広島大学発ベンチャー企業が開発した無血清培地(STK1,2)は、MSCの初代培養、継代培養に最適化されている。しかしながら、培養は一般の培養皿を用いており、培養基板側の最適化は行われていなかった。そこで、mixed-SAM上でのSTK1,2を用いたMSCの培養を行い、増殖能および分化能の評価を行った。

(3) Mixed-SAM でのタンパク質吸着量測定

培養細胞の初期において、培養液に含まれる様々なタンパク質が基板へ吸着し、この吸着層が初期の細胞接着に影響を及ぼす。そこで、まず Albumin 単体と STK2 含有成分の Mixed-SAM への吸着量を表面プラズモン共鳴法(SPR)で測定した。

(4)SAM 上での MSC の網羅的遺伝子発現解析

MSC 培養において、最適化された SAM と一般培養皿増殖過程における遺伝子発現の差異の確認を、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析法を用いて行い、得られた結果を遺伝子オントロジー(GO)解析を行った。解析後、発現差違が確認できた遺伝子をリアルタイム PCR で測定した。

(5)SAM 上での MSC のメタボローム解析

MSC 培養において、最適化された SAM と一般培養皿で網羅的メタボローム解析を行い、代謝系マップを作製した。

4. 研究成果

(1)Mixed-SAM()の表面特性

Mixed-SAM()を XPS での表面組成測定と濡れ性を測定したところ、これら 20 種類の mixed-SAM()は、親水性や疎水性の性質に加えて表面にアミノ基やカルボキシル基が加わった正や負の電荷を有する図1の特性を有することが示された。

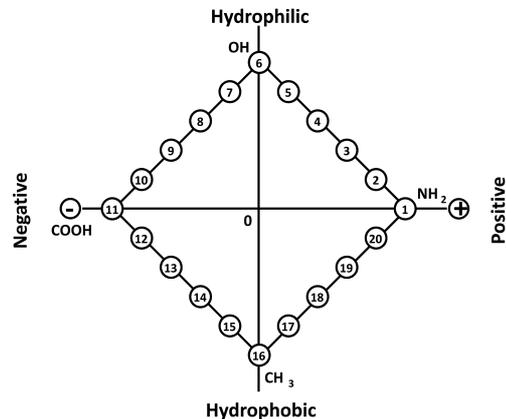


図1. 最外面層の NH₂, OH, COOH, CH₃ を調整した SAM の表面状態の概略

(2) 無血清培地下における mixed-SAM 上での MSC の初代培養

骨髓および骨髓から分離した骨髓単核球、そして歯根膜からの MSC の初代培養を、初代

培養用無血清培地(STK1)を用いて mixed-SAM および一般培養皿上で 14 日間行った。骨髄は MSC 以外にも様々な細胞が混在しており、そのまま初代培養を行っても、MSC を増殖させることはできない。そのため、取り出した骨髄は単核球分離を行い、骨髄単核球を培養して MSC を増殖させる。図 2(a)に骨髄単核球から増殖した MSC を mixed-SAM および一般培養皿上で増殖した結果を示す。からの mixed-SAM は、MSC 初代培養において一般培養皿と同様もしくは優れた増殖能を示した。また、取り出した骨髄をそのまま初代培養したところ(図 2(b))、一般培養皿では MSC の増殖はほとんど見られないのに対し、からの mixed-SAM では高い増殖能を有することが示された。これは、骨髄から MSC の初代培養において、mixed-SAM を用いると単核球分離操作を行わなくても良いことを示している。また、歯根膜から MSC を初代培養したところ(図 2(c))、からの mixed-SAM において、一般培養皿よりも優れた結果を示した。

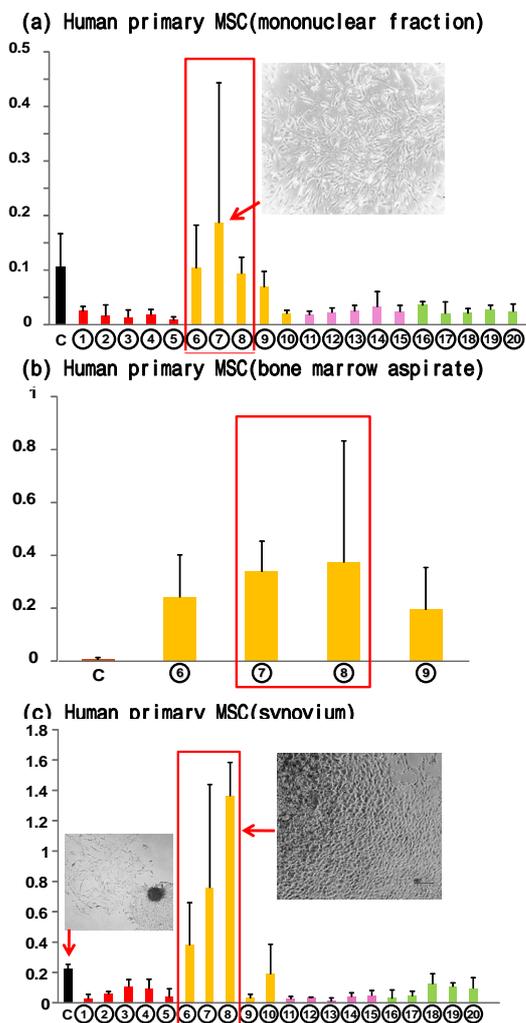


図 2. STK1 培地における mixed-SAM 上での MSC の初代培養パターン
(a) 単核球分離したヒト骨髄
(b) ヒト骨髄, (c) ヒト歯根膜

(3) 無血清培地下における mixed-SAM 上での MSC の継代培養

骨髄、歯根膜、歯髄由来の MSC の継代培養を、継代培養用無血清培地 (STK2) を用いて、mixed-SAM 上で 4 日間行った結果を図 3 に示す。全ての MSC においてもしくはの mixed-SAM において、増殖能が最大となった。そこで、からの mixed-SAM の混合比を細かくして、MSC の増殖が最適な条件を詳細に測定したところ(データ非掲)、骨髄由来の MSC の増殖能は OH:COOH=65:35 の時に最大となったが、OH:COOH=60:40 のの mixed-SAM と比べ、OH:COOH=70:30 の方が増殖能の落ち込みが強く現れた。これは、MSC の取得組織の由来及び取得したヒトの違いにより、からの mixed-SAM の混合比の間で MSC の増殖能が最大となるが、付近よりも付近の方が MSC の増殖能に大きな揺らぎを生じることを示唆している。

MSC の初代培養及び継代培養の結果より、の mixed-SAM (以下、SAM)を MSC の安定した増殖に最適な状態と判断した。

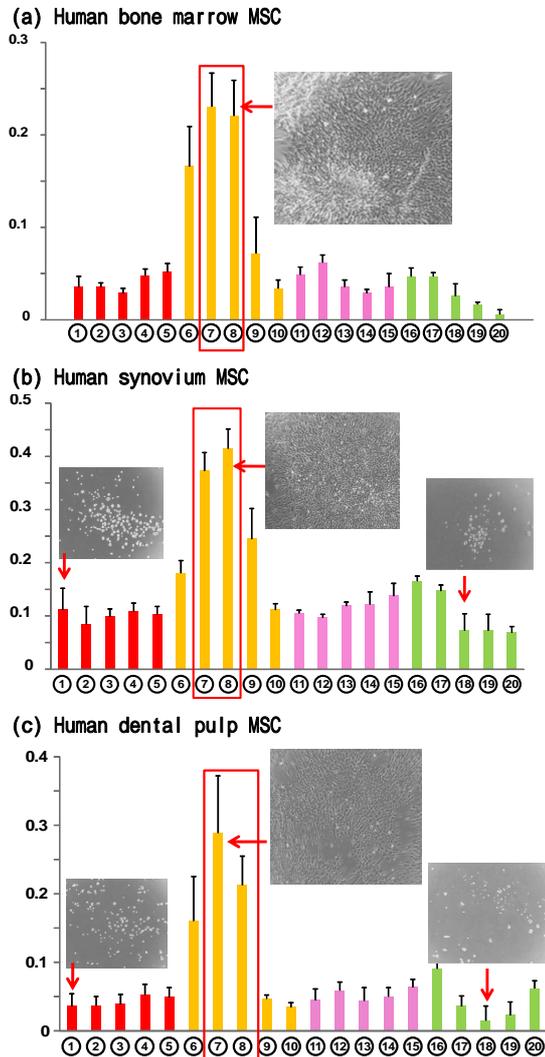


図 3. STK2 培地における mixed-SAM 上での MSC の増殖
(a) ヒト骨髄由来 MSC, (b) ヒト歯根膜由来 MSC
(c) ヒト歯髄由来 MSC

(4) SAM 上での MSC の軟骨細胞及び脂肪細胞への分化誘導

MSC の軟骨細胞分化及び脂肪細胞分化を、分化誘導因子を添加した STK2 を用いて、通常培養皿及び SAM で行った。一般培養皿では基板平面に広がっていた MSC が軟骨細胞に分化するにつれ、細胞が凝集塊を作ったが、SAM では細胞はシートの状態を維持していた。SAM の細胞シートは、トルイジンブルー染色を施すと紫色に強く染まった。トルイジンブルーは軟骨のマトリックスと結合することより、この細胞シートは軟骨細胞に分化していることを示唆した。また、脂肪細胞分化において、SAM は一般培養皿よりも分化能が高いことが示唆された。

(5) Mixed-SAM でのタンパク質吸着量測定

Mixed-SAM 上での Albumin および STK2 含有タンパク質の吸着過程の結果を図 4 に示す。Albumin は血清中に最も多いタンパク質であり、表面吸着量も親水性表面で少なく、疎水性表面で多いことが知られており、Albumin 単体での結果も同様であった。

だが STK2 においては、で吸着物質量が著しく少なかった。このことから、STK2 において Albumin 以外の物質が Mixed-SAM 上に吸着し、これが MSC の初期接着に影響を及ぼしていると考えられる。

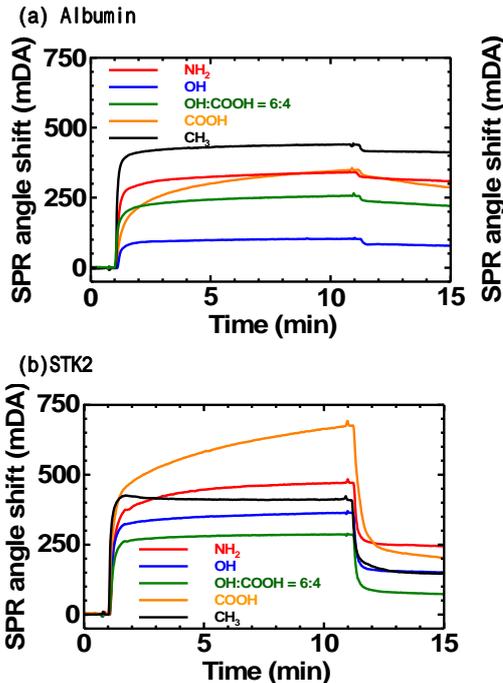


図 4 Mixed-SAM 上へのタンパク質の吸着過程の SPR 測定 (a) アルブミン (b) STK2 含有タンパク質

(6) MSC の網羅的遺伝子発現解析

STK2 を用いた場合、一般培養皿と比較して SAM は MSC の増殖が優れている結果を示したが、未分化能の維持については確認していなかった。そこで、増殖過程における遺伝子発現の差異の確認を、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析法を用いて行

い、得られた結果を遺伝子オントロジー(GO)解析を行った。SAM は一般培養皿と比較して 158 種類のタグ(GO term)において遺伝子発現抑制が生じていた。これらのうち、上位 20 までの GO term を表 2 に示す。この表にはミトコンドリアおよびミトコンドリアの膜に関係する項目が多く含まれていることより、SAM 上での MSC はミトコンドリア活性が抑制されていることが示された。また、遺伝子のパスウェイ解析を行うと、ミトコンドリア内での ATP の産生に重要な役割を持っている電子伝達系と酸化リン酸化が抑制されていることが示された。

表 2. 遺伝子オントロジー解析による、SAM で発現が抑制されている GO Term のリスト

Mixed SAM			
Rank	GO Term	p-value	Down regulated gene (all)
1	Mitochondrion	1.88E-19	246(1395)
2	Intracellular	1.79E-15	1257(11768)
3	Intracellular part	3.99E-15	1231(11488)
4	Intracellular membrane-bounded organelle	5.63E-15	1005(8954)
5	Membrane-bounded organelle	5.63E-15	1006(8963)
6	Cytoplasmic part	7.4E-15	728(6045)
7	Ribonucleoprotein complex	1.22E-14	116(532)
8	Cytoplasm	3.02E-14	956(8472)
9	Ribosome	2.54E-13	60(197)
10	Intracellular organelle	2.54E-13	1081(9899)
11	Organelle	2.82E-13	1082(9916)
12	Structural constituent of ribosome	1.39E-12	51(155)
13	Translation	2.42E-11	76(315)
14	mRNA metabolic process	8.79E-10	110(577)
15	Ribosomal subunit	1.56E-08	40(129)
16	Mitochondrial membrane part	1.42E-07	39(132)
17	Gene expression	2.01E-07	219(1543)
18	Mitochondrial part	2.01E-07	118(692)
19	Macromolecular complex	3.10E-07	439(3605)
20	Intracellular organelle part	3.25E-07	676(5980)

次に、網羅的遺伝子解析の確認のため、以下の 5 種類の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した(図 5)。

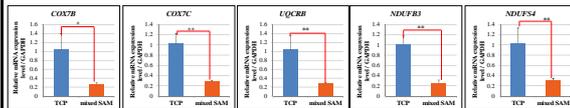


図 5. 一般培養皿と SAM での MSC の遺伝子発現差違 左より、COX7B, COX7C, UQCRCB, NDUFB3, NDUFS4

リアルタイム PCR の結果も、網羅的遺伝子解析と一致したことより、これらの遺伝子を解析することで、基板上の MSC の状態を確認できることが示唆された。

ミトコンドリア活性が低いことを意味し、細胞の代謝能の低下を示唆する。ミトコンドリア活性が低いにもかかわらず、SAM は細胞増殖能が高いことより、他の代謝系が活性化していると予想された。

(7) SAM 上での MSC のメタボローム解析

SAM での MSC の増殖能は一般培養皿よりも高いにもかかわらず、細胞活動のエネルギーである ATP を産生するミトコンドリアの活性が低く、他の代謝系を利用していると考えられた。そこで、一般培養皿と SAM で網羅的メタボローム解析を行い、代謝系マップを作

製した(図6)。

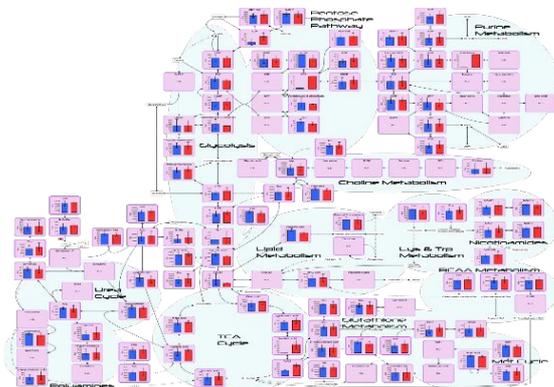


図6. エネルギー代謝全体図

このマップから、解糖系とクエン酸回路系で合成される代謝物の一部に明確な差異があることが確認された。解糖系においては、乳酸/ピルビン酸の比率が SAM で高くなることが示された(図7)。この結果は SAM 上の MSC は解糖系に依存した代謝特性を有することを示唆している。また、解糖系が活性化すると副経路であるペントースリン酸経路も同時に活性化する。この副経路は核酸の合成に不可欠な糖を産生するため、結果として細胞増殖能が向上すると考えられる。クエン酸回路系においては、2-オキソグルタル酸の量が SAM で高くなることが示された(図8)。2-オキソグルタル酸はクエン酸回路の中間体として合成されるが、ロイシン、イソロイシン、バリンの3種の分枝鎖アミノ酸の代謝にも使われており、アミノ酸代謝が抑制されている分 2-オキソグルタル酸の消費量が減少し、2-オキソグルタル酸の量が高くなると考えられた。これは、タンパク質合成に必要なアミノ酸が代謝で消費されない分、細胞増殖能が向上すると考えられる。

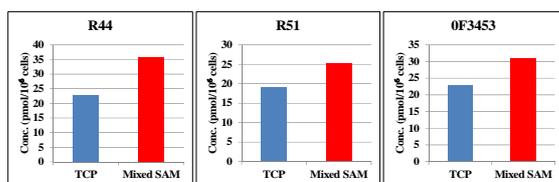


図7. 一般培養皿と SAM 上での、MSC 内の乳酸/ピルビン酸比。3種の MSC で測定。

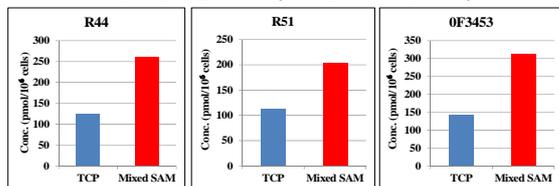


図8. 一般培養皿と SAM 上での、MSC 内の2-オキソグルタル酸比。3種の MSC で測定。

(8)まとめ

iPS や ES、MSC 等の幹細胞の幹細胞性の維持において、解糖系の活性化とミトコンドリア活性の抑制は重要であると多くの研究で報告されている。STK2 と SAM を用いた MSC の培養系は、MSC の増殖能の向上だけでなく、

幹細胞性の維持においても一般培養皿より優れていると期待される。

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)

[学会発表](計8件)

間葉系幹細胞用無血清培地に適した培養基材の開発-自己組織化単分子膜による検討- : 平田伊佐雄, 山内優佳, Tania Saskianti, Veronica Sainik Ronald, 金輪真佐美, 加藤幸夫, 加藤功一: 第37回日本バイオマテリアル学会大会(京都), 2015.11.09-11.10.

間葉系幹細胞用無血清培地に適した培養基材の開発: 平田伊佐雄, 山内優佳, 金輪真佐美, 加藤幸夫, 加藤功一: 日本組織培養学会 第88回大会(広島), 2015.05.26-27.

間葉系幹細胞の無血清培養のための培養基材の開発: 山内優佳, 平田伊佐雄, 金輪真佐美, 加藤幸夫, 加藤功一: 第65回日本歯科理工学会学術講演会(仙台), 2015.04.11-12.

間葉系幹細胞に特化した培養基板の開発-自己組織化単分子膜と無血清培地による検討-: 平田伊佐雄, Veronica Sainik Ronald, 金輪真佐美, 加藤幸夫, 加藤功一: 第64回日本歯科理工学会(広島), 2014.10.04-05.

混合自己組織化単分子膜上の表面官能基による細胞の影響: 平田伊佐雄, 加藤功一: 第144回ポパール会(京都), 2014.07.05.

Surface Design for Optimizing Mesenchymal Stem Cell Culture in a Serum-free Medium: Yamauchi Y., Hirata I., Kanawa M., Kato Y., Kato K.: The 2nd Japan-China Symposium on Nanomedicine (Hiroshima, Japan), 2014.05.16-17.

Evaluation of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Mixed Self-Assembled Monolayers: Hirata I., Kanawa M., Kato Y., Kato K.: 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima, Japan), 2013.10.12-13.

間葉系幹細胞の無血清培養に用いる培養基材の設計: 山内優佳, 平田伊佐雄, 金輪真佐実, 加藤幸夫, 加藤功一: 平成 25 年度日本歯科理工学会 近畿・中四国地方会夏期セミナー (岡山), 2013.09.06.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 伊佐雄 (HIRATA, Isao)
広島大学・
大学院医歯薬保健学研究院 (歯)・助教
研究者番号: 4 0 3 4 6 5 0 7

(2) 研究分担者

金輪 真佐美 (KANAWA, Masami)
広島大学・
自然科学研究支援開発センター・助教
研究者番号: 0 0 2 8 4 2 0 8

加藤 功一 (KATO, Koichi)
広島大学・
大学院医歯薬保健学研究院 (歯)・教授
研究者番号: 5 0 2 8 3 8 7 5

加藤 幸夫 (KATO, Yukio)
広島大学・
大学院医歯薬保健学研究院 (歯)・研究員
研究者番号: 1 0 1 1 2 0 6 2
(平成 26 年度まで)