

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01318

研究課題名(和文) 幹細胞の増殖とSpheroid形成に適した基質特性の解明とその制御法の開発

研究課題名(英文) Identification of optimized specifications of artificial extracellular environment for stem cell culture and spheroid formation

研究代表者

保住 建太郎 (Kentarō, Hozumi)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10453804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の培養基質として複数の細胞膜受容体と同時に結合する混合ペプチド-キトサンマトリックスの開発をめざした。研究期間中にはインテグリン間相互作用を示すインテグリンの組合せの検証もおこなった。幹細胞の細胞接着に特に重要な働きを占めているインテグリンと結合するペプチドの組合せおよび混合比を最適化する事で細胞接着活性が飛躍的に上昇することを確認した。また、幹細胞の培養基質として注目されるフィブロネクチンと同等の生物活性を示す混合ペプチド-多糖マトリックスを、フィブロネクチン由来ペプチドを複数用いて最適化する事で開発した。本研究成果は非タンパク質からなる幹細胞培養基質の開発に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Extracellular matrix proteins are important factor to maintain the stem cell culture in vitro. Multi-extracellular matrix derived active peptides immobilized chitosan matrices were developed to construct the cell culture scaffold. We immobilized various integrin binding peptides on chitosan matrix to investigate the integrin-integrin cross-talks between different integrin subtypes using multi-peptide-chitosan matrices. The biological activities of multi integrin binding peptide-chitosan matrices could enhance by the optimized combinations and mixture ratios of different active peptides. Further, fibronectin mimicked multi integrin binding peptide-chitosan matrices could develop using the fibronectin derived peptides. These findings are important to control the biological activities of cell culture scaffold to culture the stem cell.

研究分野：生体材料学

キーワード：ペプチド キトサン インテグリン シンデカン 受容体間クロストーク 細胞接着 細胞培養基質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞再生医療への応用を目的とした組織・細胞工学の発達により、生体内において細胞の周りを取り巻いている細胞外環境に注目が集まっている。特に、細胞が構築する不溶性細胞外環境である細胞外マトリックス (ECM) は、個体の発生や修復、がんの浸潤などをコントロールし、細胞の周辺に ECM が正しく配置・供給されていることが必要不可欠であることがわかってきた。例えば、ラミニン-511-C 末端断片の組換えタンパク質が、幹細胞の単細胞培養を可能とすることで、これまでのコロニー培養と比較し、幹細胞増殖を促進するマトリックスであることが示された。また、キトサンに接着した線維芽細胞は培地の pH を 7.2 から 7.7 に換えるだけでキトサンから遊離し Spheroid 状の塊を形成することが可能となってきた。以上の背景をもとに、本研究計画では、申請者がこれまで作成してきたラミニンの機能を模倣したペプチド-キトサンマトリックスを、ラミニンと幹細胞の相互作用解明に用いることで、幹細胞の接着および増殖制御法を制御する細胞接着活性ペプチドの組合せを開発・最適化するとともに Spheroid 形成促進可能な細胞接着活性ペプチド-キトサンマトリックス新たに開発する事を目的とした。

### 2. 研究の目的

ES 細胞や iPS 細胞を用いた細胞再生医療の実現化が始まった。細胞再生医療に用いる医用材料には、病原体や免疫原の混入がないことが保証されなければならない。最近、幹細胞の増殖促進に有効な培養基質として細胞外マトリックスタンパク質ラミニンの組換えタンパク質が有効であることが示された。しかし、この組換えタンパク質も動物細胞を用いて作成されている。本研究では完全 Zeno フリーで、幹細胞の大量培養を可能とした培養基質として、ラミニンペプチド-マトリックスを創製する。本研究期間中、1) 幹細胞の未分化能維持に最適な条件をラミニンおよび ECM 機能活性ペプチドを用いて最適化、2) 細胞接着活性ペプチド-キトサンマトリックスを用いた簡便な Spheroid 形成方法の確立を行うことで、安全で細胞再生医療に応用可能な基盤材料を提供を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) レセプター特異的な混合パラメーターの最適化

幹細胞が多く発現している細胞表面受容体 (インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  と  $\alpha 3 \beta 1$ ) に着目し、これらと特異的に結合するペプチドを固定化したペプチド-キトサンマトリックスを用いて幹細胞培養能を評価する。異なる細胞膜受容体と結合する細胞接着活性ペプチドを様々な組合せや混合比で混合すると接着活性が上

昇する可能性があることを事前実験で確かめた。未分化維持・増殖促進を視野に入れた長期培養を行うことで、幹細胞培養・増殖に最適化したペプチドの混合比を決定し ECM と幹細胞との相互作用を解明するとともに、その制御法を開発する。

#### (2) Spheroid 形成を制御する基質特性の最適化

長期培養では、ペプチド-キトサン中のペプチドはほとんど分解され、細胞は自身が分泌する ECM がキトサンに沈着することでキトサンに接着していると考えられている。一方、キトサンに沈着した ECM は培地の pH をわずかに塩基性に上昇させるだけで遊離し、細胞塊を形成することが分かってきた。以上を組み合わせると、幹細胞をある程度増殖させ、小さいコロニー状にしてから、pH を変更するだけで Spheroid 状の幹細胞塊を得られる可能性がある。本研究では、上記現象を応用した簡易な Spheroid 形成制御法を開発する。

### 4. 研究成果

#### (1) レセプター特異的な混合パラメーターの最適化

生体内の細胞は、インテグリンやシンデカンなど様々なレセプターを介して ECM を同時に認識することで生体機能の維持、発生、創傷治癒など動的および静的な機能を担っている。特に、幹細胞の培養ではラミニンやフィブロネクチン、これらのタンパク質由来の組換えタンパク質断片が用いられて始めた。このことから、幹細胞の培養をペプチド高分子多糖マトリックス上で可能とする際にはラミニンだけではなく、フィブロネクチンの機能も有した細胞培養足場基質が求められと予想される。以前、我々はラミニン-111 由来の異

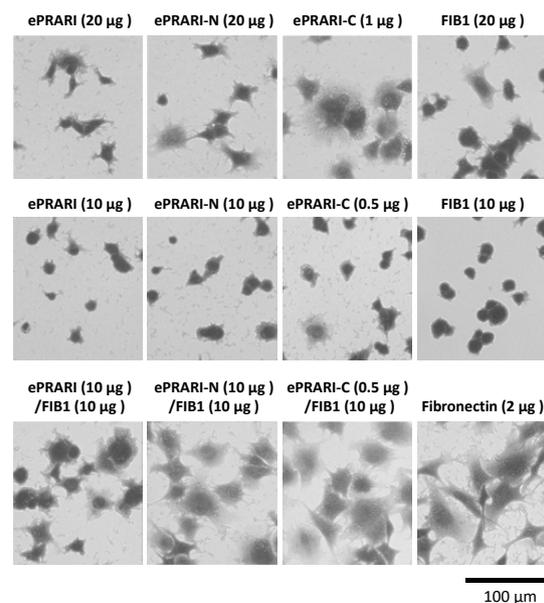


図1 (FIB1/ePRARI-C=25/1) ペプチド-キトサンマトリックスはフィブロネクチンと同等の細胞接着活性を示した

なる細胞接着活性ペプチドを高分子多糖に固定化することで、ラミニン-111用の機能を有した混合ペプチド高分子多糖マトリックスを開発した。本研究では、フィブロネクチンの機能を有した混合ペプチド高分子多糖マトリックスの開発をめざし、フィブロネクチン由来の6種類の異なる細胞接着活性ペプチドを様々な組合せで混合した混合ペプチド-高分子多糖マトリックスを調製し、フィブロネクチンとの生物活性を比較した(発表論文①)。フィブロネクチンは十種類以上のインテグリンサブタイプと結合することがわかっているが、タンパク質レベルでの基質特異性では、インテグリン  $\alpha v \beta 3$  とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介した細胞接着活性が最も強く観察され、ついでインテグリン  $\alpha 4 \beta 1$  および非インテグリン細胞接着受容体であるシンデカンなどと結合していると思われる。そこで、インテグリン  $\alpha v \beta 3$ 、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、インテグリン  $\alpha 4 \beta 1$  とシンデカンとに同時に結合する混合ペプチド-高分子多糖マトリックスの開発を目的とした。インテグリン  $\alpha 4 \beta 1$  と結合すると考えられる合成ペプチドはこれまでに主に5種類が報告されてきたが、これらを固定化したペプチド-キトサンマトリックスは、全てが細胞接着活性を示さなかった。この結果からペプチドを介したインテグリン  $\alpha 4 \beta 1$  との結合にはペプチドの立体構造が重要であると考えられたため、最も短いながらも比較的細胞接着活性が強かった PRARI 配列に注目して様々な延長 PRARI ペプチドをデザインし細胞接着活性の評価を行った。その結果、PRARI 配列をC末端側に延長した ePRARI-C が非常に強い細胞接着活性を示すことがわかった。また、ePRARI-C-キトサンマトリックスへの細胞接着活性はインテグリン  $\alpha 4 \beta 1$  のみでなく、シンデカンも介してい

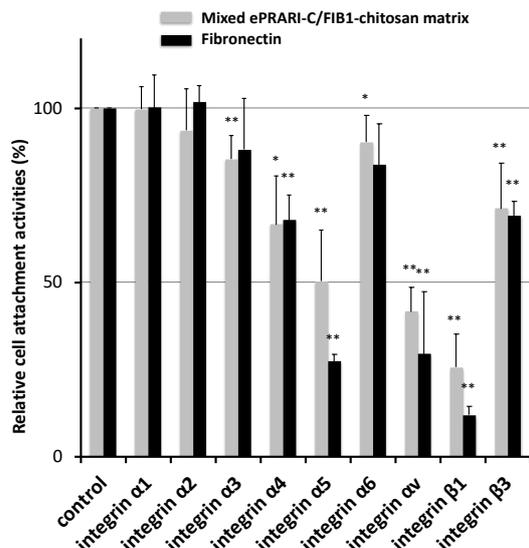


図2 (FIB1/ePRARI-C=25/1) ペプチド-キトサンマトリックスのインテグリン結合プロファイルはフィブロネクチンと同等であった

ることが示された。続いて、既知のインテグリン  $\alpha v \beta 3$  およびインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  結合活性ペプチドである FIB1 と ePRARI-C を様々なモル比で混合した2種混合ペプチド-キトサンマトリックスを作製したところ、FIB1:ePRARI-C=25:1 で固定化した2種混合 (FIB1/ePRARI-C) ペプチド-キトサンマトリックスが細胞接着活性を顕著に上昇させることが示された(図1)。また、FIB1/ePRARI-C キトサンマトリックスとフィブロネクチンの生物活性を比較したところ、細胞接着活性、細胞伸展の形状、神経突起伸長活性、インテグリン結合活性が同等であることを示した(図2)。本研究の成果から、ラミニン-111を模倣した混合ペプチド高分子多糖マトリックスと FIB1/ePRARI-C キトサンマトリックスを調整することで、幹細胞および他の細胞の培養を可能とする細胞培養基質の開発につながることを示唆された。

ECM と結合する主要なレセプターであるインテグリンは20種類のサブタイプが知られているが、ECM が様々なインテグリン活性を有することから異なるサブタイプ間のインテグリン-インテグリンクロストークに関しては未だ限定的な検証に限られている。以前、我々は、6種類の異なるインテグリン結合ペプチドを様々な組合せで混合した混合ペプチド-高分子多糖マトリックスを調製し、異なるサブタイプ間でのインテグリン-インテグリンクロストークを検証した。インテグリン  $\alpha 2 \beta 1$  とインテグリン  $\alpha 3 \beta 1$  結合ペプチドの組み合わせで混合ペプチド高分子多糖マトリックスの細胞接着活性が減少し、負の生物活性を示すクロストークを誘起することが示唆された。本研究では細胞接着活性の上昇を示す異なるインテグリン間クロストークを誘起する組合せに注目した解析を行った。その結果、インテグリン  $\alpha v \beta 3$  と結合するペプチ

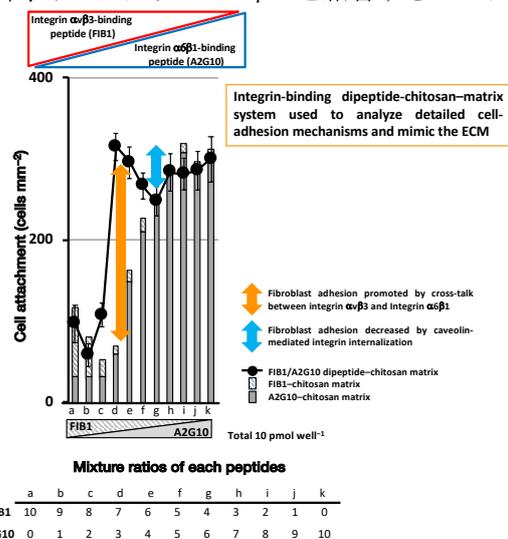


図3 インテグリン  $\alpha v \beta 3$  と結合するペプチドとインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  を固定化した混合ペプチド高分子多糖マトリックスの細胞接着活性

ドとインテグリンα6β1と結合するペプチドを混合し最適化すると細胞接着活性および伸展活性が3倍近くまで上昇することがわかった。本知見については現在論文投稿・審査中である。インテグリンαvβ3とインテグリンα6β1は幹細胞の基質への接着に特に重要な機能を果たしている論文が数多く報告されており、本組合せを利用することで長期培養を可能とした幹細胞培養基質の開発に利用できることが期待される。

これらの結果は、異なるレセプターに作用するペプチドを混合することで、細胞の機能をコントロールできるペプチド-高分子多糖マトリックスの作製が可能であり、本方法を用いることにより細胞レセプター間のクロストークを *in vitro* にて詳細に検証できること、異なる活性を持つ受容体間クロストークパラメーターの精査が細胞基質開発に重要であることを強く示唆している。また、幹細胞の培養基質として有用なラミニン-111だけでなくフィブロネクチンの機能を模倣した材料、および幹細胞培養基質の開発に大きく貢献することが期待できる。

(2) Spheroid 形成を制御する基質特性の最適化

研究期間中に(1)のレセプター特異的な混合パラメーターの開発を礎に基質特性(キトサンマトリックス)の最適化も並行して進めていた。しかしキトサンマトリックス上で幹細胞培養を一週間以上継続した際に、ペプチド-キトサンマトリックスの安定性が低下し、長期にわたる培養に問題を示すことがわかってきた。本問題がペプチドを起因するのか、キトサンマトリックスを起因とするのかを特定するのに時間がかかり、研究計画の最終目的である Spheroid 形成促進可能なペプチド-キトサンマトリックスの作製に至らなかった。しかしながら、原因究明後は新たにペプチド-キトサンマトリックスの安定化を増す手法を研究期間内に開発することに成功し、すでに学会発表を行っている(学会発表⑭⑮)。今後も引き続き本研究計画で目的としたペプチド-キトサンマトリックスの開発を続けていく。

また、以上の結果を社会に開示する目的として、ペプチド-高分子多糖マトリックスの開発と応用に関してまとめた総説を3報発表した(発表論文⑧、発表図書①②)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8件)

① Hozumi K, Nakamura K, Hori H, Miyagi M, Nagao R, Takasaki K, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2016) Mixed Fibronectin-Derived Peptides Conjugated to a Chitosan Matrix Effectively Promotes Biological Activities through Integrins, α4β1, α5β1, αvβ3, and Syndecan. *Biores. Open Access*, 5, 356-366,

10.1089/biores.2016.0037.

② Kumai J, Hozumi K, Yamada Y, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2016) Effect of Spacer Length and Type on the Biological Activity of Peptide- polysaccharide Matrices. *Biopolymers*, 106, 512-520, 10.1002/bip.22785.

③ Fujimori C, Kumai J, Nakamura K, Gu Yingzi, Katagiri F, Hozumi K, Yamada Y, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2016) Biological activity of peptide-conjugated polyion complex matrices consisting of alginate and chitosan. *Biopolymers*, 108, 10.1002/bip.22983.

④ Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M. (2016) Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. *Exp. Cell Res.*, 344, 75-85

⑤ Enomoto-Okawa Y, Maeda Y, Harashima N, Sugawara Y, Katagiri F, Hozumi K, Hui KM, Nomizu M, Ito Y, Kikkawa Y. (2016) An anti-human Lutheran glycoprotein phage antibody inhibits cell migration on laminin-511: epitope mapping of the antibody. *PLoS ONE*, 10.1371/journal.pone.0167860

⑥ Kikkawa Y, Sugawara Y, Harashima N, Fujii S, Ikari K, Kumai J, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M. (2017) Identification of laminin α5 short arm peptides active for endothelial cell attachment and tube formation. *J. Pept. Sci.*, 23, 666-673, 10.1002/psc.2987

⑦ Kobayakawa T, Matsuzaki Y, Hozumi K, Nomura W, Nomizu M, Tamamura H. (2018) Synthesis of a Chloroalkene Dipeptide Isostere-Containing Peptidomimetic and Its Biological Application. *ACS Med. Chem. Lett.*, 9, 6-10, 10.1021/acsmchemlett.7b00234

⑧ Hozumi K, Nomizu M. (2018) Cell adhesion activity of peptides conjugated to polysaccharides. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, in press

[学会発表] (計 17件を代表者および指導大学院生が発表)

① 保住建太郎等. フィブロネクチン由来新規インテグリンα4β1結合ペプチドを用いたペプチド-キトサンマトリックスの開発; 第47回日本結合組織学会学術大会; 20150515-20150516; 東京

② 熊井準, 保住建太郎等. インテグリンに結合するペプチドA2G10を固定化した高分子多糖マトリックスの生物活性におよぼすリンカーの効果; 第47回日本結合組織学会学術大会; 20150515-20150516; 東京

③ K. Hozumi, H. Hori, M. Miyagi, F. Katagiri, Y. Kikkawa, et al. PRARI motif from heparin binding domain III of fibronectin conjugated chitosan matrix binds integrin α4β1 and syndecan; 9th International Conference on Proteoglycans and

10th Pan- Pacific Connective Tissue Societies Symposium(国際学会); 20150824-20150826; Seoul, Korea

④保住建太郎等. フィブロネクチンの機能を模倣したペプチド-キトサンマトリックスの開発; 第64回高分子討論会; 20150915-20150917; 仙台

⑤J. Kumai, K. Hozumi, A Nakagawa, L. Yichen, F. Katagiri, et al., Identification of active sequences from human laminin alpha5 chain G domain; 2015 Annual Meeting the American Society for Cell Biology; 20151212-20151216; San Diego, CA, USA

⑥ K. Hozumi, H. Hori, M. Miyagi, F. Katagiri, Y. Kikkawa, et al., Development of PRARI and RGD motif from fibronectin conjugated chitosan matrix binds integrin alpha4beta1 and heparin; 2015 Annual Meeting the American Society for Cell Biology; 20151212-20151216; San Diego, CA, USA

⑦保住建太郎等. ペプチド高分子多糖マトリックスを用いた線維芽細胞接着活性を促進するインテグリンクロストークの同定; 第48回日本結合組織学会学術大会; 20160624-20160625; 長崎市 長崎

⑧中村亨太郎, 保住建太郎等. ペプチドポリイオンコンプレックスマトリックスの作成と生物活性; 第48回日本結合組織学会学術大会; 20160624-20160625; 長崎市 長崎

⑨保住建太郎等. ペプチド-キトサンマトリックスを用いたインテグリン-インテグリンクロストークの同定; 第65回高分子討論会; 20160914-20160916; 横浜

⑩中村亨太郎, 保住建太郎等. ペプチドポリイオンコンプレックスマトリックスを用いたバイオマテリアル; 第65回高分子討論会; 20160914-20160916; 横浜

⑪K. Hozumi, K. Nakamura, H. Hori, M. Miyagi, R. Nagao et al. Mixed fibronectin derived peptides conjugated chitosan matrix effectively promotes biological activities via integrin a4b1, a5b1, avb3, and syndecan; 2016 Annual Meeting the American Society for Cell Biology; 20161203-20161207; San Francisco, CA, USA

⑫K. Hozumi, K. Nakamura, H. Hori, M. Miyagi, R. Nagao et al. Fibronectin derived peptides conjugated chitosan matrix promotes neurite outgrowth and cell adhesion via integrin and syndecan; The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease(国際学会); 20170215-20170218; 仙台

⑬保住建太郎等. Identification of integrin cross-talk on dermal fibroblasts using peptide polysaccharide matrix; 第49回日本結合組織学会学術大会; 20170617-20170618; 津市 三重

⑭ K. Hozumi, H. Yamada, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Development of laminin active-peptide conjugated chitosan hydrogel

crosslinked by dicarboxylic acids on Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase; ACS 254th National Meeting(国際学会); 20170819-20170824; Washington DC

⑮保住建太郎等. ラミニン由来活性ペプチド-キトサンゲルを用いた唾液腺細胞分化促進活性の評価; 第66回高分子討論会; 20170920-20170924; 松山市 愛媛

⑯ K. Hozumi, C. Fujimori, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Development of laminin active peptide-polysaccharide matrices as cell adhesive biomaterials; The 16th International Symposium on Advanced Technology(国際学会); 20171101-20171102; 八王子市 東京

⑰ K. Hozumi, S. Enomoto, Y. Teranishi, F. Katagiri, Y. Kikkawa et al. Integrin alphavbeta3 and alpha6beta1 cross-talk of dermal fibroblasts on integrin specific peptide chitosan matrix; 2017 ASCB/EMBO meeting; 20171202-20171206; Philadelphia, PA, USA

[図書] (計 2件)

①保住建太郎, 熊井準, 野水基義. 細胞接着モチーフ(ラミニン)-医療・診断をささえるペプチド科学; 66-71; 2017; (株)シーエムシー出版

②熊井準, 保住建太郎, 野水基義. ラミニン由来活性ペプチドと再生医療 -医療・診断をささえるペプチド科学; 107-113; 2017; (株)シーエムシー出版

[その他]

ホームページ等

東京薬科大学・薬学部・病態生化学教室

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/byotaiseika/>

ResearchMap

<http://researchmap.jp/KentaroHozumi/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

保住建太郎 (HOZUMI KENTARO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 10453804