

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760652

研究課題名(和文) アクリル酸グラフト繊維を用いた新規神経幹細胞培養技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel culture technique for neural stem cells using polyacrylic acid-grafted fabrics

研究代表者

森 英樹 (Mori, Hideki)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30450894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ナイロン(PA66)メッシュ表面へのラジカル重合によるポリアクリル酸(PAAc)の導入と、そのPAAcのカルボキシル基へのEDC/NHS架橋によるタンパク質(matrigel等)の化学修飾を施し、それらの材料に対する胎齢14日目のマウス大脳由来神経幹細胞の接着性と増殖、分化に対する影響を解析した。PA66メッシュやMatrigel修飾PA66メッシュへの神経幹細胞の接着が確認された。Matrigel修飾PA66メッシュ上へ接着した細胞の増殖率が最も高く、自発的な分化傾向も抑えられた。

研究成果の概要(英文)：Acrylic acid (AAc) was grafted onto Nylon (PA66) fabrics through graft polymerization induced by gamma-ray pre-irradiation. Activation of the carboxyl groups in poly AAc (PAAc) induced by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/ N-hydroxysuccinimide (NHS) treatment allowed covalent immobilization of proteins (Matrigel, etc.). The effects of the PAAc-grafted and protein-immobilized fabrics on the adherence and differentiation of mouse neural stem/progenitor cells (NSPCs) were investigated. Matrigel-immobilized PA66 fabric was the best for the growth of NSPCs in the experimental fabrics.

研究分野：生物工学、幹細胞生物学

キーワード：neural stem cell Nylon fabric cell culture spheroid

1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患の一つの治療手段として期待されているのが神経幹細胞の細胞移植治療である。神経幹細胞は中枢神経系を構成する細胞(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)への多分化能と自己増殖能を有する組織幹細胞である。

神経幹細胞を移植治療に用いるためには、治療に要する細胞量を確保するために細胞培養プロセスを必要とする。神経幹細胞は無血清培養下でニューロスフェアと呼ばれる細胞凝集塊を形成しながら増殖させる培養法が広く用いられている。一見、浮遊培養のように見えるが静置培養であるため実際には細胞は培養底に沈み、底面と接しながら細胞増殖する。そのため細胞培養許容量は培養底の底面積に依存する。そこで本研究では、培養底に依存しない培養法として、ニューロスフェア形成した神経幹細胞の一部を繊維に接着、増殖させる新規培養法を開発することを提案した。

2. 研究の目的

本研究は神経幹細胞を大量培養するために、培養底の底面に依存しない繊維材料を用いた新規培養技術を開発する目的で下記の2項目について研究をおこなった。

(1) コラーゲン等のタンパク質修飾繊維の作製条件の検討し、細胞増殖に利用できる繊維のラインナップを作製する。

(2) 繊維上で神経幹細胞を培養し、培養された細胞の特性を評価(細胞の増殖、ニューロスフェア形成の有無、神経幹細胞マーカーの発現)する。

3. 研究の方法

(1) ナイロン(PA66)繊維へのアクリル酸グラフト重合

PA66 繊維へのアクリル酸の導入はガンマ線照射によるラジカル重合によっておこなった。アクリル酸重合の他に、ガンマ線照射によって繊維表面へのポリビニルアルコール(PVA)やアルギン酸の付加も試みた。

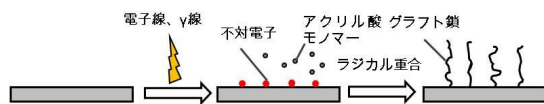


図1. ポリアクリル酸グラフト重合の流れ.

繊維径 180 μm の PA66 繊維 (11×11 mm、図2) に窒素封入下で 0 ~ 60 kGy のガンマ線を照射した。ガンマ線照射後の PA66 繊維を 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%(v/v)

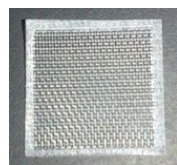


図2. PA66 繊維.

のアクリル酸水溶液に浸漬し、繊維表面でポリアクリル酸をグラフト重合した。浸漬時間

0~24 時間の重量変化を測定しグラフト率を求めた。

(2) アクリル酸グラフト繊維へのタンパク質の導入

繊維表面に導入したポリアクリル酸のカルボキシル基へ水溶性カルボジイミドによる化学架橋反応によってコラーゲン分子や ECM 成分を含むマトリゲルを修飾した。

PA66 繊維表面へのタンパク質の導入には EDC/NHS による化学修飾法を用いた。修飾タンパク質量は NaOH による溶出後、フルオレサミン蛍光測定法によって定量した。修飾タンパク質には BSA、Gelatin、Matrigel 等を用いた。

(3) 細胞増殖率とニューロン、アストロサイト分化率の比較

タンパク質修飾した PA66 繊維上で神経幹細胞を 1 週間培養し、その増殖率を既存のニューロスフェア培養法等と比較した。また、繊維上に接着したニューロスフェア内部の神経幹細胞および分化した細胞の分布を比較するために、サンプルの凍結切片を作製し、免疫染色後に蛍光顕微鏡観察によって解析した。細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によるマーカー遺伝子 (*Nes*, *Sox2*, *Gfap*, *S100b*, *Tubb3*) の発現量も比較した。

4. 研究成果

(1) PA66 繊維へのポリアクリル酸(PAAc)の導入とタンパク質の修飾

ガンマ線照射後のアクリル酸ラジカル重合により PA66 繊維上へ付加されたポリアクリル酸(PAAc)のグラフト率を図3に示した。

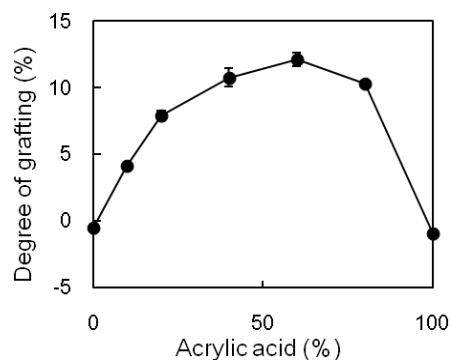


図3. アクリル酸濃度の違いによるポリアクリル酸のグラフト率の変化.

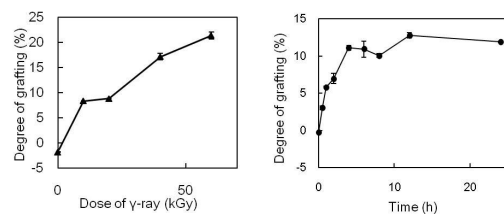


図4. ガンマ線の線量(左)および反応時間(右)によるポリアクリル酸グラフト率の変化.

反応条件 60% (v/v) アクリル酸で最もポリアクリル酸が導入された。

アクリル酸溶液への浸漬時間に関しては反応時間 6 時間で既にプラトーに達していた (図 4)。

1635 cm^{-1} 付近の C=O 伸縮振動に由来するピークによりポリアクリル酸修飾を確認した (図 5)。繊維上へ PVA やアルギン酸等の付加も試したが、分解や細胞接着に不適であったため後の実験では使用しなかった。

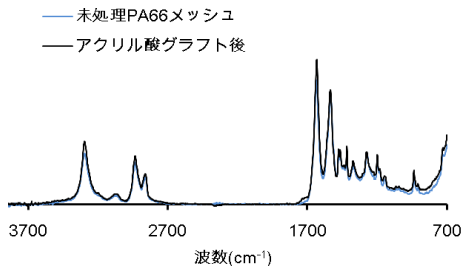


図 5 . ポリアクリル酸修飾 PA66 繊維の FT-IR (ATR 法) スペクトル .

PA66-PAAc 繊維に修飾されたタンパク質量は BSA(32 ng/mm^2), Gelatin(48 ng/mm^2), Matrigel (11 ng/mm^2) であった。

(2) タンパク質修飾 PA66-PAAc 繊維上における神経幹細胞の接着および増殖

胎齢 14 日目のマウス大脳由来神経幹細胞を予め調製した各繊維材料(PA66, PA66-PAAc, BSA 修飾繊維(PA66-PAAc-BSA), Gelatin 修飾繊維(PA66-PAAc-Gelatin), Matrigel 修飾繊維(PA66-PAAc-Matrigel))上へ 100,000cells/ml の細胞密度で播種した。細胞は各々の繊維上へ接着し、増殖した (図 6)。

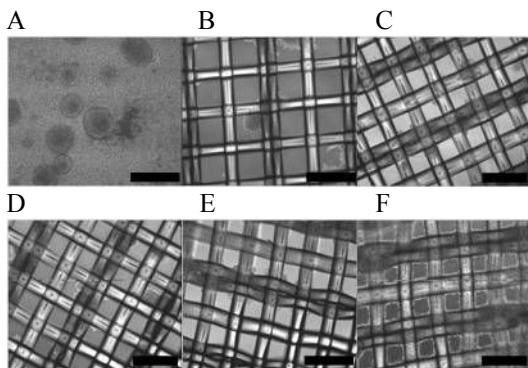


図 6 . 繊維上で培養した神経幹細胞の顕微画像 . A) control, B) PA66, C) PA66-PAAc, D) PA66-PAAc-BSA, E) PA66-PAAc-Gelatin, F) PA66-PAAc-Matrigel. scale bar = 200 μm .

未処理の PA66 や PA66-PAAc にも細胞は接着し、細胞の集塊状に集まりながら増殖したのに対し、PA66-PAAc-Matrigel 上では細胞は繊維上を薄く広がりながら接着、増殖した。細胞を 2 週間培養し、細胞の増殖率を比較したところ、PA66-PAAc-Matrigel 上を用いて培

養した条件で細胞の増殖率がもっとも高かった (図 7)。

接着細胞は神経幹細胞のマーカータンパ

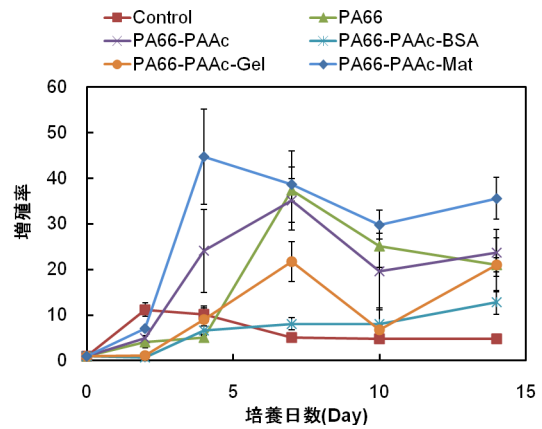


図 7 . 繊維に接着した神経幹細胞の増殖率 .

ク質である Nestin 陽性の細胞、グリア細胞のマーカーである GFAP 陽性の細胞がいずれの条件でも観察された。

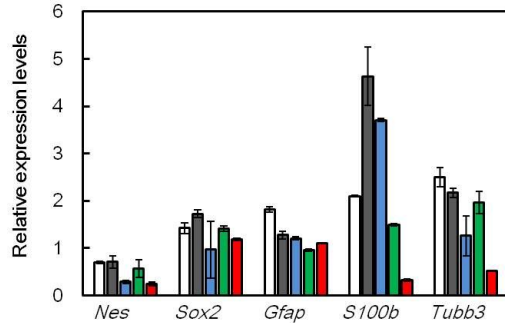


図 8 . 繊維上で培養した細胞のマーカー遺伝子の発現 . White) PA66, gray) PA66-PAAc, blue) PA66-PAAc-BSA, green) PA66-PAAc-Gelatin, red) PA66-PAAc-Matrigel、コントロール (ニューロスフェア培養) との相対発現量として表した .

定量的 RT-PCR の結果から、PA66-PAAc-Matrigel 上で培養した細胞では分化マーカーである *Gfap*, *S100b*, *Tubb3* の発現がいずれも低く、一方で PA66-PAAc、PA66-PAAc - BSA 上で培養した細胞ではアストロサイトのマーカーである *S100b* の発現が高い傾向であった (図 8)。未修飾の PA66 ではコントロールのニューロスフェア培養に比べて少し分化マーカーが高い傾向が見られた。

以上の結果を総括すると、Matrigel 修飾したポリアクリル酸グラフト導入 PA66 繊維に細胞は最も良く接着し、増殖した。また、繊維によって分化誘導が促される傾向も見られなかったことから、調製した繊維材料の中では神経幹細胞培養繊維材料として最も適していると考えられる。Matrigel 修飾したポリアクリル酸グラフト導入 PA66 繊維を用いて神経幹細胞の繊維接着培養が可能となっ

た。長期培養による評価と合わせて、今後詳細な検討を実施していきたい。

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 2件)

A.-S. T. Ulset, H. Mori, M. Ø. Dalheim, M. Hara, B. E. Christensen, Influence of amino acids, buffers, and pH on the γ -irradiation-induced degradation of alginates, *Biomacromolecules* 15, 2014, 4590-4597

H. Mori, K. Shimizu, M. Hara, Dynamic viscoelastic properties of collagen gels with high mechanical strength, *Materials Science and Engineering C* 33, 2013, 3230-3236

[学会発表](計 5件)

中亮介、森英樹、原正之、網目状ナイロン繊維に対する神経幹細胞/前駆細胞の接着性評価、第36回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(東京都) 2014年11月17~18日

中亮介、森英樹、原正之、ポリアクリル酸修飾ナイロン繊維に対する神経幹細胞/前駆細胞の接着性の評価、日本バイオマテリアル学会 第9回関西若手研究発表会、京都大学再生医科学研究所(京都市) 2014年8月5日

森英樹、太田愛里、原正之、力学的特性の異なるガンマ線架橋ポリビニルアルコールゲル上における神経幹細胞/前駆細胞の培養、日本化学会第94春季大会、名古屋大学 東山キャンパス(名古屋市) 2014年3月27~30日

森英樹、川瀬文音、原正之、放射線架橋ポリビニルアルコールゲルを用いた神経幹細胞/前駆細胞の培養、第65回日本生物工学会大会(広島市) 2013年9月18~20日

森英樹、川瀬文音、原正之、ガンマ線架橋ポリビニルアルコールゲル上における神経幹細胞/前駆細胞の培養、日本化学会第93回春季年会、2013年3月22~25日

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~hara/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
森 英樹 (MORI HIDEKI)
大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：30450894

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし