

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350556

研究課題名(和文) 周期性ペプチドによる細胞集合体の誘導と評価

研究課題名(英文) Evaluation of Cell Aggregation Induced Peptide for 3D Culture

研究代表者

平野 義明 (HIRANO, Yoshiaki)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：80247874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞集合体を誘導する新しい方法として、周期性ペプチドを細胞培養液に添加するだけで誘導できることを見出した。その結果、肝細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞など広範囲に利用できることが分かった。肝細胞や軟骨細胞については、周期性ペプチドを用いて細胞集合体を誘導した方が、細胞の活性マーカーが通常の培養に比べて優位に活性が高くなることが明らかになった。

また、間葉系幹細胞においては、細胞集合体を形成してから分化誘導を行った方が、通常の培養に比べて分化効率ならびに活性マーカーが優位に高くなることが示された。これらについても、先と同様Cell-Cellコンタクトの向上が要因であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the presence of (Lys-Pro)_n (n=10, 12) peptide in cell culture medium, cell aggregation was observed beginning on the 3 day of culture, and the cell aggregations formed maintained their shape over the 7-day. Cell aggregations are induced by periodic peptides to form aggregates of fibroblasts, hepatocytes, and human mesenchymal stem cells (hMSCs). We evaluated (Lys-Pro)_n derivative periodic peptides, such as (Lys-Pro-Pro)₈ and (Lys-Lys-Pro)₈, with respect to the relationship between the structure of the peptide chain and the function of hepatocyte, and hMSC aggregates. The periodic peptides induced the formation of uniformly sized cell aggregates. Albumin production was comparable in cell aggregation and 2D monolayer cultures on day 1, increased dramatically on day 3. Periodic peptides induced cell aggregation exhibited a relatively higher albumin production with the 2D monolayer. A result of ALP activity of hMSC aggregation was higher than 2D monolayer cultures.

研究分野：生体材料化学・ペプチド工学

キーワード：細胞集合体 周期性ペプチド 線維芽細胞 肝細胞 軟骨細胞 間葉系幹細胞 旋回培養 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

現在、細胞集合体(spheroid)を形成する手法は、ハンギングドロップ法、旋回培養、非接着培養床を利用したもの、遠沈法など、ある程度確立された物理的手法のみである。細胞集合体は近年注目されている細胞移植治療に不可欠であるが、物理的手法ではそのサイズや個数が制御出来ず、効率的でないなど数多くの問題点を残している。また、生体内では、3次元構造を形成していても、組織培養中には細胞集合体を形成しない場合も多数確認されている。さらに、細胞集合体の機構を解明することは、細胞組織・器官・個体システムの再構成・設計の理解に大いに役立つものと考えられる。

現在では、細胞膜と相互作用するペプチド・細胞膜貫通ペプチド・抗菌ペプチドなど細胞膜に関連するペプチドが、多数生化学・細胞生物学分野で解明されている。そのペプチド配列をプレイクスルーとして、細胞集合体を誘導するペプチド配列(Lys-Pro)_n(n=10~)を世界ではじめて明らかにした。これらペプチドを、培地に添加するだけで細胞集合体を誘導することが可能であると考えた。

そこで、これらペプチド配列(Lys-Pro)_nをより最適化ならびにメカニズムを解析し、このペプチドの作用機構を分子科学的観点から考察する。このペプチドを利用することで細胞集合体の大きさや個数の制御が可能であり、効率的に培養を行うことのできる化学的手法を開発可能と考えられる。つまり全ての細胞種に適用できる「ペプチド分子を用いた化学的手法による細胞集合体の形成」という新たな観点から本研究を展開する。細胞集合体を効率よく多量に作製することは、再生医療具現化にとってなくてはならない要素技術であり、本研究はその中心的役割をなすものとする。さらには、iPS細胞やES細胞に適用できる可能性を有していることから、本研究内容は医学・生物学分野への影響のみならずライフイノベーション創出に寄与できる内容である。

2. 研究の目的

細胞集合体を誘導する新しい方法として、周期性ペプチドを細胞培養液に添加するだけで誘導できることを見出した。その周期性ペプチドの分子構造等も最適化でき、線維芽細胞においては再現性よくスフェロイドに誘導することが可能となった。そこで、本研究ではこのペプチド配列を全ての細胞種に適用するように最適化することに加えて、肝細胞や間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)の細胞集合体の形成を実現することを目的とする。また、肝細胞においては医薬品の安全性評価用、間葉系幹細胞では分化誘導を行うことにより3次元組織の構築を目指す。これら成果は、創薬分野で重

要な細胞アレー技術や再生医療における細胞移植治療の基礎を構築するものであり大変重要な研究分野である。また、細胞集合体誘導ペプチドを最適化し、そのメカニズムを動的に解析することにより、組織工学材料や再生医療に応用することの可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞集合体誘導ペプチドのアミノ酸配列の最適化

塩基性アミノ酸であるリシンとイミノ酸であるプロリンからなる(Lys-Pro)_nの繰り返し配列が n=10~12 の時に、細胞集合体を誘導することを明らかにした。これらペプチドを、培地に添加するだけで誘導することが可能であることをすでに明らかにしている。

(Lys-Pro)_n配列の重要性を解明するため、類似体である(Lys-Pro-Pro)_n、(Lys-Lys-Pro)_n、(Lys-Lys-Pro-Pro)_nを合成し、これらペプチドによる細胞集合体誘導活性を評価した。

また、(Lys-Pro)_nの挙動を追跡するために、ペプチドを FITC など種々の方法でラベル化してペプチドの細胞との相互作用を解析した。これらの解析により、細胞集合体の形成にメカニズムを追及した。

さらには、細胞集合体を誘導するペプチドの探索の手がかりとして、細胞膜と相互作用するペプチド、膜貫通ペプチド、抗菌性ペプチド、細胞膜融合ペプチドについて精査し、有用なアミノ酸配列を検索した。

これらのペプチド合成には、小職の研究室で改良を加えた Fmoc 固相合成法を用いて行い、大量かつ高純度で得た。

(2) 細胞集合体誘導ペプチドと各種細胞との相互作用の解析

細胞集合体の形成が L929 細胞で確認されたペプチドに関しては、肝細胞・軟骨細胞・骨芽細胞・幹細胞を用いて細胞集合体を誘導した。その際、血清の有無など培地条件や添加のタイミングなど詳細に検討した。肝細胞においては、アルブミン産出量など肝細胞としての機能を詳細に評価した。

さらには、細胞集合体としての機能の指標として、分化誘導の様子を確認することも合わせて行った。具体的にはヒト間葉系幹細胞 hMSC や誘導分化能がある細胞株である MC3T3-E1 細胞株を用いて骨芽細胞への分化を、P19.CL6 細胞株は分化誘導により拍動する心筋へ分化誘導実験を行い、ペプチドの作用機構と分化などの細胞機能の関連性を追跡した。

これら結果は、肝細胞による薬物代謝システムの解析や再生医療における細胞移植治療の可能性や指針を示すものであり、本研究の根幹をなすものである。

(3) 細胞集合体誘導ペプチドによる細胞培

養環境依存性の検討

細胞集合体誘導ペプチドは、培地に添加することによって細胞の移動を促し細胞集合体を形成すると考えられる。そこで、2種類の細胞共培養系でペプチドを添加することによって2種類の細胞が同種同士集合するかどうかを確認した。

これらの結果によっては、組織構築のメカニズム解明に役立つものと考えられる。

(4) 細胞移動速度依存性の検討

ペプチド濃度が細胞内の化学反応を支配する因子となると考えられるので、細胞集合体のサイズ・細胞の移動速度・集合体形成速度や細胞密度の観点から検討する。物理的手法とは違い化学的手法は、ペプチドの濃度に応じて細胞集合体形成の最適値を速度論・細胞との相互作用係数などを用いて検討した。

これら細胞集合体の形成メカニズムを追跡することは、シグナル伝達・細胞間コミュニケーションなど細胞の高次機能を理解する上で大変重要であると考えられ、細胞組織・器官・個体システムの再構成や制御の面でも大いに貢献できる課題であるとの考えのもと研究を推進した。

4. 研究成果

塩基性アミノ酸であるリシンとイミノ酸であるプロリンからなる(Lys-Pro)_nの繰り返し配列がn=10~12の時に、細胞集合体を誘導することを明らかにした。これらペプチドを、培地に添加するだけで誘導することが可能である。そこで、細胞集合体誘導ペプチドのアミノ酸配列(Lys-Pro)_nの最適化を行った。そのペプチドを利用して、細胞集合体誘導ペプチドと幹細胞や各種臓器由来細胞との相互作用の解析をおこない、細胞集合体の形成の有無について考察した。

(Lys-Pro)_n配列の重要性を解明するため、類縁体である(Lys-Pro-Pro)_n、(Lys-Lys-Pro)_n、(Lys-Lys-Pro-Pro)_nを合成し、これらペプチドによる細胞集合体誘導活性を評価した。

その結果、(Lys-Pro-Pro)_n、(Lys-Lys-Pro)_n (n=8)において細胞集合体を得ることができた。その際の培地への添加濃度は、ペプチド配列中のLys残基数に影響することが明らかになった。(Lys-Pro)_nペプチドについて、肝細胞・軟骨細胞・幹細胞を用いて細胞集合体の誘導を試みた結果、いずれの場合においても細胞集合体を形成できることがわかった。

軟骨細胞においては、グリコサミノグリカンの産出量が多いことが分かった。以上のように、リシンとプロリンからなる周期性ペプチドは、細胞集合体誘導活性を有しており、各種細胞への適応範囲も広いことが明らかになった。

細胞集合体誘導ペプチドと各種細胞との相互作用を解析した。細胞集合体を線維芽細胞、肝細胞、軟骨細胞、ヒト間葉系幹細胞を用いて誘導を行った。細胞集合体の機能を評

価するために、肝細胞ではアルブミンの産出量を定量したところ、2次元培養よりも細胞集合体を形成した方が3倍程度高くなることが明らかになった。また、軟骨細胞では、アルカリホスファターゼ活性(ALP活性)が、先と同様2次元培養より優位に高い値を示した。

さらには、ヒト間葉系幹細胞を用いて細胞集合体を形成した後、軟骨細胞に分化誘導した。その結果、分化誘導した軟骨細胞においても、ALP活性が2次元培養の時より2~3倍程度高くなった。

また、細胞の共培養システムを構築し、2種類の細胞の住み分けが可能かを検討した。その結果、2種類の細胞の共培養システムを構築でき、1週間程度培養することが可能となった。しかしながら、2種類の細胞の判別手法を確立することが課題となった。細胞種の組み合わせは、細胞培養培地の組成が影響することがも合わせて分かった。また、機能評価の指標であるタンパク質定量においても同様に定量手法の確立が必要である。研究期間中に改善を試みたが明確な解析手法の確立までには至らなかった。以上のように、2種の組み合わせは、容易には実現できないと推定できる。

細胞集合体誘導ペプチドと主に平面培養から大量培養を指向し旋回培養へと培養手法を検討した。その結果、旋回培養でも細胞集合体を誘導できることが分かった。また、ALP活性も集合体を形成した方が、平面培養と同様に高くなることが明らかになった。加えて、旋回培養は回転速度のコントロールが細胞集合体形成に大きく影響することも分かった。

細胞集合体の形成メカニズム解析のため、遺伝子の網羅的解析を行った。培養5日後に発現上昇した遺伝子に関しては、細胞集合体化と直接的に関連すると考えられる細胞増殖関連の他に、免疫や炎症、ケモタキシス関連など多数のカテゴリーがヒットした。ペプチドを用いて誘導した細胞集合体は、炎症および免疫関連、ケモタキシス関連タームが多くヒットしたが、通常の間葉系幹細胞のフェロイド化に伴って、免疫や炎症に対する特性が変化することや、ケモタキシス関連遺伝子が発現変動することが報告されているので、その傾向と一致することが明らかになった。

以上、総括すると、細胞集合体を誘導する新しい方法として、周期性ペプチドを細胞培養液に添加するだけで誘導できることを見出した。このペプチド配列を全ての細胞種に適用できるかを検討した。その結果、肝細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞など広範囲に利用できることが分かった。

肝細胞や軟骨細胞については、周期性ペプチドを用いて細胞集合体を誘導したところ、細胞の活性マーカーは通常の培養に比べて細胞集合体を誘導した方が優位に活性が高く

なることが明らかになった。これは、3次元化することにより Cell-Cell コントラクトが向上し、活性が高くなったためである。

また、間葉系幹細胞においては、細胞集合体を形成してから分化誘導を行った方が、通常の培養に比べて分化効率ならびに活性マーカーが優位に高くなることが示された。これらについても、先と同様 Cell-Cell コントラクトの向上が要因であると考えられる。さらには、細胞の移植等の医療応用を検討するには分化した細胞が多量に必要であることを勘案し、間葉系幹細胞の系で旋回培養条件の検討を行った。その結果、旋回速度と細胞障害との関係が明らかになった。旋回培養で生成した細胞集合体は、先の場合と同様に通常の培養に比べて分化効率ならびに活性マーカーが優位に高くなることが示された。細胞集合体の形成メカニズムには、アクチン線維が寄与していると推察できる結果も得られたが、今後はなお詳細な検討が必要である。

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)

[雑誌論文](計13件)

1. E. Nakatsuka, K. Inai, M. Oka, S. Kakinoki, Y. Hirano, Evaluation of self-assembling 2,5-diketopiperazine nanostructures, Peptide Science, 査読有, 2015, 2016, 295-298.
2. A. Ikeda, H. Taketa, G. A. Sathi, Y. Hirano, S. Iida, T. Matsumoto, Functional peptide KP24 enhances submandibular gland tissue growth in vitro, Regenerative Therapy, 査読有, 3, 2016, 108-113.
3. H. Taketa, G. A. Sathi, M. Farahat, K. A. Rahman, T. Sakai, Y. Hirano, T. Kuboki, Y. Torii, T. Matsumoto, Peptide-modified Substrate for Modulating Gland Tissue Growth and Morphology In Vitro, Scientific Reports, 査読有, 5, 2015, 11468.
4. Y. Futaki, Y. Iwasaki, Y. Tabata, Y. Hirano, Functional Evaluation of Proline Periodic Peptide that Induces Formation of Cell Aggregation, Peptide Science, 査読有, 2014, 197-200.
5. Y. Futaki, Y. Hirano, Functional Evaluation of a Periodic Peptide that Induces the Formation of Spheroids, Peptide Science, 査読有, 2013, 373-374.

[学会発表](計55件)

1. Y. Hirano, Y. Futaki, S. Kakinoki, Evaluation of cell aggregation induced peptide for 3D culture, 10th World biomaterials Congress, 2016/05/19, Montreal Convention Center, Montreal, (Canada).
2. Y. Hirano, Y. Futaki, S. Kakinoki, Functional Evaluation of Periodic Peptide that induces formation of cell aggregation, 2015 Biomedical Engineering Society Annual

Meeting, Tampa, 2015/10/09, Florida(USA).

3. 平野義明, 二木雄大, 柿木佐知朗, 石塚雄一, ペプチドによる細胞集合体の誘導と生物活性評価, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月9日, 京都テルサ(京都)
4. 平野義明, 二木雄大, 柿木佐知朗, ペプチドによる細胞集合体の形成と分化誘導, 第64回高分子討論会, 2015年9月16日, 東北大学(宮城)
5. 山本雄貴, 竹内万純, 柿木佐知朗, 平野義明, 周期性ペプチド固定化基材上での細胞の接着挙動, 第61回高分子研究発表会(神戸), 2015年7月17日, 兵庫県民会館(兵庫)

[図書](計2件)

1. 平野義明, 監修: 岡野光夫 他, 東京化学同人, バイオマテリアル: その基礎と先端研究への展開, 2016, 27-51.
2. 平野義明, 日本再生医療学会監修, 株式会社メディカルトリビューン, 再生医療用語ハンドブック 2015 総ページ数 333,

[産業財産権]

取得状況(計1件)

名称: 細胞凝集塊誘導ペプチド、及びその細胞凝集塊誘導ペプチドを用いた細胞凝集塊の形成方法

発明者: 平野義明

権利者: 学校法人 関西大学

種類: 特許

番号: 特許第 5498734 号

取得年月日: 平成 26 年 3 月 14 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/biomol/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 義明 (HIRANO, Yoshiaki)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 8 0 2 4 7 8 7 4

(4)研究協力者

二木 雄大 (FUTAKI, Yudai)

山本 雄貴 (YAMAMOTO, Yuki)