

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292096

研究課題名(和文) 樹木糖鎖でナノ構造を制御するバイオ界面の幹細胞培養戦略

研究課題名(英文) Strategic Design of Biointerfaces by Wood Carbohydrates for Cell Culture Applications

研究代表者

北岡 卓也 (KITAOKA, Takuya)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：90304766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医療の実現を志向した生体外細胞培養技術に期待が集まっている。本研究では、樹木糖鎖や生理機能糖を集積したバイオインターフェースと、表面改質型多糖ナノファイバーによる細胞培養を試みた。その結果、(1)GlcNAc6集積固定化膜によるマウス筋芽細胞C2C12の配列と細胞融合・成熟、(2)結晶性ナノセルロースの表面カルボキシル基量に依存したマウス線維芽細胞NIH-3T3の接着誘導、(3)キチンナノファイバーによるヒト胎児腎細胞TLR2発現HEK293の免疫応答の活性化等の成果を得た。これにより、細胞組織をマテリアル構造が機能制御する「グライコナノアーキテクニクス」の研究基盤の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cell culture technology in vitro has recently attracted much attention in regenerative medicine. Herein, we propose the structural and biofunctional design of glyco-based cell culture scaffolds by using cello-/chito-oligosaccharides and/or crystalline polysaccharide nanofibers. In this project, we have completed the following achievements: (1) cell alignment and fusion of mouse myoblasts on self-assembled GlcNAc6-monolayers with various geometries, (2) promotion of the cell attachment of mouse fibroblasts NIH-3T3 on surface-carboxylated cellulose nanofibers, and (3) activation of the immune response of TLR2-expressing HEK293 cells on chitin nanofibers. Wood carbohydrates have potentials to act both as building blocks and bio-ligands for cell culture applications. Our challenge will open up a new phase of "Glyconanoarchitectonics", based on the functional manipulation of cellular tissues by glyco-biointerface materials.

研究分野：木質科学・多糖材料化学

キーワード：糖鎖 自己組織化 ナノ材料 バイオインターフェース 細胞培養 分化制御 シグナル伝達 バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

(1) 再生医療の実現に向けた生体外細胞培養技術の発展が希求されており、中でも核酸・タンパク質に次ぐ第三の生命鎖である糖鎖の機能利用に期待が集まっている。糖鎖生命科学の深化にともない、生体細胞の表面糖鎖が膜タンパク質と相互作用することで、生体情報伝達や免疫などの生命活動に重要な役割を担うことが明らかになっているが、この糖鎖-細胞界面、いわゆるバイオインターフェースで生じる特異的な生体反応を機能利用する材料設計は遅れている。近年、マテリアルが積極的に細胞や生体組織に働きかける“マテリアルセラピー”の研究が盛んになっており、糖鎖系材料にも保水性や生体適合性を越えた革新的機能の開拓と応用が期待されている。

(2) 樹木の主成分であるセルロースは、地球上で最も豊富に存在する天然高分子であり、再生産可能なバイオマスとして注目されている。我々は、セルロースの規則的かつ強固な分子集合状態に着目し、甲殻類の構造多糖のキチンとオリゴ糖レベルで自己集積化させた新規バイオインターフェースを構造設計し、糖鎖密度に依存したヒト肝ガン細胞 HepG2 の解毒酵素活性の強制誘導等に成功している。この新知見の学理解明と応用が導く、生体外細胞培養技術の新展開に期待が持たれる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、セロヘキサオースとキトヘキサオースのハイブリッド造膜など、様々な糖鎖自己組織化基板を設計し、マウス筋芽細胞 C2C12 やマウス神経幹細胞 NSC などを用いることで、界面糖鎖密度の違いやレール状のマイクロパターン化による細胞接着・分化挙動を詳細に検討した。

(2) 細胞外マトリックス ECM のナノファイバー形状に着目し、樹木セルロースナノファイバーやキチンナノファイバーの表面選択的に TEMPO 酸化でカルボキシ基を導入することで、導入量依存的なマウス線維芽細胞 NIH-3T3 の接着・伸展成長やヒト胎児腎細胞 TLR2 発現 HEK293 の免疫応答挙動を検討した。

3. 研究の方法

(1) 各種糖鎖試料: セロヘキサオース (Glc6)、キトヘキサオース (GlcNAc6)、コンドロイチン硫酸 (CS) を脱イオン水に 5-20 mM で溶解させ、チオセミカルバジド TSC (200 mM)、還元剤 NaBH_3CN (2 M) を添加後、70°C のオイルバスにて 48 h かく拌し、還元末端基を S 誘導体化した。糖鎖 TSC を脱イオン水に 1 mM になるように溶解後、Au 蒸着で表面をコートしたガラス基板等を室温にて 24 h 浸漬させた。Au 蒸着時にマスキングを施すことで、糖鎖のマイクロパターンを設計した。得られた基板を脱イオン水とエタノールで洗浄を繰り返すことで、各種糖鎖 SAM を得た (図 1)。

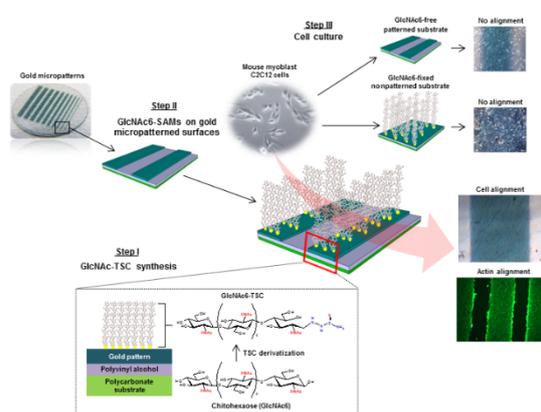


図 1 マイクロパターン化糖鎖自己組織化薄膜上での筋芽細胞 C2C12 の培養と細胞配列

(2) 針葉樹パルプまたは市販キチン粉末に、2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) と NaBr, NaClO を添加して TEMPO 酸化を施し、結晶表面をカルボキシ化したナノファイバー (TOCN, TOChN) を調製した。各々の水分散液 (0.8 wt%, pH=7, COOH: 0.59-1.21 mmol/g) に、polyamidoamine epichlorohydrin (PAE) を加え、ガラス基板の上にスピコート造膜し、40°C で 48 h 乾燥させ、細胞培養に供した。

(3) 細胞培養用プレート (TCPS, 24 well) に作製した各種基板を設置し、DMEM 培地 (10% ウシ胎児血清、5% ペニシリン/ストレプトマイシン, 500 μL) を添加し、懸濁した各種細胞を分注した (最終濃度 $2.0\text{-}5.0 \times 10^5$ cells/well)。37°C, 5% CO_2 条件下で 12-72 h 培養後、顕微鏡観察や各種バイオアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) マウス由来神経幹細胞 NSC の分化促進

セロヘキサオースとキトヘキサオースのハイブリッド自己組織化基板上でマウス由来 NSC を培養したところ、糖鎖密度の違いで細胞分化に変化が見られた。市販の細胞培養基板 TCPS では細胞増殖のみが観察される培養条件において、キトヘキサオースの密度が高くなるにつれて神経幹細胞塊ニューロスフィア NS の約 40% (200 μm 以上の NS ではほぼ 100%) で神経細胞様の突起伸長が認められた。

(2) CS 自己組織化膜での NSC 細胞培養挙動

主要な ECM の CS の自己組織化膜上で NSC の培養を行ったところ、TCPS では分化誘導が起こらない 10% FBS 添加培地において、培養初期から NS の 46% に分化が見られ、培養 7 日後の NS では 66% の分化が認められた。また、分化誘導用 horse serum 未添加でも分化が観察された (図 2)。TCPS とは明らかに異なる糖鎖バイオインターフェース機能が発現した。

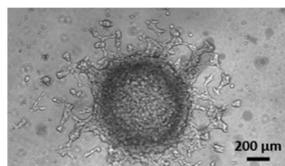


図 2 CS 膜上での NSC の無血清培養と分化

(3) ヒト骨格筋衛星細胞の培養挙動

筋衛星細胞はCSをECMとして通常静止期にあるが、CS発現量の低下とともに不可逆的に筋芽細胞へと分化することが知られている。そこで、CS膜上で同細胞を培養し増殖率を測定したところ、培養4日目においてTCPSと比べ20%高い細胞増殖が確認された。Au基板では細胞接着が起こらないことから、細胞基底膜様のCS膜と接触することで、細胞接着が促進する効果が認められた。

(4) マウス筋芽細胞の配列と細胞融合・成熟

マウス筋芽細胞C2C12を、マイクロレールのキトオリゴ糖自己組織化基板で培養したところ、細胞伸長方向の制御に成功した(図1)。マイクロパターン化糖鎖薄膜での培養細胞の筋形成について、Myosin heavy chain (MyHC) アイソフォームの遺伝子発現に着目したところ、培養3~5日後にMyHC-2aの発現量依存的な細胞融合の開始が認められた(図3)。培養7日後には筋芽細胞同士の融合が起こり、筋管細胞への分化に成功した。この現象は、“分化誘導血清を含まない”培養条件においても観察されたことから、GlcNAc6集積薄膜が培養細胞の細胞融合に直接働きかける、極めてユニークなバイオ界面効果を見出した。

さらに、筋形成関連遺伝子と細胞接着性タンパク質のアクチンフィラメントの発現挙動を検証した。GlcNAc6固定化パターンでは、筋組織特異的遺伝子MyoDの発現が培養初期に上昇し、増殖後は低下した。それと同時にMyogeninの発現が上昇し、アクチンフィラメントの明瞭な配列が起こり、グルコースの取り込みに関与するGLUT4の発現も上昇したことから、筋収縮が活発になっていることが認められた。これらの結果から、分化誘導血清を含まない培養条件でも、GlcNAc6集積薄膜が筋芽細胞の筋組織への分化誘導と筋管細胞の成熟に関与することを明らかにした。

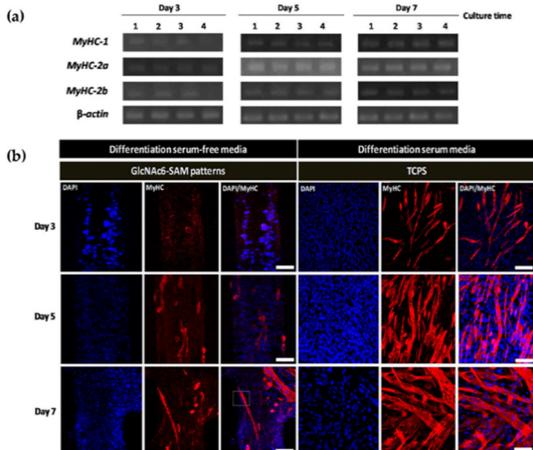
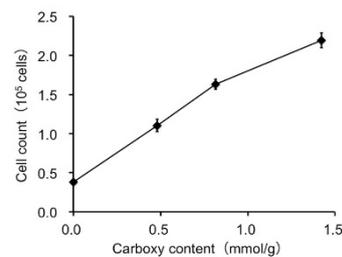


図3 マイクロパターン化GlcNAc6膜上でのC2C12の培養: (a) MyHCsのReal-time PCR, (b) 培養細胞の免疫染色(無血清培養と分化誘導) Lane 1: TCPS; Lane 2: GlcNAc6-SAM pattern (200 μm); Lane 3: GlcNAc6-SAM pattern (500 μm); Lane 4: GlcNAc6-SAM pattern (1000 μm).

(5) 表面カルボキシ化多糖ナノファイバー膜での細胞培養

生体内ECMの物理構造(剛直なナノファイバー)と化学構造(ヒアルロン酸に見られるカルボキシ基の繰り返し構造)の双方を模倣した膜を調製し、マウス皮膚細胞NIH-3T3を培養した。TOCNは水分散性ナノファイバーのため、PAEにより耐水性を付与して用いた。TOCN基板は水の接触角が 42.6° で細胞接着には不利な親水性の界面であったが、TCPS(水の接触角 72.9°)に匹敵する接着性を示した。しかし、カルボキシ基を持たないナノファイバー基板ではほとんど細胞接着が見られず、死細胞の凝集塊が観察された。高分子電解質のCMC基板でもほとんど接着しなかった。含有カルボキシ基量が異なるTOCN基板を作製し、細胞培養試験に供したところ、カルボキシ基量の増加とともに、60h培養後の生細胞数は劇的に増加した(図4)。水の接触角はカルボキシ基量の増加とともに小さくなり、細胞接着にはより不利な性質を示したにも関わらず、この結果になったことから、未知の細胞接着機構の存在が示唆された。詳細な機構は不明であるが、ナノファイバー表面の物理化学構造がNIH-3T3細胞の接着に重要で



あることが示され、細胞培養の基材設計におけるバイオミメティクスの面から、興味深い結果が得られた。

図4 TOCN基板上で60h培養後のNIH-3T3生細胞数

次に、TEMPO酸化で多糖ナノファイバーに導入したカルボキシ基が細胞機能に与える影響を検討した。用いたHEK293細胞は、TLR2が刺激を受けると細胞内で自然免疫系のシグナルが活性化され、細胞に炎症反応が生じる。TOCN基板では0.84 mmol/gのカルボキシ基量で最も強い炎症反応を示し、TOCN基板ではカルボキシ基の導入にともない活性が著しく低下した。この炎症度は、TCPSにポジティブコントロールのZymosanを添加した場合よりも明らかに大きく、多糖ナノファイバーがHEK293細胞表面のTLR2と強く作用することが示唆された。セルロース自体は細胞毒性および生理活性を持たないが、TEMPO酸化を行うことで、ナノファイバー界面にグルクロン酸構造が導入される。TLR2は、N-アセチルグルコサミンとウロン酸で構成されるヒアルロン酸と応答する。ヒアルロン酸は規則的な二糖の繰り返し構造をとるが、分子量によって細胞との接触が変化し、細胞応答が増減することが知られている。本実験では、TOCN表面のカルボキシ基密度もTLR2を介した細胞応答因子となり得ることが見出された。

本研究により、細胞培養におけるオリゴ糖鎖の界面集積構造の重要性が実証された。また、天然の構造的な多糖類の特徴である剛直なナノファイバー構造が、生体内のECMを物性と界面特性の両方を模倣できる可能性が示唆された。本成果は、幹細胞の多分化能と自己複製能をマテリアルが機能制御する未踏領域「グライコナノアーキテクトニクス」の研究基盤の構築につながると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① P. Poosala, H. Ichinose, T. Kitaoka, Spatial geometries of self-assembled chitohexaose monolayers regulate myoblast fusion, *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, **17**(5), 686; pp. 1-16 (2016)
DOI: 10.3390/ijms17050686
- ② P. Poosala, T. Kitaoka, Chitooligomer-immobilized biointerfaces with micro-patterned geometries for unidirectional alignment of myoblast cells, *Biomolecules*, 査読有, **6**(1), 12; pp. 1-13 (2016)
DOI: 10.3390/biom.6010012
- ③ M. Hatakeyama, T. Kitaoka, H. Ichinose, Heterologous expression of fungal cytochromes P450 (CYP5136A1 and CYP5136A3) from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: functionalization with cytochrome *b₅* in *Escherichia coli*, *Enzyme and Microbial Technology*, 査読有, **89**(-), 7-14 (2016)
DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.03.004
- ④ 北岡卓也、セルロースのナノ構造特性に着目したマテリアル機能の創発、*応用物理*, 査読無, **86**(2), 117-121 (2017)

[学会発表] (計33件)

- ① T. Kitaoka (招待講演), Biomaterials and Catalysts, Academic Seminar at Kasetsart University, Bangkok (Thailand), 2016年12月1日
- ② C. Chuensangjun, T. Kitaoka, S. Sirisansaneeyakul, Preparation of cellulose nanofibers from wood/non-wood resources by TEMPO-mediated oxidation, 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2016), Chiang Mai (Thailand), 2016年11月28-30日
- ③ S. Ukeba, T. Kitaoka, H. Ichinose, Diversity of sesquiterpene synthase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community, Miyazaki (Japan), 2016年10月27-29日
- ④ 北岡卓也 (招待講演)、ナノセルロースのアイデンティティ、京都グリーンケミカル・ネットワーク第7回勉強会「セルロー

スナノファイバー最前線セミナー」、京都、2016年9月21日

- ⑤ M. Hatakeyama, T. Kitaoka, H. Ichinose, Heterologous expression and functionalization of fungal cytochromes P450 (CYP5136A1 and CYP5136A3) in *Escherichia coli*, 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Vancouver (Canada), 2016年7月22-26日
- ⑥ 北岡卓也 (招待講演)、多糖のナノアーキテクトニクスが切り拓く未来材料、第9回多糖の未来フォーラム、京都、2015年11月10日
- ⑦ 北岡卓也 (招待講演)、変幻自在のセルロース材料研究、第8回木質科学シンポジウム、東京、2015年6月20日
- ⑧ T. Kitaoka (招待講演)、Concept-driven materials design of glyco-nanocomposites, Japanese-European Workshop on Cellulose and Functional Polysaccharides, Berlin (Germany), 2014年10月16日
- ⑨ P. Poosala, T. Kitaoka, Biofunctional micropatterning of glyco-decorated scaffolds affects myoblast cell alignment, 2014 TAPPI International Conference on Nanotechnology of Renewable Materials, Vancouver (Canada), 2014年6月23-26日
- ⑩ F. Uemura, T. Kitaoka, Glyco-decorated biointerface directly stimulates the intracellular signaling of cultured cells, 2014 TAPPI International Conference on Nanotechnology of Renewable Materials, Vancouver (Canada), 2014年6月23-26日

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)/○取得状況 (計0件)
なし

[その他]

生物資源化学研究室ホームページ
<http://bm.wood.agr.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北岡 卓也 (KITAOKA, Takuya)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：90304766

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

一瀬 博文 (ICHINOSE, Hirofumi)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00432948