

研究種目：新学術領域研究  
研究期間：2008～2012  
課題番号：20106014  
研究課題名（和文） リガンド固定化相と細胞表面で形成されるソフト界面での動的現象の評価と応用  
研究課題名（英文） Evaluation and Application of Dynamic Motion on Soft Interface Between Immobilized Ligand and Cell Surface  
研究代表者  
山岡哲二（ヤマオカテツジ）  
独立行政法人国立循環器病研究センター・生体医工学部・部長  
研究者番号：50243126

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：細胞ローリング・抗体・抗CD34抗体・幹細胞・表面修飾

### 1. 研究計画の概要

ソフト界面で起こるダイナミックな現象の一つにローリングがある。本研究では、細胞親和性リガンドで修飾したソフト界面上で起こる細胞のローリング現象を詳細、かつ、動的に把握し、その特性ゆえに発揮される機能を、新たなバイオマテリアル開発へと応用する。具体的には、幹細胞表面レセプターに対する抗体を固定化したソフト界面において、組織幹細胞を精密に分離できる現象を見出した。現在、①種々のリガンド固定化ソフト界面における細胞表面レセプターの吸脱着反応の物理化学的解析、②細胞分離システムとしてのソフト界面構造を評価する。

### 2. 研究の進捗状況

平成20年度までに、シリコンチューブあるいはガラスチューブ内腔にポリアクリル酸の高分子鎖を導入したリガンド固定界面を構築し、この界面において特定の表面マーカー分子密度を有する細胞を分離できることを明らかにした。抗CD34抗体固定化カラムにより分離した細胞フラクションの骨分化能力の検討に加えて、抗CD90抗体固定化カラムにより分離した間葉系幹細胞のサブフラクションの心筋分化特性について検討を行ない、CD34に認められた傾向と同様の傾向が認めている。しかし、細胞と基材との非特異的な相互作用は細胞の連続的なローリングを阻害し、分離精度を低減させる。その原因として、界面におけるリガンド固定化密度やその配向性が影響しているものと考えられた。平成21年度に本プロジェクトにより新たに導入したImagEM EM-CCD高速度カメラにより、CD34陽性モデル細胞、

CD34陽性モデル細胞、および、骨髄由来間葉系幹細胞が、作成したリガンド固定化カラム中での細胞ローリング速度の定量化が可能になった。その結果、細胞の非特異的吸着によりカラム中で停止する細胞フラクションが多く存在することが明らかとなった。

これを解決するためには、抗体分子を単層でかつ、均一に固定化する事が有効である。リガンドを単層で固定化するために、種々の条件でガラス表面に対してシランカップリング剤の処理によりアミノ基を導入した。X線光電子分光法(XPS)により修飾したガラス表面の構造を解析した結果、表面からの深さ16nmの範囲でのみアミノ基に由来する400eV付近のXPSシグナルを検出した。導入したアミノ基を活性化した後に、還元型抗体を固定化した。還元型抗体を固定化することにより、抗体認識部位の配向性を均一に制御することが可能となる。非特異吸着を効率よく抑制できると期待される両親媒性ベタインモノマーのブラシ構造をATRPにより構築した。その結果、非特異吸着が大きく抑制され、カラムからの溶出率(細胞回収率)が飛躍的に向上し、細胞溶出パターンもシャープなものに変化した。今後、これらのカラムにより分離した細胞の心筋等機能細胞への分化能を検討する必要がある。

### 3. 研究の進捗状況

①当初の計画どおりに進展している。

(理由)プロジェクト開始時にはグラフト重合方により、本システムの有用性が定性的には示されていた。本プロジェクトにより、細胞の機能や分化特性をも分離できる可能性が示唆された。一方で、高速度カメラの導入

により、その非特異的相互作用に基づく分離特性の低さが定量的に示された。しかしながら、この点は、北野教授らとの共同研究により、ほぼ完全に解決できるめどが立ち想定された計画通りに進行している。今後、高分子ブラシ構造の導入により想定以上の高い効果も期待している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

これまでに行ってきた抗 CD34 抗体固定化カラムにより分離した細胞フラクションの骨分化能力の検討に加えて、抗 CD90 抗体固定化カラムにより分離した間葉系幹細胞のサブフラクションの心筋分化特性について検討を行ない、CD34 に認められた傾向と同様の傾向が認められている。これらを、高分子ブラシソフト界面上にて同様に検討を進めるとともに、心筋分化能力の高い P19CL6 細胞株を用いてその分化特性との関連の詳細な検討を行う予定である。

#### 5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計6件)

- 1) Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama, Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate. Tissue Engineering, 15(3), 345-353, 2009
- 2) A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components. Journal of Artificial Organs, 12, 111-117, 2009
- 3) A. Mahara and T. Yamaoka, Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling. Biotechnology Progress, 26(2), 441-447, 2010
- 4) A. Mahara and T. Yamaoka, Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column. Biomaterials, 31, 4231-4237, 2010
- 5) T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, Y. Moritan, and T. Yamaoka, Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve. Tissue Engineering Part C, 16, 979-987, 2010
- 6) T. Yamaoka, A. Mahara, Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells. Reactive and Functional Polymers, 71, 362-366, 2011

〔学会発表〕(計24件)

- 1) 馬原 淳、リガンド固定化界面を利用した組織幹細胞分離法の開発、生体医工学シンポジウム 2008、2008/9/20、大阪
- 2) 馬原 淳、抗体固定化界面を用いた細胞分離と機能評価、第 57 回高分子討論会、2008/9/25、大阪
- 3) 馬原 淳、リガンド固定化流路による幹細胞サブポピュレーションの分離、バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、2008/11/18、東京
- 4) 馬原 淳、細胞移植治療における幹細胞分離基材の開発、第 46 回日本人工臓器学会大会、2008/11/28、東京
- 5) 岡田華奈、抗 CD34 抗体を単層に固定した間葉系幹細胞分離カラム、第 46 回日本人工臓器学会大会、2008/11/28、東京
- 6) 馬原 淳、リガンド固定化界面で分離された間葉系幹細胞の分化能評価、第 8 回日本再生医療学会総会、2009/3/6、東京
- 7) 岡田華奈、抗体を単層で固定化したカラムによる間葉系幹細胞分離プロファイルの検討、第 8 回日本再生医療学会総会、2009/3/6、東京

- 8) Azizi MISKON, Effect of Extracellular Matrix Components on Beating Behavior of Cardiomyocytes and Differentiation Behavior of Stem Cells in vitro, 2nd Asia Biomaterial Congress (2st ABMC), 2009/6/26, シンガポール
- 9) 馬原 淳、抗体固定化カラムにより純化された間葉系幹細胞の分化能評価、第 38 回医用高分子シンポジウム、2009/07/27、東京
- 10) Tomo EHASHI, Different Host Responses To Hydrophobic or Hydrophilic Scaffolds For Tissue Engineering, TERMIS-WC 2009, 2009/09/02, 韓国
- 11) 山岡哲二、細胞ローリングカラムにより純化した間葉系幹細胞の表面マーカー密度と分化能力分析、第 58 回高分子討論会、2009/09/17、熊本
- 12) 山岡哲二、特異的細胞ローリングを誘起する界面構造の設計と細胞分離効率、生体医工学シンポジウム 2009、2009/09/18、千葉
- 13) Sachiro Kakinoki, Bioactive interface composed of ECM-like peptides on PLA scaffolds for nerve regeneration, ISBN2009, 2009/11/9-10, 東京
- 14) 江橋 具、パターン化された有孔材料に対する生体応答の解析、第 47 回日本人工臓器学会大会、2009/11/13、新潟
- 15) 山岡哲二、脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法、第 9 回日本再生医療学会総会、2010/3/18、広島
- 16) 馬原 淳、Zwitterionic Telomer Brush で構築されたリガンド固定化界面による細胞分離カラムの作製と応用、第 20 回バイオ高分子シンポジウム、2010/7/28、東京
- 17) 馬原 淳、Three-dimensional culture of mesenchymal stem cells encapsulated in resilin-like polypeptide hydrogels, ACS Meetings, Conferences & Expositions, 2010/08/23, ボストン
- 18) 馬原 淳、リガンド固定化ソフト界面の構築と細胞分離カラムへの応用、第 59 回高分子討論会、2010/9/16、北海道
- 19) 山下 敦、心筋分化誘導における細胞培養基板表面特性の影響、第 48 回日本人工臓器学会、2010/11/19、仙台
- 20) Carlos Agudelo, MSC separation by an antibody-immobilized telomere brush surface, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、2010/11/29、広島
- 21) 柿木佐知朗、動的特性の異なる SAM 界面に対する血小板の接着性と活性化、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、2010/11/30、広島
- 22) 山岡哲二、Antibody-immobilized cell rolling column for quick stem cell separation, PACIFICHEM 2010 (2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), 2010/12/16, ハワイ
- 23) 馬原 淳、Design of antibody-immobilized surface for cell separation system, 第 20 回日本 MRS 学術シンポジウム、2010/12/22、横浜
- 24) 山岡哲二、幹細胞純化のための細胞ローリングカラムの設計と評価、日本化学会第 91 春季年会、2011/3/11、講演予稿集

〔図書〕(計4件)

- 1) 馬原 淳、次世代医療のための高分子材料工学、シーエムシー出版、168-177、2008
- 2) 馬原 淳、バイオマテリアル -生体材料- 26 巻 4号、日本医学館、276-281、2008
- 3) 山岡哲二、第 46 回日本人工臓器学会大会 教育講演「吸取性材料と組織再生」、人工臓器、38 巻 1 号、5 p、2009
- 4) 山岡哲二、ゲルコントロールゲルの上手な作り方とゲル化の抑制一、情報機構、8p、2009

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)  
該当無し
- 取得状況(計0件)  
該当無し
- 〔その他〕  
該当無し