

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：84404

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008 年度～2012 年度

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 Phenomena on the Soft Interface
between Ligand-Immobilized Surface and Cell Surface

研究代表者

山岡哲二（YAMAOKA TETSUJI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

研究成果の概要（和文）：フローサイトメーター(FACS)や磁気ビーズ法(MACS)より簡便で、かつ、特異細胞表面マーカーの「密度」に依存した連続的な分離が可能で、さらに、従来法のように幹細胞を抗体などで標識する必要のない新たな幹細胞分離用細胞ローリングカラムを開発した。白血球はその表面糖鎖と血管内腔のセレクチン分子との連続的な相互作用により、血管内腔をローリングすることで炎症部位へと集積する。本研究では、この細胞ローリング現象を応用して、幹細胞表面マーカーに対する特異抗体を内腔面に固定化したチューブ状カラムを作製し、単離間葉系幹細胞(MSC)を表面マーカー密度で分離し、各分画に存在する幹細胞の分化能特性を詳細に検討することで、従来よりさらに純度の増した幹細胞画分の分離を可能にした。また、非特異的相互作用を強く抑制するベタイン構造を表面抗体固定化部位に導入する事で、非特異的な強い細胞の相互作用が抑制され安定な細胞ローリングを再現することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：We successfully developed a stem cell rolling column with a soft-interface bearing anti cell surface marker molecules antibody. A clued mesenchymal stem cell suspension was separated using these column and two different subpopulation of MSC was discovered in CD34 low and high fractions. We came up with a big problem about the non-specific cell entrapment on the antibody-immobilized column, and it reduces the efficiency of specific cell purification based on cell-rolling. To overcome this problem, newly modified surfaces were designed and evaluated for the cell-rolling surface. Hydrophilic polymer grafting, silane coupling reagents, and SAM on Au were selected and evaluated for the cell-rolling surfaces. As the results, zwitterionic telomer brush containing 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) efficiency suppressed the non-specific interaction between cells and antibody-immobilized surface. Finally, poly[MPC-co-n-butyl methacrylate (nBMA)-co-N-vinylformamide (NVF)] copolymers were found to be very effective to suppress the interaction and achieved the very stable cell rolling and excellent cell separation property.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2012 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
総計	43,500,000	13,050,000	56,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学，生体材料学

キーワード：細胞ローリング／抗体／幹細胞／高分子界面／スルホベタイン

1. 研究開始当初の背景

再生医療の発展と時を同じくして、ES 細胞や間葉系幹細胞などが見いだされ、さらに、人工多能性幹細胞 (iPS) が報告されると、細胞を利用した新たな医療が急激に進歩した。2010 年 11 月、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針が改訂され、虚血改善などの優れた臨床研究の成果が報告されている。骨髄などから採取した幹細胞を同じ患者に注入する自家細胞移植が主流であるが、基材への接着挙動や磁気ビーズ法などで単離された幹細胞の純度の低さが問題となっている。この点は、iPS 細胞などから分化誘導された有用細胞でも問題となる。

2. 研究の目的

幹細胞は、細胞の表面マーカーの種類やその発現量の変化をともなって成熟細胞へと分化する。従って、磁気ビーズのように細胞表面マーカーの有無による単離だけでなく、目的マーカー分子の発現量も細胞純化のための指標として有望である。我々は、フローサイトメーター(FACS)より簡便に、かつ、連続的な幹細胞分離が可能であり、さらに、FACS のように細胞を標識する必要のない新たな細胞ローリングカラムを開発した。細胞ローリングは、ソフト界面で起こるダイナミックな現象の 1 つである。たとえば、白血球は糖鎖とセレクチンとの連続的な相互作用により、血管内壁をローリングすることで炎症部位へと集積する。本研究では、幹細胞表面マーカーに対する特異抗体を内腔面に固定化したチューブ状カラムを作製し、単離間葉系幹細胞 (MSC) をローリングさせることで分離し、各分画の細胞の分化能特性などを詳細に検討した。

3. 研究の方法

3.1. 抗体固定化界面での MSC 分離

内径 0.5mm、長さ 10cm のチューブ状カラム内腔にポリアクリル酸をグラフト重合し、CID 活性化法にて抗 CD34 抗体を固定化して細胞ローリングカラムを作製した。マウス骨髄由来 MSC を従来法で採取し、 2×10^4 個をカラムに注入してリン酸緩衝液の液流により細胞をローリングさせ、15 秒ごとにフラクションを分取することで、サブ populations を分離した。原理的には、CD34 陰性細胞は抗体固定化表面と相互作用せず、また、CD34 高発現細胞ほど、ゆっくりとローリングするために溶出時間が遅延する。

3.2. 非特異吸着の抑制

最大の問題点は、細胞溶出率が 40%程度と低いことであった。作製した界面における細胞の動的挙動を超高速カメラ顕微鏡により観

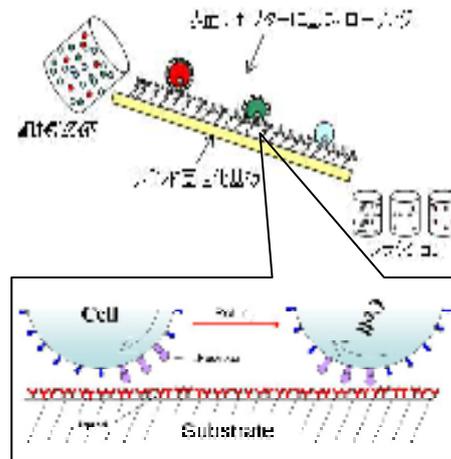


Figure 1 Cell separation on ligand-immobilized surface.

察した結果、液流によりローリングしながらカラム内腔の界面を進む MSC とともに、界面状で停止し二度と脱離しない細胞群が多く観察された。詳細な検討の結果、アクリル酸分子による非特異的な接着挙動が大きいことが問題であることが判明した。そこで、グラフト鎖のように厚みを有する抗体固定化ではなく、単層状に配列することおよび、非特異的吸着を低減させる図 3 に示したさまざまな固定化手法を検討した。

3.3. 界面との完全な相互作用

もう一つの問題は、カラム内腔面と接触すること無く流される細胞群であった。一部の細胞は液流に流されてあるポイントからローリングする。細胞ローリング速度は細胞表面情報を正確に反映するが、この現象がカラムの分離特性を大きく減少させる。そこで、図 4 に示したマイクロチップを開発した。円状の流路中に MSC 懸濁液を流し、ある時点で所定時間停止させることで、全細胞が流路下面の抗体固定化面と接触する。

4. 研究成果

4.1. 抗体固定化界面での MSC 分離

各フラクション中の細胞の CD34 レベルを FACS で定量したところ、溶出時間の遅延とともに CD34 発現量が上昇することが確認され、コンセプトが確認された。次に、骨芽細胞分化培地で各フラクション中の MSC を処理した結果を図 2 に示した。初期のフラクション #2・#3、または、後期のフラクション #6・#7 において強い骨分化が認められた。この骨分化は CBFA1 のリアルタイム PCR 解析によっても裏付けられた。しかし、Osteonectin, Osteopontin の発現プロファイルは、CD34 の発現密度が高いフラクション #6 や #7 で比較

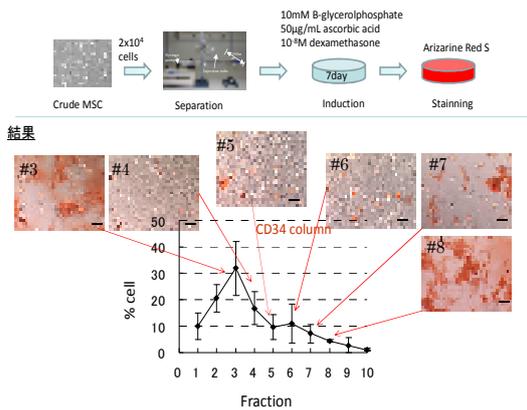


Figure 2. Osteogenic differentiation of column separated MSCs.

的強く発現していた。骨髄細胞に含まれる培養基材接着精細胞が MSC とされるが、多くの細胞郡を含んでいることもよく知られており、CD34 陽性の骨芽前駆細胞の存在も報告されている。骨髄細胞中の CD34 陽性細胞を抗 CD34 抗体固定化カラムにより間葉系幹細胞を分離することで、多能性を有する本来の MSC と骨細胞への分化が運命づけられた骨芽前駆細胞との分離に成功した。すなわち、同様の手法により、固定化するリガンドを種々選択することで、神経細胞や、脂肪細胞、骨格筋細胞、あるいは心筋細胞へ分化する細胞群を単離することが可能であることを示している。この手法は、細胞自身に標識することなく分離精製できる手法であり、蛍光標識する必要があるフローサイトメトリーや磁気ビーズ法などと比較して、よりイナートな条件で細胞の分離や回収が可能であり、ソフト界面を利用した新たな細胞分離・診断デバイスとして期待できる。

4. 2. 抗体固定化界面での MSC 分離

最終的には、zwitterionic telomere brush 界面の有用性を見いだした。細胞やタンパク質の非特異的な吸着を抑制できることが報告されている上に、原子移動ラジカル重合法

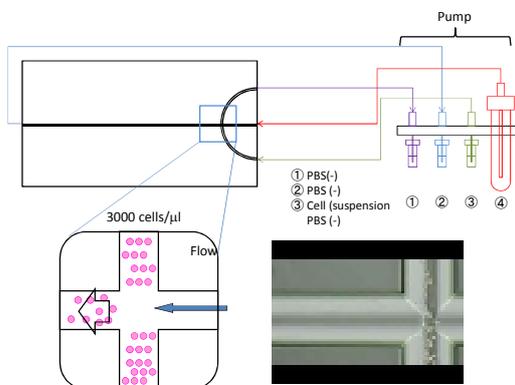


Figure 4. Design of microtip with cell injection port for cell rolling separation.

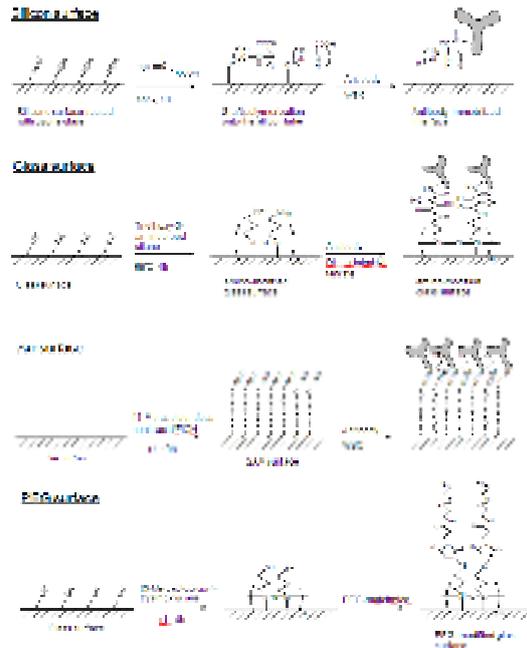


Figure 3. Various strategies for monolayer-immobilization of antibody to luminal surface of cell rolling column

により基材界面へ導入できる為に、グラフトポリマー鎖長を精密にコントロールすることができる。Zwitterionic telomere brush を導入した界面を作製し、ラット脂肪組織由来の間葉系幹細胞 (MSC) の分離挙動を検討した結果、細胞溶出率は約 90%まで上昇し、また、細胞分画く特性も飛躍的に向上した。

5. 主な発表論文等

〔論文〕 (計 16 件)

- 1) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Efficient cell rolling for adipose derived stem cell purification on antibody-immobilized microfluidic chamber with amphiphilic phospholipid polymer coating, submitted [査読有]
- 2) Kakinoki, S., Yui, N., Yamaoka, T., Platelet responses to dynamic biomaterial surfaces with different poly(ethylene glycol) and polyrotaxane molecular architectures constructed on gold substrates, *Journal of Biomaterials Applications*, 0885328212462260, first published on October 9, 2012 [査読有]
- 3) Agudelo, C. A., Tachibana, Y., and Yamaoka, T., Synthesis, properties, and endothelial progenitor cells labeling stability of dextrans as polymeric MRI contrast agents, *Journal of Biomaterials Applications*, 0885328212462259, first published on October 9, 2012 [査読有]

- 4) Agudelo, C.A., Tachibana, Y., Huatado, A.F., Ose, T., Iida, H., and Yamaoka, T., The use of magnetic resonance cell tracking to monitor endothelial progenitor cells in a rat hindlimb ischemic model, *Biomaterials*, 33, 2439-2448, 2012 [査読有]
 - 5) Yamaoka T., Mahara A., Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells, *Reactive & Functional Polymers*, 71:362-366, 2011 [査読有]
 - 6) Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T., Three-dimensional culture and differentiation of stem cells in elastin-like polypeptide hydrogels, *ICBS2011*:313-314, 2011 [査読有]
 - 7) Agudelo, C.A., Tachibana, Y., Teramoto, N., Iida, T. H., Yamaoka. T., Long term in vivo MRI tracking of endothelial progenitor cells transplanted in rat ischemic limbs and their angiogenic potential, *Tissue Eng Part A*. 17(15/16), 2079-2089 (2011) [査読有]
 - 8) Kakinoki, S., Uchida, S., Ehashi, T., Murakami, A., Yamaoka, T., Surface modification of poly(L-lactic acid) nanofiber with oligo(D-lactic acid)-bioactive-peptide conjugates for peripheral nerve regeneration, *Polymers*, 3(2), 820-832 (2011) [査読有]
 - 9) Tachibana Y, Enmi J, Mahara A, Iida H, Yamaoka T., Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking., *Contrast Media Mol Imaging*, 5: 309-317, 2010 [査読有]
 - 10) Kang JH, Tachibana Y, Kamata W, Mahara A, Harada-Shiba M, Yamaoka T., Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier., *Bioorg Med Chem*. 18:3946-50. 2010 [査読有]
 - 11) Mahara A, Yamaoka T., Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column., *Biomaterials*. 2010, 31:4231-7, 2010 [査読有]
 - 12) Miskon A, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T., A Suspension Induction for Myocardial Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Various Extracellular Matrix Proteins., *Tissue Eng Part C Methods*. 16, 979-87, 2010 [査読有]
 - 13) Mahara A, Yamaoka T., Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling., *Biotechnol Prog.*, 26:441-7, 2010 [査読有]
 - 14) S. Kakinoki and T. Yamaoka, Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence, *Acta Biomaterialia*, 6, 1925-1930 (2010) [査読有]
 - 15) Miskon A., Ehashi T., Mahara A., Uyama H. and Yamaoka T. "Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19.CL6 cells on different extracellular matrix components" *J Artif Organs*. 12(2) 111-7 (2009) [査読有]
 - 16) Kakinoki, S., Uchida, S., Ehashi, T., Murakami, A., and Yamaoka, T., Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates, *Peptide Science*, 2008, 449-450 (2009) [査読有]
- [雑誌論文] (計 11 件)
- 1) 馬原 淳, 山岡哲二, 「幹細胞」, 人工臓器は、いま、日本人工臓器学会編、はる書房、第 6 章、18 節、pp509-526、2012
 - 2) 馬原 淳, 山岡哲二, 「幹細胞分離カラム」, 先端バイオマテリアルハンドブック、(秋吉一成、石原一彦、山岡哲二監修、NTS 出版) 第 5 編、第 2 章、2 節、7、pp332-335, 2012
 - 3) 山岡哲二, 「ファイバー材料と再生医療」, ナノファイバー実用化技術と用途展開の最前線、シーエムシー出版、第 2 編 第 4 章、107-115 (2012)
 - 4) 山岡哲二, 柿木佐知朗, 「再生医療のための繊維材料修飾とその評価」. 繊維と工業, 68(11), 314-318(2012)
 - 5) 山下 敦, 山岡哲二, 「幹細胞分化誘導型バイオマテリアル」, 先端バイオマテリアルハンドブック、(秋吉一成、石原一彦、山岡哲二監修、NTS 出版)、第 5 編、第 2 章、1 節、10、pp296-299 (2012)
 - 6) Shigeru Kunugi and Tetsuji Yamaoka (Eds.), Springer, *Polymers in Nanomedicine*, ISBN 978-3-642-27855-6 (2012)
 - 7) 山岡哲二(監修), 「再生医療—幹細胞操作と工学技術からのアプローチ」、人工臓器、40巻 3号、211-239(2011)
 - 8) 山岡 哲二・馬原 淳 「生体高分子の界面化学—抗体固定化界面での細胞ローリングの再現と幹細胞分離への応用」、高分子、60巻、P743-744、(2011)
 - 9) 山岡 哲二, 「機能性バイオマテリアルの設計と評価」, 特集 医療を支える機能性高分子材料と成形加工, 成形加工, 23(5), 244-250 (2011)
 - 10) 馬原 淳, 「細胞分離技術の開発～白血球ローリング現象を模倣した細胞分離カラム」、バイオマテリアル<生体材料>, 28巻、第3号、p201-202、2010

11) 馬原 淳、山岡哲二、「幹細胞分離法とポピュレーション解析」, In 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)

[学会発表] (計 3 5 件)

1) Tetsuji YAMAOKA, Stem cell manipulation on the active bio-interfaces, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012) 「国際学会、口頭発表」

2) Carlos Alberto Agudelo, Atsushi Mahara, Hiromi Kitano, Tetsuji Yamaoka, Stem Cell Separation System Based on the Cell Rolling on an Antibody Immobilized Zwitterionic Telomere Brush Surface, 9th World Biomaterials Congress China (2012) 「国内学会、口頭発表」

3) Carlos Agudelo, Atsushi Mahara, Hiromi Kitano, and Tetsuji Yamaoka, Antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation, SIMS(Softinterface Mini-symposium on Biomaterials Science) (2012) 「国内学会、口頭発表」

4) Hao CHEN, Atsushi MAHARA, Carlos AGUDELO, Hiromi KITANO, Tetsuji YAMAOKA, Development of cell rolling column modified with betain polymers, 第 6 2 回高分子討論会 (名古屋) (2012) 「国内学会、口頭発表」

5) 馬原淳、再生医療の実用化を目指した循環器疾患に対する新たな医療デバイスの開発、北陸先端科学技術大学院大学 藤本研究室セミナー (石川) (2012) 「国内講演、口頭発表」

6) 馬原淳、ソフト界面の構築に基づく新たな医療デバイスの開発～細胞分離カラムと小口径人工血管の開発、ソフトインターフェースの分子科学 武田研・吉本研 Joint Seminar 2012 (東京) (2012) 「国内講演、口頭発表」

7) 馬原 淳、山岡哲二, Novel cell rolling colum for stem cell separation, 1st International cengress on Advanced Materilas 2011 (中国済南) (2011) [国際学会 口頭発表]

8) 馬原 淳、カルロス アグデロ、北野 博巳、山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面を用いた細胞分離カラムの応用, 第 60 回高分子討論会 (岡山) (2011) [国内学会 口頭発表]

9) 馬原 淳、アグデロ カルロス、北野 博巳、山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面をもつ細胞分離カラムの開発, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (京都) (2011), [国内学会、口頭発表]

10) A. Mahara , C. Agudelo, H. Kitano and T. Yamaoka, Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column, 15th International Conference on Thin Films, 2011 (京都)

(2011) [国際学会、口頭発表]

11) 馬原 淳、山岡 哲二, 細胞分離技術の現状と新展開, 第 2 8 回医用高分子研究会 (東京) (2011) [国内学会、口頭発表]

12) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano, and T. Yamaoka , Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the cell-rolling column, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム(横浜) (2011)[国内学会、口頭発表]

13) C. Agudero, A. Mahara, H. Kitano, and T. Yamaoka, Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system, Termis-NA 2011 (米国) (2011) [国際学会、口頭発表]

14) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano, and T. Yamaoka, Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column, 15th International Conterence on Thin Films, Kyoto (2011) [国際学会、口頭発表]

15) A. Mahara, T. Yamaoka, Novel cell rolling column for stem cell separation, 1st International Congress on Advanced Materials Jinan, China (2011) [国際学会、口頭発表]

16) T. Yamaoka, Biomaterials for Cell Transplantation Therapy: Purification and In Vivo Tracking of Stem Cells, International Conference on Biomaterials Science In Tsukuba (2011) [国際学会、口頭発表]

17) 馬原 淳、カルロス アグデロ、鈴木 久智、北野 博巳、山岡 哲二: 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、東京大学先端科学技術研究センター4 号館 2 階、(2010)、[国学会 口頭発表]

18) 馬原 淳、カルロス アグデロ、鈴木 久智、北野 博巳、山岡 哲二: 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、グランドプリンスホテル広島、(2010)、[国学会 口頭発表]

19) 馬原 淳・カルロス アグデロ・北野 博巳・山岡 哲二: 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、北海道大学、(2010)、[国際学会 口頭発表]

20) T. Yamaoka: Antibody-immobilized cell rolling column for quick stem cell separation, PACIFICHEM 2010 (2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Hawaii Convention Center, (2010), [国際学会 口頭発表]

21) 馬原 淳・カルロス アグデロ・北野 博巳・山岡 哲二: Design of

- antibody-immobilized surface for cell separation system, 第20回日本MRS学術シンポジウム、横浜開港記念館、(2010)、[国際学会 口頭発表]
- 22) 山下 敦、アジジ ミスコン、江橋 具、馬原 淳、姜 貞勲、山岡 哲二：幹細胞の心筋分化誘導における細胞培養基質組成と物性の影響、第9回日本再生医療学会総会、広島国際会議場、(2010) . [国内学会 口頭発表]
- 23) 馬原 淳・岡田 華奈・森反 俊幸・山岡 哲二、“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 (2010) . [国内学会 口頭発表]
- 24) 馬原 淳、岡田 華奈、森反 俊幸、山岡 哲二：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、東京大学先端科学技術研究センター4号館2階、(2009) . [国内学会 口頭発表]
- 25) 馬原 淳、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、熊本大学 工学部 黒髪キャンパス、(2009) . [国内学会、口頭発表]
- 26) 馬原 淳、岡田 華奈、市川 翔子、森反 俊幸、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、千葉大学 自然科学系総合研究棟1、(2009) . [国内学会 口頭発表]
- 27) 馬原 淳、アジジ ミスコン、山下 敦、山岡 哲二：細胞外マトリックスにおける間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導制御、第7回生活支援工学系学会連合大会 (第25回ライフサポート学会大会 第9回日本生活支援工学学会大会)、高知工科大学、(2009) . [国会学会 口頭発表]
- 28) A. Miskon, H. Uyama, T. Yamaoka, Effect of Extracellular Matrix Components on Beating Behavior of Cardiomyocytes and Differentiation Behavior of Stem Cells in vitro, 2nd Asia Biomaterial Congress in Singapore (2009) [国際学会 口頭発表]
- 29) T. Yamaoka, A. Miskon, H. Uyama, Myocardial Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Various ECM Proteins, Termis 2nd World Congress in Seoul (2009) [国際学会 口頭発表]
- 30) 馬原 淳、岡田 華奈、森反 俊幸、山岡 哲二、“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
- 31) 馬原 淳、岡田 華奈、森反 俊幸、山岡 哲二、“リガンド固定化流路による幹細胞サブpopulationの分離”、バイオマテリアル学会シンポジウム 2008
- 32) 馬原 淳・岡田 華奈・森反 俊幸・山岡 哲二、“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
- 33) Atsushi Mahara and Tetsuji Yamaoka, “Direct separation of stem cell subpopulations on a novel ligand-immobilized column”, The TERMIS-NA 2008 Annual Conference & Exposition (2008)
- 34) 馬原 淳・岡田華奈・森反俊幸・山岡哲二、“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、(2008)
- 35) T. Yamaoka, Novel biomaterials for cell transplantation, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2008 in Taipei (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 哲二 (YAMAOKA TETSUJI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

(2) 研究分担者

馬原 淳 (MAHARA ATSUSHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80416221