

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12879

研究課題名(和文) 増殖因子固定化基材上でのiPS細胞のメカノトランスダクション解析と分化制御

研究課題名(英文) Controlling cell fates of iPS cells on growth factor-immobilized hydrogel by mechanical strain

研究代表者

梶原 稔尚 (Kajiwara, Toshihisa)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10194747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では増殖因子と機械的刺激の2つのシグナルによって幹細胞の運命制御を行うべく、ハイドロゲルへの増殖因子固定化能付与と力学的特性の制御に取り組んだ。ハイドロゲルとしてコラーゲンゲルを用い、増殖因子固定化能付与のためにヘパリンの導入に関する検討を、また力学的特性の制御のために分子間架橋に関する取り組んだ。以上の結果、高い増殖因子固定化能の付与と、ある程度の力学的特性の制御法を確立した。今後、ゲル濃度や架橋方法等の最適化を行うことにより、本手法の幹細胞の運命制御への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research attempted to combine the advantages of the control of growth factors and the adjustable mechanical properties of the scaffold, to provide variety choice for scaffold design. We focus on the heparin as a growth factor-immobilization agent, and we prepared heparin-conjugated collagen gel. We also built crosslink between the collagen fibers to change the mechanical properties. By using heparin-conjugated collagen gel and immobilizing some growth factors, the survival and functions of cultured cells were up-regulated. On the other hand, the research on the change of the mechanical properties, which could cause by the cross-linking level of the substrate itself, showed the influence on the state of the cells. In the future, this study would contribute to the investigation of the mechanisms underlying cell-fate decisions.

研究分野：化学工学・高分子化学

キーワード：幹細胞 分化 ハイドロゲル 増殖因子 メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

(1) 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同様に、半無限の増殖能と、体を構成するほとんどの臓器細胞への分化能を有する細胞である。iPS 細胞は、ES 細胞が持つ本質的問題である倫理的問題を回避でき、再生医療や創薬開発における細胞ソースとして大いに注目されている。一方、iPS 細胞を様々な分野で利用するためには、iPS 細胞から目的の細胞へと分化誘導させることと、その目的細胞をニーズが要求する十分なスケールで提供できることが必須であり、これらを達成するために、iPS 細胞の自己複製および分化誘導機構の解明が進められている。

(2) iPS 細胞の機能発現 (自己複製・分化誘導) の機構解析において、これまで主として生化学的要因である種々の液性因子 (分化誘導因子) の影響について研究が行われてきた。一方、組織を構成する細胞が生化学的要因だけでなく、自身に加わる力や変形といった力学環境の変化に応じて、増殖性・運動性・特異的機能の発現や分化傾向が調節されることが明らかになりつつある。このように、細胞が力学環境の変化を感知し、生化学的信号へと変換するメカニズム (メカノトランスダクション) を理解することは、発生や分化等の様々な生命現象の解明に不可欠な要素となりつつある。iPS 細胞の利用においても、その作製・自己複製・分化誘導の機構を理解する上では、従来の液性因子によるシグナルと同時にメカノトランスダクションの理解は重要である¹⁾。

(3) 研究代表者らは、力学的特性を制御可能で、かつ種々の増殖因子を固定化可能な培養基材を開発することにより、生理活性物質由来の液性因子によるシグナルと共にメカノトランスダクションの影響を解析する有効な手段になり得るのではと発想し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らは、力学的特性を調節可能で、かつ増殖因子を固定化できる培養基材の開発において、ハイドロゲルに着目した。本研究ではそのようなハイドロゲルの調製法を確立することを目的とした。また、そのハイドロゲルを細胞培養用基材として用いることにより、調製したハイドロゲルの有効性を評価することとした。

(2) ハイドロゲルとして、コラーゲンゲルに着目した。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要要素であり、多くの細胞と親和性が高い。コラーゲンゲルへの増殖因子固定化能付与としては、ヘパリンの導入に着目した。ヘパリンは直鎖の多糖であり、強く負に帯電

する性質を有する。その性質から、増殖因子と相互作用することが知られている。従ってコラーゲンに対し化学架橋によってヘパリンを導入することによって増殖因子固定化能の付与が可能である。一方、力学的特性の制御については、コラーゲンの分子間架橋を制御することによりその制御が可能であると考えられる。

(3) よって本研究ではヘパリンを導入したコラーゲンゲルを調製し、その増殖因子固定化能を評価した。一方、コラーゲンゲルの分子間架橋度を調節することによりその力学的特性の制御について検討を行った。さらに調製したこれらのコラーゲンゲルを用いた種々の細胞培養評価により、調製したコラーゲンゲルの有効性を評価することとした。

3. 研究の方法

(1) 増殖因子固定化能を有するハイドロゲルの調製として、増殖因子固定化能を有するヘパリンを導入したヘパリン導入コラーゲンゲルの調製を行った。ヘパリンは EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド) / NHS (N-ヒドロキシコハク酸イミド) を架橋剤として用いることによりコラーゲンへ導入した。調製したヘパリン導入コラーゲンゲルの増殖因子固定化能を評価するために、ヘパリン導入コラーゲンゲルおよびコラーゲンゲルを調製後、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 溶液を添加することにより、ゲルに bFGF を固定化した。その後、ゲルからの bFGF の徐放量を経時的に測定することにより、ゲルに固定化された bFGF 量並びにゲルからの bFGF 徐放量を評価した。

(2) コラーゲンゲルの力学的特性を変化させるために、種々の濃度で調製した架橋剤 (EDC/NHS 溶液) をコラーゲンゲルに添加した。架橋反応を行ったコラーゲンゲルは各種測定器を用いて力学的特性を解析した。

(3) 作製した各種コラーゲンゲルの評価として、培養細胞を用いた評価を行った。ヒト iPS 細胞を用いた評価として、作製したコラーゲンゲル上に iPS 細胞の未分化培養および分化培養を行い、形態および遺伝子発現解析を行った。一方、組織工学的アプローチにおける有用性評価として、研究代表者らが独自に開発した肝細胞スフェロイドを用いたボトムアップ法による血管化肝組織誘導法²⁾を用いて、組織形成過程における有効性を評価した。

4. 研究成果

(1) ゲルに添加した bFGF 量に対する固定化率を評価したところ、コラーゲンゲルでは、約 20% だったのに対し、ヘパリン導入コラーゲンゲルでは、約 70% という高い増殖因子固定化能が示された。次に、ゲルに固定化され

た bFGF の徐放動態を評価した。ゲルに固定化された bFGF 量に対する 10 日間の累積徐放率を Fig. 1 に示す。10 日間における累積徐放率は、コラーゲンゲルにおいて 65% だったのに対し、ヘパリン導入コラーゲンゲルでは 31% だった。このことから、コラーゲンゲルと比較してヘパリン導入コラーゲンゲルは、増殖因子を長期間保持することができ、徐々に放出することが示された。これらの結果は、ヘパリンと bFGF 間の相互作用に起因するものだと考えられる。以上の結果から、増殖因子固定化基材としてのヘパリン導入コラーゲンゲルの有用性が示された。

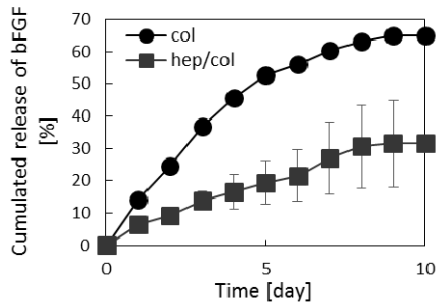


Fig. 1 コラーゲンゲルおよびヘパリン導入コラーゲンゲルにおける bFGF 累積徐放率

(2) ヘパリン導入コラーゲンゲル上でヒト iPS 細胞の未分化維持培養を行った結果、細胞形態、未分化関連遺伝子 (OCT-3/4, NANOG) の発現とも一般的な培養法と同様の傾向を示した。この結果、少なくとも培養期間中の未分化状態は維持されていることが示唆された。また、ヘパリン導入コラーゲンゲルをボトムアップ法による血管化肝組織構築に応用した結果、ヘパリンを導入しないコラーゲンゲルを用いた場合と比較して高いアルブミン分泌速度が示された。この結果、肝特異的機能の向上に作用することが示された。

(3) 架橋剤濃度を变化させて架橋反応を行ったコラーゲンゲルに対し、引張試験機を用いて弾性率の測定を行った。この結果、架橋剤濃度の増加に伴い、弾性率が増加することが示された。一方、高い架橋剤濃度 (10mg/ml-EDC 以上) の条件では、弾性率は低下した。これは溶液の pH の低下によりゲル化が不良であったことが考えられる。以上の結果、架橋密度によって力学的特性の制御が可能であることが示唆された。

(4) 架橋剤濃度を变化させて架橋反応を行ったコラーゲンゲルを用いてヒト iPS 細胞の培養を行った。未分化維持条件下で培養を行った結果、それぞれの条件下において iPS 細胞の形態や未分化関連遺伝子 (OCT-3/4, NANOG) の発現には明確な変化は示されなかった。一方、自発的分化誘導条件下で培養を

行った結果、細胞形態には明確な変化は示されなかったが、架橋を行ったコラーゲンゲル上ではわずかに伸展する傾向が示された (Fig. 2)。

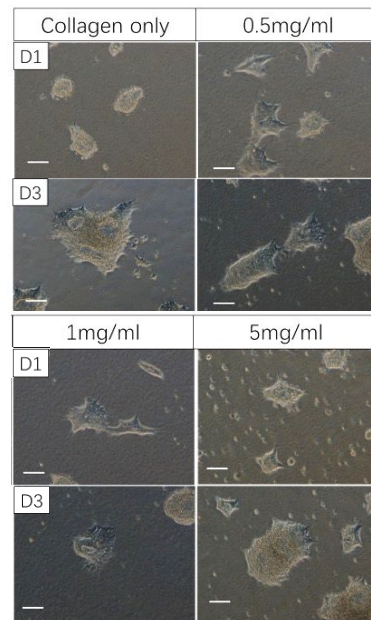


Fig. 2 架橋剤濃度を变化させて作製した種々のコラーゲンゲル上で培養した iPS 細胞形態 (培養 1、3 日目)

次に、自発的分化誘導過程における三胚葉の代表的な遺伝子について発現解析を行った結果、多くの遺伝子において架橋を行わないコラーゲンゲル上での発現が高いことが示された (Fig. 3)。この結果、iPS 細胞はコラーゲンゲルの力学的特性の変化を認識し、その表現型を変化させていることが示唆された。

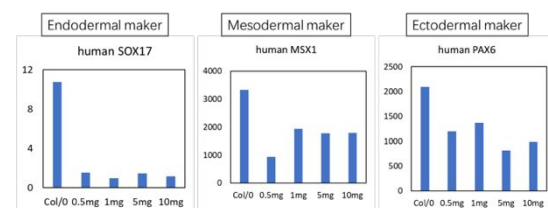


Fig. 3 種々のコラーゲンゲル上で培養した iPS 細胞の遺伝子発現解析

(4) 本研究の遂行により、増殖因子固定化能と力学的特性の制御が可能なヘパリン導入コラーゲンゲルの調製が可能であった。増殖因子固定化能については、iPS 細胞の未分化関連遺伝子の発現や血管化肝組織の生存率、機能発現に効果的であったことから、細胞に有効な増殖因子の固定化が可能であったと思われる。一方、架橋密度の変化による力学的特性の制御については、種々の力学的特性の測定を行った結果、それらの変化幅は非常に小さいことが示された。これは、ゲル作製に用いたコラーゲンの濃度や架橋反応

時間が影響したと考えられる。しかし、iPS細胞の分化培養においては、架橋反応の有無に対する応答が示された。これは定性的には柔らかな表面においてiPS細胞の分化が促進されるという従来の報告³⁾と一致している。今後、より有効な力学的特性の制御方法を検討することにより、本手法が細胞の運命決定因子の解明や培養組織構築の有効な手段となり得ることが期待される。

<引用文献>

- 1) Y. Shao et al., Integr Biol (Camb) 5, 450-457, 2013
- 2) M. Inamori et al., Tissue Eng Part A 15, 2029-2037, 2009
- 3) A. Keung et al., Integr Biol (Camb) 4, 1049-1058, 2012

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 1 件)

Tatsuya Okudaira, Ryohei Yabuta, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara, Fabrication of a fiber-type hepatic tissue by bottom-up method using multilayer spheroids, Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, 6, 739-747, 2017, 査読有, 10.1016/j.jbiosc.2017.01.002

[学会発表](計 9 件)

江本雄一、水本博、白木川奈菜、井嶋博之、梶原稔尚、幹細胞の高密度培養プロセスのための増殖因子徐放粒子の開発, 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会, 2017.12.

藪田涼平、奥平達也、水本博、梶原稔尚、ボトムアップ法による肝-内皮-間葉系細胞からなる培養組織の構築と性能評価, 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会, 2017.12.

水本博、中空系型培養器による多能性幹細胞の大量培養, 第37回動物細胞工学会シンポジウム, 2017.09.

Hiroshi Mizumoto, Tatsuya Okudaira, Ryohei Yabuta, Toshihisa Kajiwara, Functional and structural analysis of a fiber-type hepatic tissue fabricated by a bottom-up method using multilayer spheroids, TERMIS AP 2017, 2017.09.

水本博、奥平達也、藪田涼平、梶原稔尚、多層化スフェロイドの自己組織化による血管化肝組織構築の試み, 化学工学会第82年会, 2017.03.

Yuki Naruo, Tatsuya Okudaira, Nana Shirakigawa, Hiroyuki Ijima, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara, Effect of

heparin-conjugated collagen gel on formation of a vascularized hepatic tissue, The 29th International Symposium on Chemical Engineering, 2016.12.

江本雄一、成尾勇希、白木川奈菜、井嶋博之、水本博、梶原稔尚、ヒトiPS細胞の中空系内三次元培養におけるbFGF固定化ゼラチン粒子の添加効果, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016, 2016.11.

成尾勇希、奥平達也、白木川奈菜、井嶋博之、水本博、梶原稔尚、血管化肝組織形成誘導におけるヘパリン導入コーラゲンゲルの添加効果, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016, 2016.11.

江本雄一、成尾勇希、永井貴之、白木川奈菜、井嶋博之、水本博、梶原稔尚、ヒトiPS細胞の中空系内三次元培養における増殖因子固定化ゼラチン粒子の添加効果, 第53回化学関連支部合同九州大会, 2016.07.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001271/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 稔尚 (KAJIWARA Toshihisa)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 10194747

(2) 研究分担者

水本 博 (MIZUMOTO Hiroshi)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 90346817