

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K14865

研究課題名(和文) 骨格筋前駆細胞分化に高度に特化した細胞外マトリックスの開発

研究課題名(英文) Development of artificial extracellular matrix for differentiation from pluripotent stem cells to skeletal muscle progenitor cells

研究代表者

眞下 泰正 (MASHIMO, Yasumasa)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：20707400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞より高効率に骨格筋前駆細胞を作製するために、細胞足場とシグナル制御の2つの観点から分化制御材料開発を進めた。足場材料は、エラスチン由来の骨格にRGD配列とラミニン由来ペプチド配列を含むシンプルな設計でありながら、多能性幹細胞から骨格筋前駆細胞に至るまで強い接着力を有していた。様々な機能を付与することが可能であり、今後は分化指向性を有したマテリアルへの発展が見込まれる。シグナル制御材料では、細胞外より転写ネットワークを制御する転写因子組換えタンパク質の開発を進めた。細胞内への導入・活性の確認は終え、今後は分化制御に十分な機能を発揮させるための機能改善を行う必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の組織工学では、細胞足場材料への理解は浅く、『接着』が足場材料の主要な機能でありそれ以外の機能、例えば細胞内シグナルなど、は液性因子(栄養、成長因子、低分子化合物など)により制御することが一般的である。しかし、一部の細胞では足場材料により細胞外からもたらされるシグナルが分化に必須と報告されており、骨格筋前駆細胞においてもこのような足場材料を開発することができれば液性因子と組合せた精密な分化制御が期待できる。本研究ではそのための基盤となる最低限の機能を有した足場を開発した。この足場材料を多機能化することにより骨格筋前駆細胞培養に特化した足場環境が実現できると信じている。

研究成果の概要(英文)：In order to produce skeletal muscle progenitor cells with higher efficiency from pluripotent stem cells, we developed differentiation control biomaterials from the two perspectives of cell scaffolding and intracellular signal control. The scaffold material had a simple design containing an RGD sequence and a laminin-derived peptide sequence in the elastin-derived skeleton, but had strong adhesive force from pluripotent stem cells to skeletal muscle progenitor cells. It is possible to add various functions, and it is expected that it will develop into a material with differentiation orientation in the future. As a signal control material, we proceeded with the development of a transcription factor recombinant protein that controls the transcription network from outside the cell. After confirming the intracellular introduction and activity, it is necessary to improve the function in order to exert a sufficient function for differentiation control in the future.

研究分野：組織工学

キーワード：骨格筋前駆細胞 足場材料 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋細胞は基本的には優れた自己再生能力を有しているが、能力の限界を超える激しい筋損傷時は組織再生することはできない。危篤な損傷時の治療法は現在存在しないが、研究段階では骨格筋前駆細胞移植が有力な選択肢として期待されている。分化成熟した骨格筋細胞は移植先の細胞と細胞融合せず微々たる再生能力しか示さないが、骨格筋前駆細胞は定着に伴い移植先の筋組織の一部として増殖・融合を繰り返し組織再生に大きく貢献することができる。しかしながら、骨格筋前駆細胞は生体外において培養することが難しく、例えば、生体内の骨格筋前駆細胞を採取し生体外培養すると培養数日後には特有の機能を失い細胞死または分化・成熟してしまう。

この問題への解決策のひとつとして、幹細胞から分化させる方法がある。骨格筋前駆細胞をその性質を維持したまま培養してクローンを増やすのではなく、幹細胞より分化を進め骨格筋前駆細胞の性質を獲得した時点で移植治療に用いれば問題ない。幸い多能性幹細胞の研究が進んだ現在、骨格筋前駆細胞より上流の幹細胞ソースである多能性幹細胞の供給には困らない。また、骨格筋前駆細胞への分化経路については、効率は低い(5%未満)もの方法論は既にいくつかの研究グループにより明らかにされている。そこで本研究では多能性幹細胞(ES細胞・iPS細胞)から骨格筋前駆細胞を高効率に作製するために必要なバイオマテリアル開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

以下2点を本研究の目的とした。

- ① 多能性幹細胞より骨格筋前駆細胞を高効率に生産するための足場材料開発。
- ② 生体内の細胞外マトリックス機能の模倣による細胞足場の高機能化。

3. 研究の方法

- ① 多能性幹細胞より骨格筋前駆細胞を高効率に生産するための足場材料開発。

細胞外マトリックスは基本機能である細胞接着能に加えて、細胞接着を介した細胞へのシグナル伝達、成長因子の固定化、細胞間の空間を埋める充填・緩衝材としての機能を持つ。ここでは、骨格筋前駆細胞分化に適した接着能とインテグリンを介したシグナル伝達能、成長因子固定化能を検討した後、細胞足場材料の3次元化により充填・緩衝材としての機能付加を試みる。

申請者の研究室ではこれまでエラスチン由来の骨格配列であるエラスチン様ペプチドAPGVGVの繰り返し配列を基本骨格に用いてこれにRGD配列などの接着因子を組み合わせた人工足場タンパク質を開発してきた。ここでは基本分子設計はそのままに接着因子を骨格筋前駆細胞分化に最適化(IKVAV、RGD)した新たな足場タンパク質の作製を行った。

② 生体内の細胞外マトリックス機能の模倣による細胞足場の高機能化。

細胞間シグナル伝達因子（例：成長因子）の固定化能を足場に与えるため、 α ヘリックス間相互作用を利用したシグナル因子の固定化、静電的相互作用を利用したシグナル因子の固定化、の2種類の方法について検討を行った。

ここまで作り上げた足場タンパク質に、ハイドロゲル化する機能性配列を組み込んだ3次元足場タンパク質の作製と細胞培養環境としての機能評価を行った。

4. 研究成果

① 多能性幹細胞より骨格筋前駆細胞を高効率に生産するための足場材料開発

A. 細胞接着因子の検討

APGVGVの42回繰り返し配列（APGVGV42）に組み込まれた骨シアロタンパク質由来のRGDモチーフを含む接着配列EPRGDNYR（BSP）は、コントロールとして用いたゼラチンと同等のマウスiPS細胞への接着能を示し、その接着活性は骨格筋前駆細胞への分化まで継続した。この結果より、BSPを組み込んだ骨格タンパク質（APGVGV42-BSP）を細胞接着因子候補の基本分子と決めた。

B. シグナル配列の検討

接着を介した骨格筋前駆細胞分化制御を行うため、骨格筋前駆細胞の接着が報告されている接着ペプチドについて組替え足場タンパク質の構築と機能評価を行なった。APGVGV42-IKVAVはマウスiPS細胞に接着能を示したことに加え、免疫染色とRT-PCRの結果より骨格筋前駆細胞分化の促進能が認められた。

② 生体内の細胞外マトリックス機能の模倣による細胞足場の高機能化

C. ヘリックス間相互作用を利用した成長因子固定化系の構築

ヘリックス間相互作用を利用した足場タンパク質と成長因子（FGF、EGF）との連結を行う仕組みを構築した。APGVGV42の末端に強力なCoiled-Coil構造（解離定数 ~ 20 nM）を形成ヘリックスペアの片方のヘリックスペプチド分子を遺伝子工学的手法により融合した組替えタンパク質と、もう一方のヘリックスペプチドを融合した成長因子を作製した。結合はマイクロモル濃度オーダーでピークを迎え、成長因子の活性は固定化後も保持されており、固定化した成長因子は単純に培養液に添加した遊離の分子と同等の細胞増殖活性を示した。

D. 静電的相互作用を利用した成長因子固定化系の構築

多くの成長因子は正に帯電した部分構造を有していることから、負に帯電した足場を構築するために、ポリアスパラギン酸配列を遺伝子工学的に付加した足場タンパク質を作製した。塩基性 FGF を添加したところポリアスパラギン酸ドメインへの強力な固定化が観測された。

E．静電的相互作用を利用した bHLH 型転写因子固定化

bHLH 型転写因子は細胞内導入能を有しており、さらに一部の bHLH 型転写因子は細胞間のシグナル伝達に働くことも明らかになっていることから、bHLH 型転写因子を固定化した足場の構築が可能かどうかここでは評価した。bHLH モチーフは正に帯電していることから、上記同様にポリアスパラギン酸への固定化が確認できた。また、転写因子を固定化した足場上で細胞培養を行なったところ、一部の転写因子が足場から離れ細胞内に取り込まれ転写制御を行うことが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大森 夢子
2. 発表標題 筋特異的転写因子タンパク質を固定化したコラーゲンナノファイバーの構築
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------