

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17149

研究課題名（和文）幹細胞の多能性維持、大量培養に向けた新規培養法の検討

研究課題名（英文）Effect of nobel culture method for stem cell expansion

研究代表者

原口 拓也（Haraguchi, Takuya）

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：20778865

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）：幹細胞を培養する上で継代を繰り返すと多能性が減弱することは大きな問題となっている。本研究計画では幹細胞の多能性維持と大量培養に着目して研究を行った。上皮系の細胞を用い、新規培養法と既存の培養法で細胞増殖率、多能性の維持について比較を行った。これまでに、細胞の単離、および培養条件を確立することに成功した。チタン表面を水熱処理することで細胞培養において影響が起こることが知られており、その効果が細胞に与える影響について確認を行った。その結果、特定の水熱処理を行ったチタン上で特定の培養条件を用いた際に、細胞接着効果に有利な影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞培養を行う上で、良質な細胞を多量に得ることは必ずしも容易なことではない。培養条件によっては継代を繰り返す中で細胞の形質が変化してしまうこともまれではない。そこで、本研究計画では細胞培養条件に着目した。細胞培養条件として、今回用いたのはチタン表面に対する水熱処理である。水熱処理とは高温高圧（とはいえ200程度で起こる反応であり、金属の融解温度と比べると大幅に低温である）の水の存在下で起こる現象で、金属表面の性質が変化することが知られている。今回我々はチタン合金に水熱処理を行い、その上で細胞培養を行った。その結果、細胞の接着に有利な条件があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：When we culture stem cells, loss of the stemness is one of the huge issues. And also, it is not easy to obtain a large number of the cells. In our study, we tried to see the effect of the culture condition. We have established the cell culture conditions. It is known that hydro-thermal treatment of the titanium can change the surface characteristics of the titanium. We focused on this treatment. We have reported that hydro-thermal treatment of the titanium may have positive effect on cell adhesion to the surface.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：細胞培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を培養する上で、継代を繰り返すと多能性が減弱することは大きな問題となっている。また、良質の細胞を多量に得ることは必ずしも容易なことではない。培養条件によっては継代を繰り返す中で細胞の形質が変化してしまうこともまれではないためである。良質な細胞を大量に培養することが可能となればメリットは大きいと考えられる。

幹細胞には上皮系の幹細胞、間葉系の幹細胞が挙げられる。一般に広く研究が行われ報告が多いのは間葉系の幹細胞である。骨髄や脂肪組織、歯肉や結合組織など体内の多くの部位から容易に採取でき、増殖能も高いためである。一方で上皮系の幹細胞に関しては間葉系に比較して報告が少ない。採取部位が限られることや、培養条件が特殊であり樹立が容易でないこともその一因であると考えられる。

幹細胞を再生医療に用いると考えた際に、組織の再生というのは大きな目標の一つである。生体外で幹細胞を用いて人工的に臓器を再生しようとする際に、生体内の発生段階に起こっている現象を参考にすることは有効であろう。その観点から考えると、発生段階では上皮系の細胞が間葉系の細胞に陥入し、臓器の成熟が進むということが知られており、上皮系の細胞に関しても十分な解析がなされるべきであると考えられる。

チタン表面を水熱処理することで細胞培養において影響が起こることが知られており、我々はこれまでもその効果を報告してきた。水熱処理とは高温高圧の水の存在下で起こる反応であり、金属表面の特性を変化させることが知られている。また、水熱処理の特徴として200 程度の比較的低い温度で処理ができることや、コンパクトなサイズの処理容器に水と金属を入れて反応させることができるため、有効性が確認されれば比較的容易に応用が可能である点が挙げられる。今回はこれまでに研究を行ってきた純チタンのみではなく、チタン合金も解析に加えて行うこととした。

2. 研究の目的

今回我々は上皮系の幹細胞の樹立、および培養条件の確立を行うこととした。

また、チタン合金に水熱処理を行い、水熱処理が金属に及ぼす影響の解析を行うこととした。その上で処理した金属表面上で細胞培養を行うことで水熱処理が細胞に与える影響について解析を行うこととした。

3. 研究の方法

歯小囊より細胞を採取し、選択培地法を用いて上皮系の幹細胞を樹立することとした。

純チタン、およびチタン合金に対して複数の条件で水熱処理を行い、水熱処理条件の確立と、水熱処理が金属表面に与える影響についてタンパク吸着能測定、ラマン分光分析、XPS, SEM、濡れ性を用いて解析を行った。

また、処理したチタン合金上で上皮細胞を培養し、増殖や接着に与える影響の解析を行った。

4. 研究成果

歯小囊より細胞を採取し、選択培地法にて培養した細胞を樹立することに成功した。樹立した細胞は上皮系のマーカー (E-Cadherin, CK14) と幹細胞マーカー (Oct4, Lgr5, CD44, CD29) を発現していることがわかった。

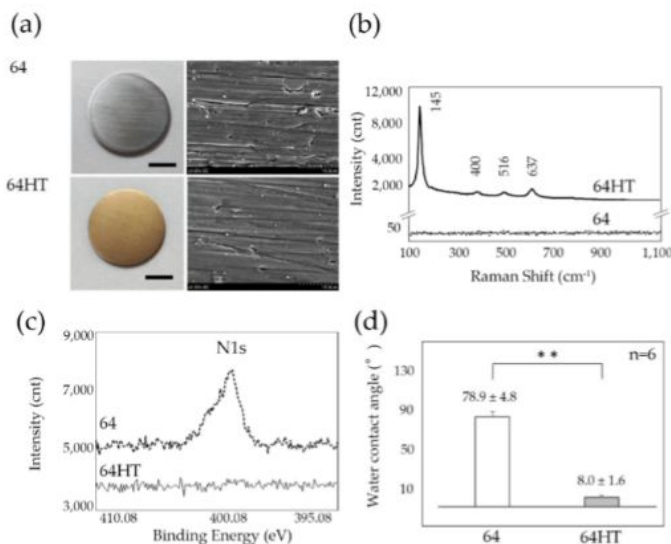


Figure 2. (a) Experimental plates for the control group (64) and the hydrothermal treatment group (64HT) (bar = 5 mm) (left). Scanning electron microscope images of titanium surfaces (bar = 10 μ m) (right). (b) Raman spectrum of 64 and 64HT. (c) Nitrogen peak fitting of the XPS narrow scan spectra of 64 and 64HT. (d) Water contact angle for the evaluation of 64 and 64HT surface wettability. 64: untreated Ti-6Al-4V; 64HT: hydrothermally treated Ti-6Al-4V in distilled water at 200 °C for 24 h. Data are shown as the mean \pm SD. Statistical analysis was by *t*-test (** *p* < 0.01).

純チタン、およびチタン合金に水熱処理を行って、水熱処理が金属に与える影響について解析した。SEM像では著明な変化を認めなかった(a)。

ラマン分光分析ではアナターゼ型チタンのピークを示した(b)。

XPSによるチタン表面の解析では、未処理のもの比べて窒素のピークが消失していた(c)。このことはタンパク由来のコンタミネーションが除去されていることを示唆している。

水の接触角測定による濡れ性の試験では水熱処理によって濡れ性が大幅に向上したことが明らかとなった。

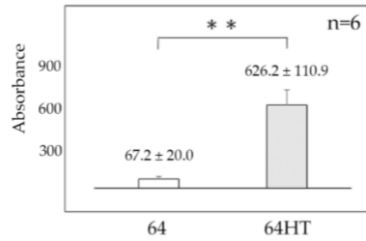
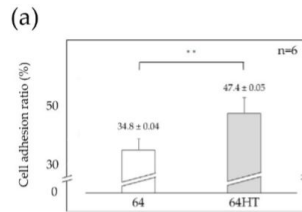


Figure 3. The adsorbed amount of laminin-332 on the surface of 64 and 64HT plates. Data are shown as the mean ± SD. Statistical analysis was by *t*-test (** $p < 0.01$).

次にラミニンを用いてタンパク吸着量の変化を確認した。水熱処理を行うことでタンパク吸着能が大幅に向上したことが確認された(左図参照)。



次にアドヒージョンアッセイを用いて細胞接着強度の測定を行った。その結果、水熱処理群では未処理群と比較してより強固に細胞が接着していることがわかった(左図a参照)。

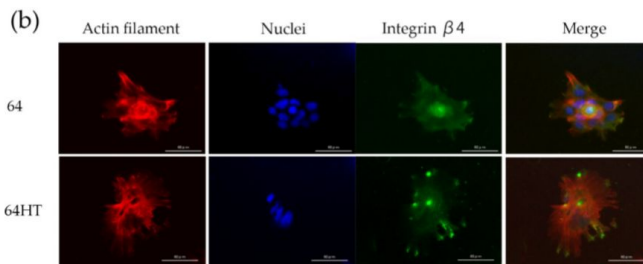


Figure 5. (a) Adhesion assay of GE1 cells. Data are shown as the mean ± SD. Statistical analysis was by *t*-test (** $p < 0.01$). (b) Immunofluorescence staining of GE1. Actin filaments (red), nuclei (blue), and integrin $\beta 4$ (green) are shown (bar = 60 μm).

蛍光免疫染色を行ったところ、水熱処理群では接着関連分子(Int β 4)の発現がより明瞭であった(左図b参照)。

これらの結果より本研究では

- 1) 上皮系幹細胞の樹立に成功した
- 2) チタン合金の水熱処理によって、濡れ性が高く、タンパクのコンタミネーションが除去され、アナターゼ型であるチタン合金が得られた。また、この処理を行ったチタン合金はよりタンパク吸着能が高いことがわかった。
- 3) 水熱処理をしたチタン合金上で上皮細胞を培養したところ、細胞接着関連タンパクの発現が向上し、未処理のチタン合金と比較してより細胞接着力が高いことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Yasushige, Ayukawa Yasunori, Furuhashi Akihiro, Kamo Michimasa, Ikeda Junji, Atsuta Ikiru, Haraguchi Takuya, Koyano Kiyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of Hydrothermal Treatment with Distilled Water on Titanium Alloy for Epithelial Cellular Attachment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2748 ~ 2748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3390/ma12172748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Tatsuya, Ayukawa Yasunori, Matsushita Yasuyuki, Sakai Nobuo, Matsuzaki Maki, Masuzaki Tomohiro, Haraguchi Takuya, Ogino Yoichiro, Koyano Kiyoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of post-osseointegration loading magnitude on the dynamics of peri-implant bone: a finite element analysis and in vivo study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 453 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本安繁, 鮎川保則, 古橋明大, 熱田生, 原口拓也, Rakhmatia Yunia Dwi, 成松生枝, 古谷野潔
2. 発表標題 軟組織細胞親和性向上を目指したチタン表面処理技術
3. 学会等名 日本歯科理工学会. 九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本安繁, 鮎川保則, 熱田生, 古橋明大, 原口拓也, Rakhmatia Yunia Dwi, 成松生枝, 古谷野 潔
2. 発表標題 上皮細胞接着性向上を目指したインプラント表面処理技術
3. 学会等名 令和元年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村朋子, 荻野洋一郎, 鮎川保則, 原口拓也, 古谷野潔.
2. 発表標題 チタンの表面形状とぬれ性から細胞接着を検証する
3. 学会等名 日本歯科理工学会. 九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 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
--	---------------------------	-----------------------	----