

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500406

研究課題名（和文） 人工ニッチによる幹細胞の未分化維持／分化誘導の同時制御

研究課題名（英文） Artificial niche: regulation of stem cell differentiation

研究代表者

立花 亮 (TACHIBANA AKIRA)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80305614

研究成果の概要：

chitin binding domain または cellulose binding domain と細胞成長因子 (FGF2, BMP2, VEGF165) との融合タンパク質を作製できた。これらはキチンまたはセルロースに結合するばかりか、結合すると遊離の場合より細胞に対する活性が高いことがわかった。これらを用いて FGF2 の結合している人工ニッチでは幹細胞の未分化を維持し、ニッチ外へ出た細胞の分化を誘導するという同時制御を実現できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

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：幹細胞、人工ニッチ、細胞増殖因子、fibroblast growth factor-2、vascular endothelial growth factor-165、bone morphogenetic protein-2、chitin binding domain、cellulose binding domain

1. 研究開始当初の背景

再生医療・再生医工学は近年注目を集めており、実用可能になればこれまで治療できなかった患者を助けることができ、患者のクオリティオブライフを上げることができるなど、さまざまな長所のある夢の医療と言われている。しかし、さまざまな解決しなければいけない問題が残されていることも事実であ

る。例えば、幹細胞を分化させることは *in vitro* で成功した例が徐々に増えつつある。しかし、幹細胞を生体内で任意の専門化した細胞に分化させることは非常に難しい。これは *in vitro* では増殖因子や分化誘導因子を細胞培養液に加えたり、除去したりすることで達成されるのに対し、生体内でそれらを加えたり、除去したりする難しさにある。

これらの問題を解決するため

- (1) バイオマテリアルそのものに、細胞成長因子を結合させておく。そのとき、細胞成長因子をバイオマテリアルに結合するタンパクドメインとの融合タンパク質としておき、バイオマテリアルに細胞成長因子を添加するだけで、特異的に結合するようにしておく。
- (2) バイオマテリアルに複数のゾーンを作製し、それぞれのゾーンに異なる細胞成長因子や細胞分化因子を結合させる。という方法をとる。これによって、未分化維持ゾーンとその周りに配置した分化ゾーンによって、幹細胞を連続的に供給しながら、分化ゾーンにおいて分化させる。未分化な幹細胞を隔離することができるという人工ニッチを実現できると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

キチンおよびセルロースに結合するドメインと細胞成長/分化因子との融合タンパクを作製し、それらをキチン/セルロースによってゾーン化したバイオマテリアルに結合させる。そこで幹細胞等を培養すると、未分化維持ゾーン（人工ニッチ；生体内で幹細胞が未分化のまま増殖する場所（ニッチ）があるといわれている。このゾーンはそのニッチを人工的に模倣したものといえる。）では未分化を維持したまま増殖し、分化誘導ゾーンでは細胞の分化が誘導される。このような相反する条件を、細胞成長因子や分化因子を後から加えるといったことなしに、同時に制御しようとするものである。

この研究によって、幹細胞を生体に移植した場合、幹細胞を維持すると同時に、必要な専門化した分化した細胞を常時供給することができる。

3. 研究の方法

以下のような手順で研究を遂行した。

- (1) 各種リコンビナントタンパク質発現プラスミドの構築のため、新しい ligation-independent 法を考案した。T4DNA polymerase の 3'→5' exonuclease 活性によって、15-17塩基の粘着末端を作製するが、それを連続した2段階で行い、作製することができた。
- (2) cellulose binding domain (celluloseBD) または chitin binding domain (chitinBD) と繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2; FGF2) の融合タンパク質は大腸菌によって glutathione-S-transferase (GST) タグをもつ状態で常法によって発現させ、精製をおこない、GST タグの切断をおこなった。
- (3) celluloseBD または chitinBD と骨形成因子 (bone morphogenetic protein-2; BMP2) を大腸菌によって発現させようとした。しかし、ほとんどが不活性なタンパク質であったので、昆虫細胞による発現に切り替え、上記1の方法によって、新たにプラスミドを作製し直した。これを昆虫細胞 Sf-9 にトランスフェクションし、発現させた。なお、これらタンパク質を安定的に発現する恒常発現株を取得した。BMP2 はホモ 2 量体であることが活性に必須であるということがわかっているので、この点について、SDS-PAGE およびウエスタンブロットによって、確かめた。
- (4) celluloseBD および chitinBD と血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor-165; VEGF165) との融合タンパク質も (3) と同様であったので、大腸菌での発現は断念し、昆虫細胞で発現を行った。なお、これらタンパク質を安定的に発現する恒常発現株を取得した。VEGF165 は BMP2 と同様に、ホモ 2 量体であることが活性に必須であると

ということがわかっているのです、この点について、SDS-PAGE およびウエスタンブロットによって、確かめた。

(5) キチンを N,N-dimethylacetamide/LiCl の溶液に溶かし、型に入れゲル化させた後、圧縮することによりキチンシートを作製した。ただ、試薬のキチンが不純物をかなり含んでいるため、シートに成形した後、水酸化ナトリウム水溶液で、不純物のタンパク質を加水分解し、シートの透明度を確保した。

(6) セルロースも同様にシートを作製した。

(7) キチン/セルロースシートなどのバイオマテリアルに特異的に celluloseBD および chitinBD と細胞成長因子の融合タンパクが結合することを特異的抗体を用いて、確認した。

(8) キチン/セルロースシート上で各種細胞を培養する。そのとき細胞成長因子の添加の有無によって、どのような違いがあるかを検討した。FGF2 を用いた場合、マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 およびヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC で細胞の伸展性、細胞増殖について検討した。BMP2 の場合、マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 の骨芽細胞への分化をアルカリ性ホスファターゼの発現により検討した。VEGF165 はヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC で細胞の伸展性、細胞増殖について検討した。

(9) キチンシートに間葉系幹細胞を播種し、chitinBD-FGF2 と BMP2 を添加した培地で培養する。一定期間後に、骨芽細胞への分化をアルカリ性ホスファターゼの活性染色で確かめた。このとき、FGF2 の存在する場所においてすなわちキチンシート上では幹細胞の未分化を維持しながら、キチンシート外では FGF2 の効果が及ばず、分化因子の BMP2 の影響により骨芽細胞への分化が観察されるはずである。このアッセイによって、人工ニッチが形成されているかどうかを検討し

た。

4. 研究成果

キチンおよびセルロースに結合するドメインと細胞成長/分化因子との融合タンパクを作製し、それらをキチン/セルロースによってゾーン化したバイオマテリアルに結合させる。そこで幹細胞等を培養すると、未分化維持ゾーン（人工ニッチ；生体内で幹細胞が未分化のまま増殖する場所（ニッチ）があるといわれている。このゾーンはそのニッチを人工的に模倣したものといえる。）では未分化を維持したまま増殖し、分化誘導ゾーンでは細胞の分化が誘導される。このような相反する条件を、細胞成長因子や分化因子を後から加えるといったことなしに、同時に制御しようとするものである。この目的に沿って、研究を展開し、chitinBD または celluloseBD と FGF2、BMP2、VEGF165 との融合蛋白質を大腸菌、昆虫細胞（後二者）をもちいてそれぞれ発現させた。これら融合蛋白質はキチンやセルロースに結合した。キチンやセルロースはシート、スポンジ状にしたもの、あるいは別のバイオマテリアル（例えばケラチンスポンジ）をキチン/セルロースでコートしたものなど、さまざまなものに結合した。さらに、これら融合細胞成長因子はバイオマテリアルに結合している方が遊離の状態に比べ、細胞増殖活性/分化誘導活性などに優れていることがわかった。chitinBD-FGF2 を結合させたキチンシート上では間葉系幹細胞は液層に分化因子である BMP2 を添加しても未分化のまま維持された。一方、そのシート上から増殖し、シート外へ出た細胞は BMP2 の影響によって分化した。なお、シート上の細胞と同様に、シート下の細胞もシートに結合した chitinBD-FGF2 の影響によって、未分化のまま維持されていることがわかった。

細胞の方向性を問わず有効であることがわかった。これらのことより、FGF2 を結合しているバイオマテリアル（人工ニッチ）上では幹細胞の未分化を維持しながら、その範囲外へ増殖した細胞は分化するという同時制御が可能となった。

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 4 件）

1. A. Tachibana, K. Tohiguchi, T. Ueno, Y. Setogawa, A. Harada, and T. Tanabe,
Preparation of long sticky ends for universal ligation-independent cloning: Sequential T4 DNA polymerase treatments. J. Biosci. Bioeng. 107: 668-669 (2009) （査読あり）
2. Tohiguchi, K., Setogawa, Y., Tachibana A., Tanabe, T., New ligation-independent cloning – Plasmid construction and expression of chitin/cellulose binding domain-VEGF fusion proteins-.
Proceedings(I) of the Joint Symposium on “Pioneering Development of Human Adaptive Materials” and “Micro and Trace X-ray Analysis” 2009: 139-141 (2009) （査読無）
3. T. Shiotani, K. Sawa, A. Tachibana, T. Tanabe,
Chitin binding domain-FGF2: local delivery to chitin biomaterials. Proc. 3rd Symp. Pioneering Devel. Human Adaptive Mater. 3:124-126 (2008) （査読無）
4. K. Sawa, A. Tachibana, T. Tanabe, Cellulose binding domain-FGF2 fusion protein for cell

cultivation on cellulose. Proc. 3rd Symp. Pioneering Devel. Human Adaptive Mater. 3: 127-129 (2008) （査読無）

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 澤 和紀, 山下 亮輔, 立花 亮, 田辺 利住
ケラチン多孔体への血管増殖因子の固定化とその効果 日本生物工学会 2008 年 8 月 29 日 東北学院大学
2. 塩谷知永、澤和紀、立花 亮、田辺利住.
キチン結合ドメイン融合 FGF2 のキチンバイオマテリアルへのローカルデリバリー 日本生物工学会 2007 年 9 月 25 日 広島大学東広島キャンパス
3. 澤和紀、立花 亮、田辺利住. セルロース結合 FGF2 融合タンパク質の作成と細胞培養への応用 日本生物工学会 2007 年 9 月 25 日 広島大学東広島キャンパス

6. 研究組織

(1)研究代表者

立花 亮 (TACHIBANA AKIRA)
大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80305614

(2)研究分担者

田辺 利住 (TANABE TOSHIKAZUMI)
大阪市立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20315972

(3)連携研究者

なし