

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12815

研究課題名（和文）低接着幹細胞における分化促進メカニズムとその普遍性の解明

研究課題名（英文）Mechanism and generality of promoting cellular differentiation associated with a reduction in cell attachment area

研究代表者

安永 菜由（Yasunaga, Mayu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：70712181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、足場材料の表面形状が細胞機能に影響を及ぼすことが明らかにされ、表面形状は新たな幹細胞の分化調節因子として注目されている。我々はジルコニア表面に施したナノ周期構造がラット骨髄由来間葉系幹細胞の接着面積を減少させ、骨分化を促進することを明らかにした。さらに当該現象はラット脂肪由来間葉系幹細胞でも見られ、骨髄由来間葉系幹細胞に限定して生じる現象ではないことを明らかにした。一方、当該現象は脂肪分化には影響しないことから、限定された分化方向にのみ生じる現象である可能性が考えられた。現在、網羅的遺伝子発現解析データを元に、そのメカニズム解明を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に細胞接着が弱い場合、細胞状態が悪い、足場材が不適といったマイナス評価を受ける。申請者の見出した低接着幹細胞程、骨分化能が高いという現象はこれまでの常識とは異なるものであるため、本研究の学術的意義は高い。低接着細胞における分化促進メカニズムが明らかになれば、細胞機能を向上させる培養方法や生体材料の開発に繋がると期待される。また再生医療分野において、初期細胞接着形態を指標にした幹細胞の品質評価方法としての応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recently, surface microstructures of the scaffolding have been regarded as a key regulating factor for cellular differentiation of stem cells because they affect the cellular event, including cell proliferation and differentiation. Zirconia substrates with periodic surface microstructures formed by irradiation with a femtosecond laser enhanced osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells, associated with a reduction in the cell attachment area. Zirconia substrates with the periodic surface microstructures enhanced not adipogenic differentiation but osteogenic differentiation of rat adipose-derived mesenchymal stem cells, associated with a reduction in the cell attachment area. Further studies are required to clarify the mechanism of promoting osteogenic differentiation associated with a reduction in the cell attachment area.

研究分野：生体材料

キーワード：表面形状 ジルコニア 間葉系幹細胞 骨分化 細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の足場となる材料表面の形状は細胞の接着、増殖、分化などの基本的細胞挙動に影響を与えることが明らかにされ始めた。これまでに我々は水酸アパタイト表面のナノ周期構造が骨髄由来間葉系幹細胞の接着形態に影響を与え、骨分化を促進することを明らかにした¹⁾。さらにジルコニアにおいても同様の現象が観察され、細胞播種 3 時間後の接着面積が小さい程、骨分化能が高いという逆相関の関係を見出した²⁾。これより当該現象は材料非依存的な現象である可能性が示唆されたが、幹細胞全般に当てはまる普遍的な現象であるかは不明であった。また足場材表面形状による低接着細胞での分化促進メカニズムについては未だ全く明らかにされていなかった。そこでラット骨髄由来間葉系幹細胞²⁾および脂肪由来間葉系幹細胞³⁾を用いて、上記の点について検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は申請者の見出した「初期細胞接着面積が小さい程、分化能が高い」という現象について、幹細胞全般に当てはまる普遍的な現象であるかを明らかにし、低接着細胞における分化促進メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 当該現象の普遍性の解明

足場材

2.4 mm × 2.4 mm × 4 mm または 2 mm × 10 mm × 10 mm の 3mol% イットリア含有ジルコニア (3Y-TZP_FS-)、3Y-TZP の表面にフェムト秒レーザーを照射し、マイクロ・ナノ周期構造を作出したもの (3Y-TZP_FS+) を用いて低接着細胞の解析を実施し、組織培養用ポリスチレンプレート (TCPS) はコントロールとして使用した。表面形状はキーエンス社製の 3D laser confocal microscope を用いて観察した。

ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) の単離および骨分化誘導

ラット近交系 F344/NS1c (7 週令、雄) より採取した大腿骨の両骨端を切除し、培地 (DMEM+15% FBS) を大腿骨内腔にシリンジで流し入れ、骨髄細胞を回収した。回収した骨髄細胞は速やかに培養皿に播種し、37 °C、CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養し、培養皿に接着した細胞を BMSC とした。その後 2 日に 1 回培地交換を行い、1 週間培養後の細胞を骨分化誘導実験に使用した。骨分化誘導は細胞を播種し (3×10^4 cells/cm²)、24 時間培養後、骨分化誘導培地 (DMEM+15% FBS, 10 nM Dexamethasone (Dex), 10 mM β -glycerophosphate, 0.28 mM L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate) に交換し、3 週間培養した。培地交換は 2 日に 1 回行った。ネガティブコントロールは Dex 非添加 (-) 群とした。

ラット脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) の単離および骨分化・脂肪分化誘導

ラット近交系 F344/NS1c (7 週令、雄) より採取した皮下脂肪 (背側左右 2 カ所) を 0.1% Collagenase 溶液内で 5 mm 以下の大きさに細断した。脂肪組織を含む 0.1% Collagenase 溶液は 37 °C で 1 時間反応させ、10 分毎に転倒混和を行った。その後、遠心分離を行い PBS で細胞を洗浄後 100 μ m のフィルターに通し、培地 (DMEM+15% FBS) に懸濁した。細胞懸濁液は培養皿に播種し、37 °C、CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養し、培養皿に接着した細胞を ADSC とした。その後 2 日に 1 回培地交換を行い、1 週間培養後の細胞を骨分化誘導実験に使用した。骨分化誘導は、細胞を播種し (3×10^3 cells/cm²)、24 時間培養後、骨分化誘導培地 (DMEM+15% FBS, 10 nM Dexamethasone (Dex), 10 mM β -glycerophosphate, 0.28 mM L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate) に交換し、8 日間培養した。脂肪分化誘導は、細胞を播種し (9×10^4 cells/cm²)、24 時間培養後、脂肪分化誘導培地 (DMEM+15% FBS, 10 μ M Dexamethasone (Dex), 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.2 mM indomethacin, 10 μ g/ml insulin) に交換し、8 日間培養した。培地交換は 2 日に 1 回行った。ネガティブコントロールは Dex 非添加 (-) 群とした。

幹細胞表面分子マーカーの発現解析

単離した BMSC と ADSC の表面分子マーカー (CD29、CD44、CD90、CD34) の発現をフローサイトメーターにより解析した。Bio-Techne 社製の CD29 抗体、CD44 抗体、CD34 抗体、Abcam 社製の CD90 抗体を用いて、細胞を標識した。検出は Beckman Coulter 社製の CytoFLEX flow cytometer を用いて行った。

骨分化評価

アリザリンレッド染色評価：分化誘導後の細胞を PBS (-) で洗浄後、10% ホルマリンで固定し、株式会社 PG リサーチ社製の石灰化評価セット (ARD-SET) を利用して評価した。染色後の細胞は顕微鏡観察後、石灰化結節溶解液を用いて溶解し、プレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定し定量化した。

アルカリフォスファターゼ活性評価：分化誘導後の細胞を PBS(-) で洗浄後、0.1% TritonX-100 溶液で溶解し凍結融解により細胞を完全に破砕し、細胞溶解液を調製した。富士フィルム和光純薬株式会社製のラボアッセイ ALP (291-58601) を用いて、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を評価した。

オステオカルシン分泌量評価：培養上清中におけるオステオカルシン量を測定した。タカラバイオ社製の Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK126) を使用して定量した。

細胞数評価：ALP 活性を評価した細胞溶解液を用いて、Thermo Fisher Scientific 社製の Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (P11496) を使用して、DNA 量を測定した。DNA 量当たりの ALP 活性を算出した。

骨分化関連遺伝子発現解析：トータル RNA は Qiagen 社製の RNeasy Micro Kit を用いて抽出し、逆転写反応は Thermo Fisher Scientific 社製の Super Script™ III Reverse Transcriptase を用いて行った。qPCR の反応は Thermo Fisher Scientific 社製の PowerUp SYBR Green Master Mix を用いて行い、Bio-Rad 社製の CFX Connect Real-Time PCR Detection System によって検出した。プライマーは、Alp > Forward: GAGCAGGAACAGAAGTTTGC、Reverse: GTTGCAGGTCTGGAGAGTA、Oc > Forward: AGCTCAACCCCAATTGTGAC、Reverse: AGCTGTGCCGTCCATACTTT、Actb > Forward: CTCTGTGTGGATTGGTGGCT、Reverse: CGCAGCTCAGTAACAGTCCG を用いた。

脂肪分化評価

脂肪分化関連遺伝子発現解析：トータル RNA の抽出、逆転写反応、qPCR は前述の通り。プライマーは Pparg > Forward: TCAAAAGCCTGCGGAAGCCC、Reverse: TGGCGGTCTCCACTGAGAATAA、Adipoq > Forward: TGGTCCCTCCACCAAGGAAA、Reverse: ACACCTGCGTCTCCCTTCTCT、Gapdh > Forward: AACTCCCATTCTCCACCTT、Reverse: GAGGGCTCTCTCTTGCTCT を用いた。

アディポネクチン量評価：大塚製薬社製のマウス/ラットアディポネクチン ELISA キットを用いて、細胞溶解液のアディポネクチン量を測定した。上記の方法で DNA 量も定量し、DNA 量当たりのアディポネクチン量を算出した。

初期細胞接着面積測定

足場材上に接着した細胞は蛍光標識し、画像解析により初期細胞接着面積を測定した。足場材上に細胞を播種し、3 時間培養後、2% グルタルアルデヒドで固定し、Thermo Fisher Scientific 社製のローダミンファロイジン溶液および SYTO 16 green fluorescent nucleic acid stain 溶液を用いて、細胞質および核を染色した。蛍光顕微鏡で細胞の画像を取得し、Media Cybernetics 社製の Image-Pro PLUS を用いて、接着面積を定量した。

(2) 低接着細胞における分化促進メカニズムの解明

足場材 3Y-TZP_FS- または 3Y-TZP_FS+ 上に播種した細胞の遺伝子発現状態を解析するため、播種 24 時間後の細胞のトータル RNA を回収し、RNAseq を実施した。得られたデータは Bioinformatics USAL 開発の RaNA-seq を用いて、解析した。

4. 研究成果

(1) 当該現象の普遍性の解明

足場材の表面特性解析

フェムト秒レーザー照射した 3Y-TZP_FS+ の表面には長直径 ~ 80 μm、深さ ~ 10 μm の楕円孔を構造単位とした周期構造が観察された (図 1B)。また楕円孔内にはレーザー照射で形成される特有の微細周期構造が観察された (未掲載)。以上より、足場材 3Y-TZP_FS+ の表面形状マイクロ・ナノ周期構造を明らかにした。

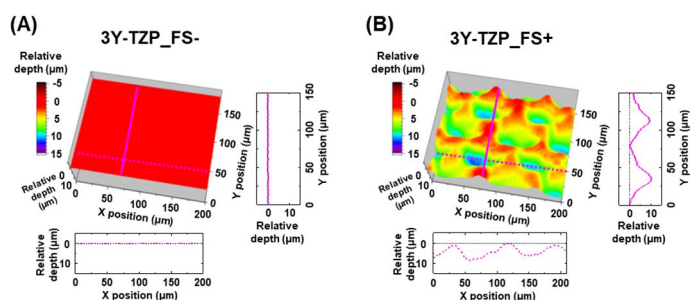


図 1. 足場材の表面形状

単離 BMSC と ADSC の特性解析

単離した ADSC は TCPS に接着し、図 2A のような線維芽細胞様の形態であった。ADSC の表面分子

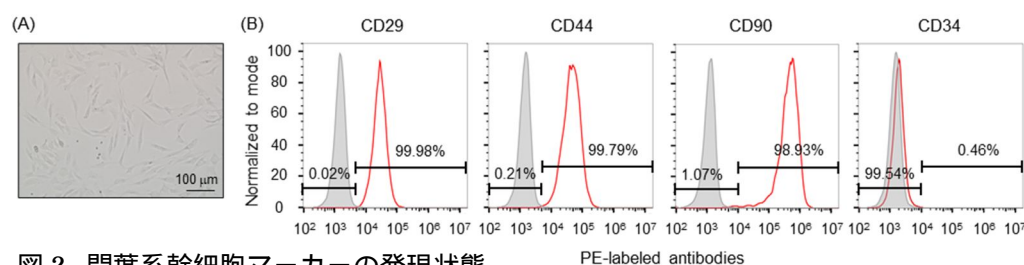


図 2. 間葉系幹細胞マーカーの発現状態

PE-labeled antibodies

マーカーの発現状態を解析したところ、間葉系幹細胞マーカーである CD29、CD44、CD90 の発現陽性、CD34 の発現陰性が確認できた(図 2B)。単離した BMSC についても同様の結果が得られた(未掲載)。また単離した BMSC と ADSC が骨分化能を有するか確認するため、骨分化誘導培地で 8 日間培養し、ALP 活性による骨分化評価を行った。結果、両細胞で ALP 活性が確認でき、ADSC の骨分化能は BMSC の骨分化能と比較して顕著に低いことが明らかとなった(図 3)。

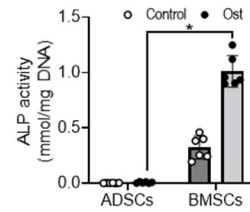


図 3. 骨分化能

初期細胞接着面積

単離した BMSC と ADSC を用いて、足場材上での初期細胞接着面積を測定した。結果、BMSC の接着面積は 3Y-TZP_FS+ が最も小さく、次に 3Y-TZP_FS-、TCPS の順に増加することが明らかとなった(図 4A)。一方、ADSC の接着面積は 3Y-TZP_FS+ が最も小さく、3Y-TZP_FS- と TCPS は同等であることが示された(図 4B)。これよりジルコニア表面上のマイクロ・ナノ周期構造はラット間葉系幹細胞の初期細胞接着面積を減少させることを明らかにした。

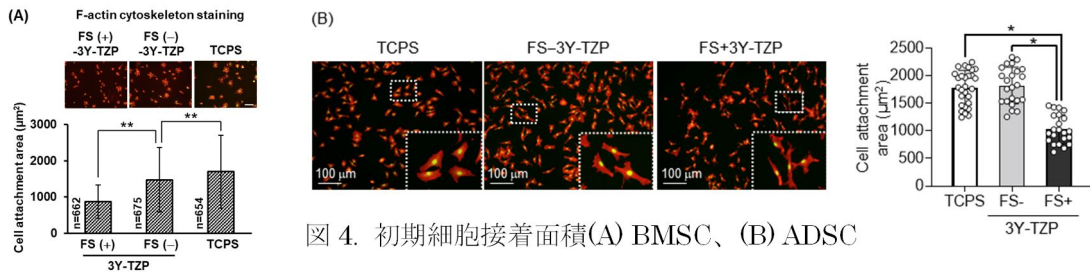


図 4. 初期細胞接着面積(A) BMSC、(B) ADSC

低接着細胞の骨分化能評価

単離した BMSC と ADSC を用いて、足場材上での骨分化レベルを評価した。結果、BMSC の骨分化レベルは 3Y-TZP_FS+ が最も高く、次に 3Y-TZP_FS-、TCPS の順に減少することを明らかにした(図 5)。一方、ADSC の骨分化レベルは 3Y-TZP_FS+ が最も高く、3Y-TZP_FS- と TCPS は同等であることが示された(図 6)。

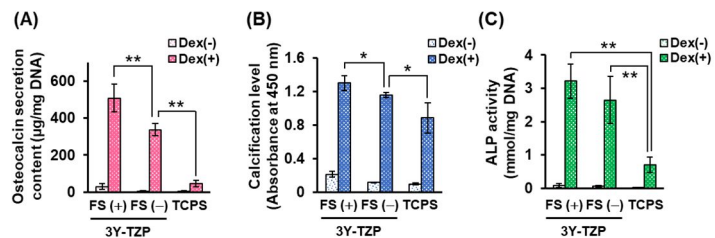


図 5. 各種足場材での骨分化評価 (BMSC)

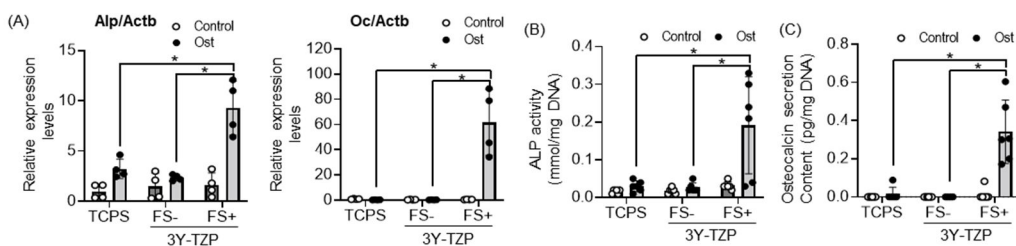


図 6. 各種足場材での骨分化評価 (ADSC)

BMSC の初期細胞接着面積とオステオカルシン分泌量をプロットしたグラフを作図した結果(図 7) 初期細胞接着面積とオステオカルシン分泌量の間には逆相関の関係がみられた。以上より、足場材 3Y-TZP_FS+ は細胞初期接着面積を減少させることで、間葉系幹細胞の骨分化レベルが増加した可能性が示唆された。そして「初期細胞接着面積が小さい程、骨分化能が高い」という現象は、骨髄由来の間葉系幹細胞に限定される現象ではなく、由来組織の異なる間葉系幹細胞においてもみられる現象であることを明らかにした。

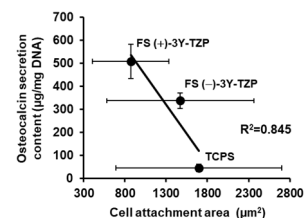


図 7. 初期細胞接着面積とオステオカルシン分泌量

低接着細胞の脂肪分化能評価
 単離した ADSC を用いて、足場材上での脂肪分化レベルを評価した。結果、ADSC の脂肪分化レベルはいずれの足場材においても影響を受けなかった(図 8)以上より、低接着細胞で見られる分化促進は、骨等の特定の分化方向でのみ生じる現象である可能性が示唆された。

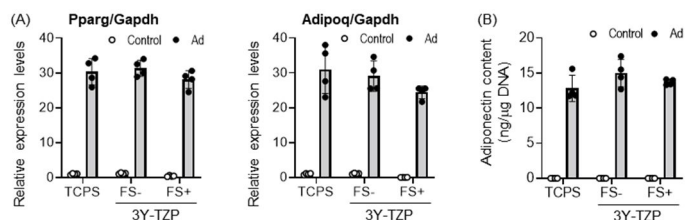


図 8. 各種足場材での脂肪分化評価 (ADSC)

(2) 低接着細胞における分化促進メカニズムの解明
 低接着細胞で発現変動する遺伝子を網羅的に解析するため、低接着細胞を用いた RNA-seq を行った。結果、発現変動する数個の遺伝子群を見出し、GO 解析により関連する現象の抽出を完了した。現在、実際に候補遺伝子群の細胞接着や骨分化への関与を明らかにするための実験を継続している。

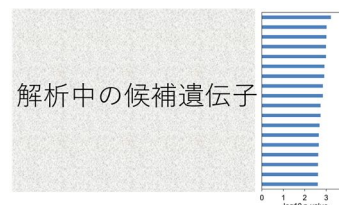


図 9. 候補遺伝子群

< 引用文献 >

- 1) Cheng K, et al. “Correlation between cell attachment areas after 2 h of culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells on hydroxyapatite substrates with various surface properties”, BBRC. 2013
- 2) Hashimoto S, et al. “Cell attachment area of rat mesenchymal stem cells correlates with their osteogenic differentiation level on substrates without osteoconductive property”, BBRC. 2020
- 3) Yasunaga M, et al. “Zirconia substrate with periodic surface microstructures enhances osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells”, Materials Letters. 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 橋本祥吾、安永菜由、廣瀬志弘、欠端雅之、屋代英彦、山崎淳司、伊藤敦夫	4. 巻 525巻4号
2. 論文標題 Cell attachment area of rat mesenchymal stem cells correlates with their osteogenic differentiation level on substrates without osteoconductive property	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.013	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 Yasunaga Mayu, Watanabe Tomoko, Yano Gen, Murotomi Kazutoshi, Hiramatsu Miki, Hirose Motohiro, Kakehata Masayuki, Yashiro Hidehiko, Yamazaki Atsushi, Ito Atsuo	4. 巻 332
2. 論文標題 Zirconia substrate with periodic surface microstructures enhances osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 133544 ~ 133544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.matlet.2022.133544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasunaga Mayu, Kobayashi Fumiko, Sogo Yu, Murotomi Kazutoshi, Hirose Motohiro, Hara Yuki, Yamazaki Masashi, Ito Atsuo	4. 巻 148
2. 論文標題 The enhancing effects of heparin on the biological activity of FGF-2 in heparin?FGF-2?calcium phosphate composite layers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 345 ~ 354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2022.06.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 安永菜由、渡部朋子、矢野玄、室富和俊、平松実季、廣瀬志弘、欠端雅之、屋代英彦、山崎淳司、伊藤敦夫
2. 発表標題 フェムト秒レーザー照射による表面改質ジルコニア上での幹細胞の骨分化評価
3. 学会等名 第21回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安永茉由、十河友、室富和俊、廣瀬志弘、山崎正志、伊藤敦夫
2. 発表標題 ヘパリン - FGF-2 - リン酸カルシウム複合層の成膜とin vitro生物活性評価
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安永茉由、十河友、室富和俊、廣瀬志弘、山崎正志、伊藤敦夫
2. 発表標題 ヘパリン - FGF-2 - リン酸カルシウム複合層でのヘパリンによる生物活性向上効果
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	廣瀬 志弘 (Hirose Motohiro) (80415736)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	
研究分担者	伊藤 敦夫 (Ito Atsuo) (30356480)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・招聘研究員 (82626)	

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
---------	---------