

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20220010

研究課題名（和文） 次世代幹細胞治療のための生物機能改変技術の開発

研究課題名（英文） Development of Technology to Manipulate the Biological Functions of Stem Cells for Cell Therapy of Next Generation

研究代表者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

研究分野：総合領域

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：細胞・組織工学

1. 研究計画の概要

再生医療には、細胞移植とバイオマテリアルと医工学技術を利用した生体組織工学アプローチがある。この2つのアプローチをうまく組み合わせることで、より治療効果が高まることが期待される。本研究の目的は、移植に用いる幹細胞の生物機能を高めるための生体組織工学技術の開発である。

本研究では、幹細胞へ遺伝子物質を導入する材料と培養技術を研究開発するとともに、幹細胞の生物機能の改変、増強について、*in vitro* および *in vivo* 動物実験で評価する。非ウイルス性の細胞内導入材料のデザイン、合成を行う。これらの材料による遺伝子導入効率にも影響を与える培養方法、培養技術について検討をする。本研究の独創的な点は、導入材料と導入のための培養技術との組み合わせによる効率的な幹細胞の生物機能改変である。

2. 研究の進捗状況

多糖の分子量、アミン化合物の導入率などを変化させて作製したカチオン化プルランは、市販の遺伝子導入試薬に比較して、高い遺伝子発現と低い細胞毒性をもっていた。カチオン化プルランと GFP のプラスミド DNA とからなる複合体を細胞接着物質であるプロネクチンとともにコーティングした培養プラスチックシャーレ上で MSC に遺伝子導入培養 (*subfection*) を行った。通常の遺伝子導入法に比較して、有意に高い遺伝子発現レベルが認められた。この *subfection* 法はオリジナルな技術であり、幹細胞への遺伝子導入分野に大きなインパクトを与えられ、この技術により、細胞の生存率を下げることなく、サル MSC のドーパミン分泌神経細胞への分化誘導が可能となっ

た。これは、非ウイルス性遺伝子導入試薬を用いた幹細胞の神経分化誘導についての世界で初めての報告である。3次元細胞足場として、ゼラチンスポンジを作製した。遺伝子導入培養時でのスポンジの変形、スポンジ内部での細胞の死滅を防ぐために、スポンジに繊維あるいはセラミクス粉末を組み込んだ。この力学補強スポンジに、GFP プラスミド DNA とカチオン化多糖複合体を組み入れ、MSC に対する3次元の *subfection* を行った。その結果、2次元の基材に比較して、3次元スポンジ足場では、細胞への遺伝子導入効率が高まり、かつ遺伝子発現が増強された。また、遺伝子導入を静置培養で行ったところ、スポンジ内部の細胞は死滅し、遺伝子発現が見られなかったが、MSC を旋回および振とう培養することにより、細胞の生存率と遺伝子発現効率は有意に改善された。さらに、複合体の3次元スポンジ内への組み入れた後、熱処理を行った。この熱処理時間の増大とともに複合体放出期間が延長し、遺伝子発現期間も延長した。この結果は、3次元スポンジ内で増殖している MSC に、スポンジからプラスミド DNA を含む複合体が持続的に供給され、遺伝子発現が高まったことが理由であると考えられた。

3. 現在までの達成度

①当初の予定以上に進展している。

(理由) 組織幹細胞の生物医学研究が盛んに行われているのに対して、細胞の移植後の生存率や治療効率の改善、向上を目的とした技術、方法論の研究開発は国内外を通じてほとんどいないのが研究開始当初の状態であった。

本研究によって、移植細胞の生存率とその治療効果の改善に、細胞の足場および細胞の遺伝子改変技術が有効であることがわかった。現在まで、計画通りに研究は進み、研究達成度は良好である。

4. 今後の研究の推進方策

骨形成因子(BMP)-2 のプラスミド DNA に対して、3次元スポンジとバイオリアクタを用いた同様の検討を行ったところ、ラット MSC の骨や軟骨分化誘導を有意に高まることがわかった。今後は、BMP-2 のような、生物機能をもつ遺伝子プラスミド DNA を用いた subfection を異なる幹細胞に対して行い、その分化誘導を検討していく。加えて、遺伝子改変培養した幹細胞の生物機能を in vitro と in vivo で生化学的に検討していく。

5. 代表的な研究成果

(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30件)

1. Kido Y, Jo J, Tabata Y. A gene transfection for rat mesenchymal stromal cells in biodegradable gelatin scaffolds containing cationized polysaccharides. *Biomaterials*, 32(3) 919-25(2011) 査読：有
2. Matsuse D, Kitada M, Ogura F, Wakao S, Kohama M, Kira J, Tabata Y., Dezawa M. Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and fibroblast growth factor (bFGF) releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Engineering*, in press 査読：有
3. Nagane K, Jo J, Tabata Y. Promoted adipogenesis of rat mesenchymal stem cells by transfection of small interfering RNA complexed with a cationized dextran. *Tissue Engineering*, 16(1) 21-31(2010) 査読：有
4. Jo J, Okazaki A, Nagane K, Yamamoto M., Tabata Y. Preparation of cationized polysaccharides as gene transfection carrier for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Eds*, 21(2) 185-204(2010) 査読：有
5. Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M., Tabata, Y. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse

transfection method. *Tissue Eng Part A*, 15(7) 1655-65(2009) 査読：有

[学会発表] (計75件)

1. Tabata, Y.: Biomaterial technology to manipulate stem cells for regenerative medicine and therapy. TERMIS-AP 2010 (2010.9.15-17 Sydney)
2. 木戸祐一郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場内の幹細胞への新規遺伝子導入法の開発. 第25回日本DDS学会 (2009.7.3-4 東京)
3. 木戸祐一郎, 城潤一郎, 田畑泰彦: 生体吸収性の三次元細胞足場を利用した組織幹細胞の遺伝子改変. 第31回日本バイオマテリアル学会大会 (2009.11.16-17 京都)
4. Dezawa M.: Efficient induction system of neural precursor cells and dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells. Academy for Multidisciplinary Neurotraumatology (AMN) The Hong Kong Neurosurgery Society (HKNS) Conjoint Congress (2009.11.14 新界 (香港))
5. 山本雅哉, 田畑泰彦: 生体シグナル因子を組み込んだバイオマテリアルによる3次元組織構築. 第8回日本再生医療学会 (2009.3.5-6 東京)

[図書] (計1件)

1. 城潤一郎, 田畑泰彦. 遺伝子医学MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術. 株式会社メディカルドゥ, 369(2009)

[その他]

新聞掲載 (計6件)

幹細胞 骨→脂肪へ路線変更. 産経新聞 2010.1.31

パンフレット (計2件)

- ーよくわかる再生医療に必要なものづくり
- ー再生治療と細胞研究を支えるモノづくりガイドブック. 2010.6月発行. 4000部
- ーよくわかる再生医療に必要なものづくり
- ー再生治療と細胞研究を支えるモノづくりガイドブック. 2011.2月発行. 4000部

公開行事 (計10件)

1. 田畑泰彦: 再生医療の基本概念と再生医療分野の研究開発とモノづくり技術との関係. 再生医療を支えるモノづくりシンポジウム. (2010.8.31 京都) 300人
2. 田畑泰彦: モノづくり技術からみた再生医療. バイオの都・関西セミナー ~再生医療の未来を拓く関西~ (2010.12.9大阪)