

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500431

研究課題名（和文） シグナル因子の固定化配置を応用する幹細胞培養系の開発

研究課題名（英文） Stem cell culture system with immobilized signal proteins.

研究代表者

北嶋 隆 (KITAJIMA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・協力研究員

研究者番号：40399556

研究成果の概要（和文）：光反応性ゼラチンを介して種々のシグナル分子を培養基材表面に固定化した。その表面上で幹細胞を培養し、その分化状態が制御できるかを検討したところ、固定化するマトリックス分子や増殖因子によって、幹細胞の多能性維持、分化誘導などの可能性が示唆された。LIF は未分化維持、activin は量に応じた異なる胚葉系細胞への分化、そして VEGF は直接マウス iPS 細胞からの CD31 陽性細胞への誘導が可能であった。

研究成果の概要（英文）：Various signal proteins such as cytokines and growth factors were photo-immobilized on culture vessels to investigate the effect of them on stem cells. Immobilized LIF and MCP1 chemokine grow ES cells in undifferentiated state. Activin-A immobilized at high dose enhanced ES cells to differentiate into endodermal cells, and at lower dose to cells with mesodermal phenotype. Immobilized VEGF grow CD31 positive cells directly from mouse iPS cells without prior sorting of differentiating cells. These results suggest the possibility of culture devices for stem cells that can regulate differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：幹細胞 培養基材 増殖因子 蛋白質固定化 分化

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実現化に向けて、今後、移植用の細胞のより効率的な増幅培養や、特定の組織構造体を形成してから移植する等の手法

の確立が求められていくと考えられる。通常の培養法では細胞に刺激を与える増殖因子や分化誘導因子など（以下シグナル因子類）は培地に添加される。しかし、これら蛋白性

の因子は、培地中で活性が不安定であり、繰り返し添加する必要がある。我々は、それに代わり、因子類を培養基材等の固相表面に化学的処理で固定化することが有効と考えてきた。(Itoら 1991; Biomaterials 12, 440)。固定化法としては増殖因子を遺伝子工学的に改変してマトリックス結合性を付与した融合蛋白質とするという手法も考えられている(代表者の平成 18-19 年度科研費採択課題)。これら固定化あるいは、結合性の付与によって、因子の効果の持続性が期待され、長期にわたる細胞増殖を支持する効果がみられている。しかしながらこれらの手法が幹細胞の培養に応用された例は少ない。特に幹細胞の分化状態を制御する上で有効かどうかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

これまでの研究例では、シグナル因子等の固定化の利点として、活性の持続性が主に考えられてきたが、本研究では、固定化により、複数種の因子類を、同一容器の中に別々に配置できるという点に着目する。

培地に複数種の因子を添加しても、容器内の環境としては一様であり、原理的にはどの細胞に対しても一様の効果を及ぼすため、細胞の反応は一様である。これに対して、固定化の場合は、別々の因子が固定化された区画ごとに、異なる環境が存在することになる。つまり、多種の因子がアレー状に配置されることで、同一容器内でも、異なるシグナルを受容する細胞が存在することになると想定される。すなわち、どの因子が幹細胞の未分化状態の維持にあるいは分化誘導に有効かなどを同時に比較検討することが可能になると考えられる。さらに、たとえば幹細胞から2種類以上の細胞が分化しそれらが相互作用を行うことも期待される。基本的な組織構造の形成に至る可能性も考えられる。将来的

には、ある適切な固定化条件で「幹細胞の分化→細胞間の相互作用→組織の形成の初期段階」までが、培養器の中で再現できるかもしれない。

従って本研究の目的は、「シグナル因子類の固定化によって幹細胞の分化状態を制御できる培養システム」が可能かを検証することにある。そのために、培養器材へ固定化するシグナル因子の種類、固定化量、区画の形状、およびその配置の検討を行うものである。主に血管系細胞への分化と組織構造形成を対象に行うが、それ以外の細胞・組織にも適用できる方法原理を見いだしたい。

3. 研究の方法

種々のシグナル因子類を、アジドフェニル基を導入した生体高分子(ゼラチンなど)と混合して基材上にスポットし、乾燥後UV照射することで固定化する。複数種の因子のスポット(径0.2~3mm)は、スタンプにより、同一ウェル内に作成され、マウスES細胞、iPS細胞などの幹細胞を播種して、スポット上での細胞の変化を比較解析した。

因子の種類、固定化量、固定域のサイズなどが、1) 幹細胞の未分化状態の維持、2) 幹細胞からの胚葉分化方向性、3) 血管細胞への分化にどのような影響を及ぼすかについて、表面マーカー等の染色をもとに検討した。

4. 研究成果

1) 幹細胞の未分化維持培養

現在汎用されている方法は、フィーダー細胞、あるいはそれに相当するとマトリックス物質のうえに、LIFを加えた培地で培養するというものであるが(マウスES細胞など)、これらフィーダーやマトリックスを用いず、LIFの容器への固定化によっても未分化状態が維持された。またケモカインMCP1も同様の効果があった。しかしいずれも培地添

加の量に比べるとかなり多量を要した（LIF で3桁、MCP1で1桁程度多く必要）。両因子を混合して固定化するとさらに効果が高まるが、やはり培地添加に比べると多量に必要。固定化は有効だが、コスト的には課題が残った。

このほか、アジド基を導入した低分子ヒアルロン酸が、培養器のコート材料として、マウスES細胞の未分化維持培養に有効であることを見いだした。（この項、研究協力者との共同研究）。

2) 胚葉系分化への固定化 activin の効果
BMP4, FGF2, PDGF, EGF, VEGF, HGF などとともに固定化した領域においてマウス ES 細胞を培養し、分化状態を FoxA2（内胚葉系）および SMA（中胚葉系）で検討した。培養後 3～12 日の間でみたところ、FGF2 は activin の効果を抑制したが、それ以外の因子との共存では activin (10ng/mm² 程度) の内胚葉系への分化促進効果が認められた。また、activin 固定化領域外に移動した細胞は中胚葉系の分化傾向を示し、activin の影響を受ける時間が内胚葉分化程度に影響している可能性が示唆された。

3) 血管内皮細胞誘導

多数の因子類（17種類）を activin 無し
の条件で、スポットアレーとして固定化した
うえに、マウス i P S 細胞を播種した。培養
8-14 日で、VEGF 固定化領域上に、CD31 陽性
の細胞が高頻度で見られた。EGF あるいは
BMP4 固定化領域上でも CD31 陽性細胞が見
られたが、ごく少数で細胞の増殖程度が非常
に悪かった。また血管新生因子である FGF2, HGF
などの固定化域でも増殖がほとんど無く、陽
性細胞もみられなかった。

固定化 VEGF は、内皮細胞への初期分化段階
(f1k1 陽性)の細胞を捕捉し、かつそれに対し
て増殖刺激を与えるという仕組みが想定さ

れる。すでに報告されている方法ではES細胞から f1k1 陽性細胞を選別する操作が必要であったが、固定化 VEGF は、分化した細胞だけを選択的に増殖させるためすぐれた培養法といえる。（なお、VEGF 自体が細胞に対して f1k1 発現を誘導しているのかどうかは今後明らかににする必要が有ろう）。

VEGF と同様、シグナル因子の受容体が分化マーカーとして発現してくるものは同様な培養原理の適用が想定される。例えば、内中胚葉から中胚葉の段階で発現してくる PDGF の受容体 (PDGFR α) を持つ細胞に、固定化 PDGF が増殖刺激を与えることができるのはいか？ 逆に EGF, FGF, HGF などは、分化段階にリンクして受容体が発現するものではないために、効果を示さないのかもしれない

「まとめ」本研究により、基材に固定化するシグナル因子類の選択・組み合わせ方によって、未分化維持あるいは、内胚葉系、中胚葉系への分化を制御できる可能性が見いだされ、特に血管内皮細胞への分化条件など、培養基材開発の手がかりを得た。

「今後」固定化領域ですべての細胞が同調して分化する条件や、異なる細胞の相互作用を誘発させるための因子配置形状などが検討課題である。さらに培地組成や、基材表面の影響などとの兼ね合いも検討していく必要が有る。

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 10 件)

1. Shiozaki, Y., Kitajima, T., Mazaki, T., Yoshida Y., Tanaka M., Umezawa A., Nakamura M., Yoshida Y., Ito Y., Ozaki T., Matsukawa A. (2013).

Enhanced *in vivo* osteogenesis by nanocarrier-fused BMP4. *Int J Nanomed* (2013) 8, 1349-1360. (査読あり).

2. Kang, J., Sakuragi, M., Shibata, A., Abe, H., Kitajima, T., Tada, S., Mizutani, M., Ohmori, H., Ayame, H., Son, T.I., et al. (2012).

Immobilization of epidermal growth factor on titanium and stainless steel surfaces via dopamine treatment. *Materials Science and Engineering: C* 32, 2552–2561. (査読あり).

3. Lu, H., Kawazoe, N., Kitajima, T., Myoken, Y., Tomita, M., Umezawa, A., Chen, G., and Ito, Y. (2012). Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity. *Biomaterials* 33, 6140–6146. (査読あり).

4. Tada, S., Kitajima, T., and Ito, Y. (2012). Design and Synthesis of Binding Growth Factors. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 6053–6072. (査読あり).

5. 北嶋隆, 多田誠一, 伊藤嘉浩 (2012). 結合性細胞増殖因子の創成と応用. *高分子論文集* 69, 1–10. (査読あり).

6. Joddar, B., Kitajima, T., and Ito, Y. (2011). The effects of covalently immobilized hyaluronic acid substrates on the adhesion, expansion, and differentiation of embryonic stem cells for *in vitro* tissue engineering. *Biomaterials* 32, 8404–8415. (査読あり).

7. Kitajima, T., Obuse, S., Adachi, T., Tomita, M., and Ito, Y. (2011). Recombinant human gelatin substitute with photoreactive properties for cell culture and tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2468–2476. (査読あり).

8. Okiyama, N., Kitajima, T., Ito, Y., Yokozeki, H., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2011).

Addition of the collagen binding domain of fibronectin potentiates the biochemical availability of hepatocyte growth factor for cutaneous wound healing. *J Dermatological Science* 61, 215–217. (査読あり).

9. Umezu, S., Kitajima, T., Ohmori, H., Ito, Y. (2011). Fundamental characteristics of printed cell structures utilizing electrostatic inkjet phenomena. *Sensors and Actuators A:Physical* 166, 251-255. (査読あり).

10. Sakuragi, M., Kitajima, T., Nagamune, T., and Ito, Y. (2011). Recombinant hBMP4 incorporated with non-canonical amino acid for binding to hydroxyapatite. *Biotechnology Letters* 33, 1885–1890. (査読あり).

[学会発表] (計 13 件)

1. 姜 廷和 櫻木 誠 多田 誠一 北嶋隆 伊藤 嘉浩. 無機材料の表面への BMP の固定第 33 回日本バイオマテリアル学会 2011 11/21 京都

2. 多田 誠一 北嶋隆 伊藤 嘉浩. 進化分子工学的手法を用いた 化チタン表面への EGF の固定化 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 2011 11/21 京都

3. 姜 廷和 阿部 洋 北嶋隆 相垣 敏郎 伊藤 嘉浩. Immobilization of growth factor on inorganic surfaces 第 40 回医用高分子シンポジウムプログラム 2011 7/25 吹田

4. 多田 誠一 北嶋隆 伊藤 嘉浩. リボソームディスプレイ法による酸化チタン結合性ペプチド融合 EGF の創製第 60 回高分子学会年次大会 2011 5/25 大阪

5. 姜 廷和 櫻木 誠 北嶋隆 伊藤 嘉浩. 無機材料結合性成長因子 EGF の創成 第 10 回日

本再生医療学会 2011 3/2 東京

6. 伊藤 小布施、北嶋 水越、松江、田代、中村、吉田. 可視光硬化型ゼラチン誘導体の調製とその性能評価 第32回日本バイオマテリアル学会 2010 11/30 広島

7. 伊藤 嘉浩 姜 廷和 櫻木 誠 阿部 洋 北嶋 隆. 無機・金属材料上への成長因子固定化 第32回日本バイオマテリアル学会大会 広島 2010 11/29

8. 伊藤 嘉浩 小布施 聖 北嶋 隆 松江 清美 松江 登久 田代 英夫. 可視光硬化型ゼラチン生体接着剤の開発 第48回日本人工臓器学会大会 仙台 2010 11/19

9. 伊藤 嘉浩 小布施 聖 北嶋 隆 松江 清美 松江 登久 田代 英夫. 可視光硬化型ゼラチン誘導体 第59回高分子討論会 札幌 2010 9/15

10. 姜 廷和 櫻木 誠 阿部 洋 北嶋 隆. 金属・無機表面への成長因子の固定化による生体機能性付与 伊藤 嘉浩 第59回高分子討論会 札幌 2010 9/15

11. 姜 廷和 櫻木 誠 阿部 洋 北嶋 隆 相垣 敏郎 伊藤 嘉浩. Covalent immobilization of EGF on dopamine-modified metal surfaces 日本化学会第4回関東支部大会 つくば 2010 8/30

12. Kadengodlu A Pallavi、北嶋 隆、小布施 聖、伊藤 嘉浩. 細胞培養用の光硬化性ヒトゼラチンの合成 日本化学会第4回関東支部大会 つくば 2010 8/30

13. 姜 廷和 阿部 祥子 北嶋 隆 櫻木 誠 和田 章 阿部 洋 伊藤 嘉浩 無機・金属材料への成長因子固定化の試み 第39回医用高分子シンポジウム 東京 日本 2010 7/26

[図書] (計1件)

Kitajima, T., and Ito, Y. (2012). Chapter 17. Artificial Binding Growth Factors. In Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. pp 337–353. Pan Stanford Publishing (Singapore).

[その他]
ホームページ等作成中。

6. 研究組織

(1) 研究代表者
北嶋 隆 (KITAJIMA TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・協力研究員
研究者番号：40399556

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者
Binata Joddar (JODDAR BINATA)
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・海外特別研究員

Ponnurengam Sivakumar Malliapan
(SIVAKUMAR MALLIAPAN PONNURENGAM)
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・海外特別研究員