

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24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710116

研究課題名（和文）ナノファイバーを用いた幹細胞の未分化状態を制御する新規手法の開発

研究課題名（英文）Scaffolds created with electrospun nanofibers to maintain pluripotent stem cell culture

研究代表者

劉 莉（Liu Li）

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定研究員

研究者番号：50380093

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ナノファイバーを用いた幹細胞の未分化状態を制御する新規手法の開発を目的とする。フィーダー細胞を使用せずに iPS/ES 細胞の多能性を維持する培養する手法の開発が求められている。申請者がナノファイバーを幹細胞の足場材料として用い、未分化状態を制御する新規手法の開発を目指していた。本研究実施始めから2年間の間、フィーダー、血清を使わず、新規ナノファイバー上で、マウス及びヒト iPS/ES 細胞を培養し、細胞の未分化状態を維持することが成功した。さらに、ナノ加工法により、マウス ES 細胞及びヒト iPS/ES 細胞をパターンニング化させる新規方法も確立した。

研究成果の概要（英文）：

Embryonic stem cells (ESCs) are useful resources for drug discovery, developmental biology and disease studies. Cellular microenvironmental cues play critical roles in regulating ESC functions, but it is challenging to control them with synthetic components. Nanofibers hold a potential to create artificial cellular cues for controlling cell adhesion and cell-cell interactions. In this project, I focus to develop a new technology for maintaining pluripotent stem cell culture by electrospun nanofibers. The last two years, I provide a chemical defined scaffold created with electrospun nanofibers made from polymethylglutarimide (PMGI), which is a synthetic thermoplastic polymer stable under culture conditions. mESCs on nanofibers showed a growth rate comparable to those cultured conventionally and they retained their pluripotency. In addition, integrated with micro/nano-engineering technology, I successfully established an approach for patterning pluripotent stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：分子マニピュレーション、ナノファイバー、幹細胞、分化・未分化、細胞パターン

1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞実験の間中は、従来の方法では、フィーダー細胞に異種動物由来の細胞がそのまま用いられている。しかし、臨床応用での混入の危険性が指摘されると共に、技術的に煩雑である。また、マウス由来のフィーダー細胞がヒト由来の幹細胞表面をマウス様に修飾することもわかってきたため、新たな合成基材や培養液の開発が進められている状況。

(2) 薬剤処理実験の際には、薬剤がフィーダー細胞側に取り込まれて生じる結果を常に考慮し、擬陽性・擬陰性の対策をしなければならない。

(3) 最近、広く使用されている細胞培養基材としては、マトリゲルや組換えタンパク質等が挙げられるが、これらの材料はコストが高く、また、ロット間による品質の差が大きいなど安定性に欠けている。このような条件で培養されたヒト多能性幹細胞は不安定な状態になり、その結果、細胞増殖速度の異常、非常に不均一な細胞群への変質、分化能の損失、核型の変異等の異常を引き起こしてしまう。

幹細胞の未分化状態を維持するために、フィーダーの代わり、より安定している基材を必要となっている。

2. 研究の目的

iPSやES細胞などの多能幹細胞を、未分化状態を維持したまま培養するためには、フィーダー細胞を足場として使用することが基本的には要求される。この操作にかかる手間と制御の難しさ、そして、将来に臨床医療へ応用する時、動物由来の成分は混在しているリスクが存在するため、フィーダー細胞なしで、

安全、簡易に幹細胞できる手法の開発が求められている。本研究課題では、ナノファイバーを幹細胞の足場材料として用いて未分化状態を制御する、新規手法の開発を目指す。

3. 研究の方法

近年、高分子（ポリマー）技術を細胞培養の足場材料へ応用する手法が注目されている。合成高分子、天然高分子、無機材料及びこれらの複合体など、様々な材料がポリマー技術へ活用可能であり、それらを奈のファイバー化したポリマーが非常に注目を集めている。一方、エレクトロスピンング法で作られたナノファイバーは細胞培養の足場としてよく使われている。ナノファイバー上で、高い細胞接着性を持たせるや、細胞がよく好む多孔質性などの優位点がある。本研究はナノファイバー化したポリマーを作製し、幹細胞の未分化状態を制御することを検討した。

4. 研究成果

① 一年目には、高分子材料である **Polymethylglutarimide (PMGI)** で作ったナノファイバーがフィーダー細胞に代わり、マウス ES 細胞の未分化状態維持を確認した。その未分化状態の維持はナノファイバーの密度と関係していることが明らかになった。二年目には、このファイバー上でマウス ES 細胞の長期培養が可能であることも確認した。さらに、長期培養された細胞は多能性を持たせる結果を得られた。本研究成果は国際学会（8th iCeMS international symposium 2010, 2nd NanoToday 2011）において発表した。さらに、つい最近、国際誌 *Biotech. Letter* にもアセプトされた。

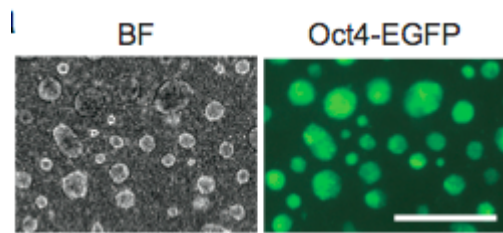


Fig. 1 ナノファイバー上で培養されたマウス ES 細胞

②多能幹細胞を培養する時、細胞の増殖により、コロニーのサイズが大きくなっていく。そして、近隣のコロニーと融合してしまうケースが少なくない。コロニー間の融合発生により、このコロニーの多能幹細胞が分化されてしまう可能性が高くなる。

ここで、私はナノファイバーと MEMS 加工技術との融合によりナノファイバーパターンを作製し、マウス ES 細胞をパターン化する方法を確立した (Microelectro. Eng. 投稿準備中)。この方法を利用すれば、コロニーの位置と大きさをコントロールすることができる。

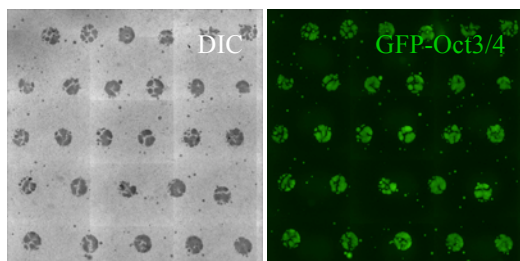
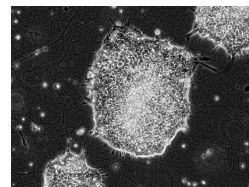


Fig. 2 パターン化されたマウス ES 細胞

③ 生体適材料 Gelatin をナノファイバーの材料として、ヒト ES/iPS 細胞の未分化状態を長期的に維持することに成功した (Nature Biotechnology 投稿準備中)。具体的には、最適な条件を見出すため、ファイバーの密度、太さ、構造、安全性などの条件を検討し、ヒト ES 細胞の未分化状態を維持できる条件を見出した。ヒト iPS/ES 細胞に適切な材料選別とこのナノファイバーの最適化を検討した。

Fig. 3 ゼラチンナノファイバー上で培養されたヒト iPS 細胞。



④ Micro Contact Printing (μ CP)、photolithgraph などの MEMS 技術と融合して作られたパターンナノファイバー上で、ヒト iPS/ES 細胞をパターンニングする新幹細胞培養手法を開発した。この手法により、今までコントロールできなかったクローニンのサイズや位置などを制御できるようになった (Nano Lett. 投稿準備中)。

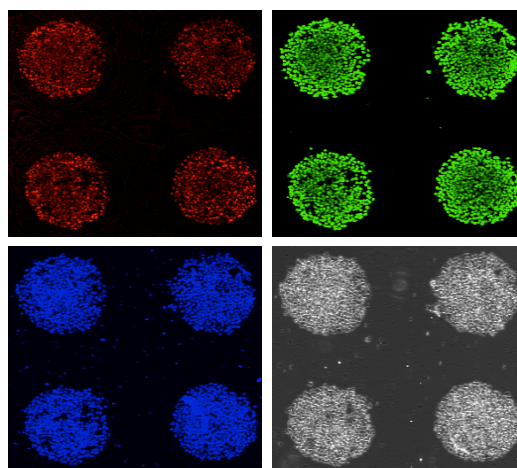


Fig. 4 ゼラチンナノファイバー上でパターンされたヒト iPS 細胞

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 5 件)

- ① Li Liu, Qinghua Yuan, Jian Shi, Xin Li, Dong Jung, Li Wang, Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen, “Chemically defined scaffolds created with electrospun synthetic nanofibers to maintain mouse embryonic stem cell culture under feeder-free conditions” *Biotechnol. Lett. in press*

② Xin Li, Li Liu, Li Wang, Ken-ichiro Kamei, Qinghua Yuan, Fan Zhang, Jian Shi, Akihiro Kusumi, Min Xie, Zhenjie Zhao and Yong Chen, “Integrated and diffusion-based micro-injectors for open access cell assays” *Lab Chip* 11, 2612-2617 (2011)
doi: 10.1039/C1LC20258H (査読有)

③ Li Wang, Jian Shi, Li Liu, Emilie Secret, Yong Chen, “Fabrication of polymer fiber scaffolds by centrifugal spinning for cell culture studies” *Microelectron. Eng.* 88, 1718-1721 (2011)
doi:10.1016/j.mee.2010.12.054 (査読有)

④ Investigation of cell culture in microfluidic devices with differet bi-layer substrate
Jian Shi*, Li Liu*, Yong Chen *Microelectron. Eng.* 88, 1693-1697 (2011) (contributed equally)
doi:10.1016/j.mee.2011.01.047 (査読有)

⑤ Differentiating stem cells on patterned substrates for neural network formation
Chunxiong Luo*, Li Liu*, Xiaofang Ni, Li Wang, Shi-ichiro Nomura, Quyuan Qi, Yong Chen *Microelectron. Eng.* 88, 1707-1710 (2011) (contributed equally)
doi:10.1016/j.mee.2010.12.062 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 2nd NanoToday, Hawaii, 2011.12.11~15
Title: Electrospun nanofibers for creating artificial cellular microenvironments for culturing mouse embryonic stem cells
Li Liu, Qinghua Yuan, Jian Shi, Li Wang, Xin Li, Dong Jung, Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen

② 8th iCeMS Interventional Symposium, Meso-Control of Functional Architectures, Kyoto,

2010.11.9~11

Title: Long-term feeder-free culture of mouse embryonic stem cells on electrospun nanofibers
Li Liu, Q. Yuan, K Kamei, Jian Shi, Xin Li, Li Wang, Dong Jung, Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji and Yong Chen

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 莉 (Liu Li)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定研究員

研究者番号 : 50380093

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

陳 勇 (Chen Yong)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号 : 70512458