

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23650264
研究課題名（和文） 自己集合性ペプチドゲルを用いた3次元培養ストレッチシステムの開発
研究課題名（英文） Development of a three dimensional stretch cell culture system with a self-assembling peptide scaffold
研究代表者 成瀬 恵治（NARUSE KEIJI） 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 研究者番号：40252233

研究成果の概要（和文）：効率的な組織再生を行うために、3次元培養組織に機械刺激を加えることができるシステムの開発を行った。独自に開発した自己集合性ペプチドゲルおよび伸展培養容器を組み合わせたシステムを用い、3次元培養したマウス筋芽細胞に伸展刺激を加えたところ、細胞内ERKのリン酸化や細胞増殖率の向上が確認された。これらの結果から、本システムが3次元培養細胞に機械刺激を与え、増殖などを制御できることが証明された。

研究成果の概要（英文）：For effective tissue regeneration, we have developed a three dimensional cell culture system capable of mechanical cell stimulation. The degree of ERK phosphorylation and the cell proliferation ratio of three dimensionally cultured mouse skeletal muscle cells were improved by stretch stimulations in a system composed of newly developed self-assembling peptide gel and stretch chamber. These results demonstrated that the three dimensional stretch cell culture system was able to transmit mechanical stimulation to the cell and control its behaviors such as cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

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：再生医療、機械刺激、スキャフォールド、自己集合性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

再生医療では細胞が立体的な組織へと成長するためのスキャフォールドが必要である。近年、機械刺激によって細胞の増殖や分化を促進できることが明らかとなり、その応用として、スキャフォールドを伸展・圧縮し、内部の細胞を機械的に刺激する研究がなされるようになった。

代表的なスキャフォールドであるコラーゲンは高い生体適合性と力学的強度を併せ持ち、上述の用途に適している。しかし、動物由来で多くの増殖因子を含むため、それらの細胞への影響を無視できない。また未知の感染症の危険性が否定できず、実際のヒトでの使用

には問題があった。

2. 研究の目的

上記の問題点を克服するため、我々はコラーゲンに代わる動物由来成分を含まないスキャフォールドとして、自己集合性ペプチドゲルを開発した。これまでに基本的な生体適合性を確認しており、また予備実験によって、自己集合性ペプチドゲルをストレッチすると内部の細胞もストレッチ刺激を受けることが分かっている。そこで、本研究では我々が新規開発した自己集合性ペプチドゲルをスキャフォールドとした3次元培養ストレッチシステムを開発し、ストレッチ刺激の条件を最

適化することにより、より生体に近い組織へと成長させることができるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規3次元培養ストレッチシステムの開発：従来はシリコン製の培養器内に取り付けた発泡PDMSシートの上に自己集合性ペプチドゲルを乗せ、シートを伸展させることでその上にあるゲルに伸展刺激を与えた。しかし、同手法ではゲル全体を均一に伸展させることができないため、改良型として、発泡PDMSシートを垂直に2枚ならべ、その間に一定容量のゲルを挟む構造の伸展容器を作製した。本伸展容器及び自己集合性ペプチドゲルスキャフォールドを用いたシステムがストレッチシステムとして運用可能であることを確かめるため、ゲルの伸展に伴って内部の細胞が伸展できる、内部細胞のERKなどのリン酸化が亢進することをウエスタンブロットで確認した。

(2) 伸展による細胞の増殖のコントロール：マウス筋芽細胞は2次元培養において、周期的な伸展刺激を加えると細胞が増殖することが報告されている。そこで、自己集合性ペプチドゲル内で3次元培養したマウス筋芽細胞に周期的な伸展刺激{伸展パターン：0%→10% (4.5秒/%)、伸展率10%で5分間維持、10%→0% (4.5秒/%)、伸展率0%を5分間保持→再び伸展開始}加えることで細胞増殖を促進可能であるかを確認した。

(3) 伸展容器・ゲル容量の最適化
伸展容器についてゲルを挟み込むための発泡PDMSシートと、よりばらつきなく作成できる鋳型を用いて作成したPDMSシート(縦x横x高さ=20x1x2mm、側面にφ=1.2mmの穴x8)について、ゲルの伸展の確実性(安定して伸展が可能かどうか? 伸展によってゲルが脱離しないかどうか?)を確認し、さらに安定した伸展のための細胞/ゲルの適切な量を検討した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

①発泡PDMSシートを用いた伸展容器内で、自己集合性ペプチドを用いて3次元培養を行ったマウス筋芽細胞(C2C12細胞)は経時的に増殖することが確認され、本3次元培養システムによって細胞培養が可能であることが確認された。

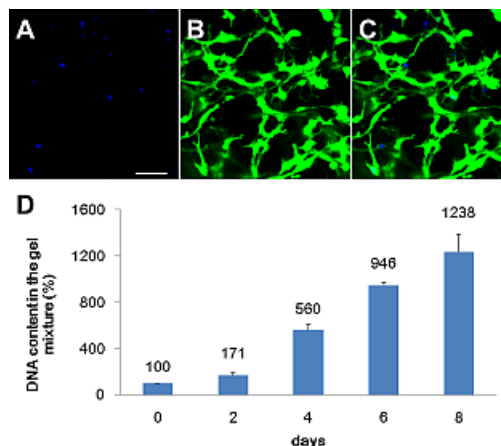


図1 自己集合性ペプチドゲル内での3次元培養。ゲル内細胞(ラット筋芽細胞)のA) DAPI(死細胞)、B) Calcein(生細胞)染色、およびC) Merge。D) 培養0日目以降の細胞DNA量の変化。

②①と同様に培養されたC2C12細胞について、伸展装置ごと伸展を実施した。顕微鏡観察により、伸展装置の伸展に伴って、内部の細胞が伸展され細胞間の間隔の増大も認められた。これにより、伸展培養+自己集合性ペプチドゲルによる伸展培養システムによって、ゲル内部で培養する細胞を伸展可能である

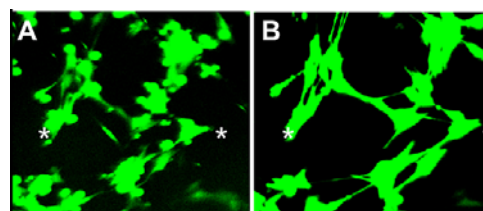


図2 ゲル内のC2C12細胞(Calcein(生細胞)染色。A) 伸展前、B) 伸展後、伸展容器を20%伸展させたところ、図のアスタリスク間の距離は19%増加した。

ことが確認された。

③①と同様に培養されたC2C12細胞について、伸展率10%で5分間の伸展を加えたところ、細胞内ERKのリン酸化の向上が確認された。これにより、本伸展培養システムを用いて、実際にゲル内部の細胞に伸展(=機械刺激)を伝達し、さらにその刺激によって細胞の機能活性化を促すことが可能であることが確認された。

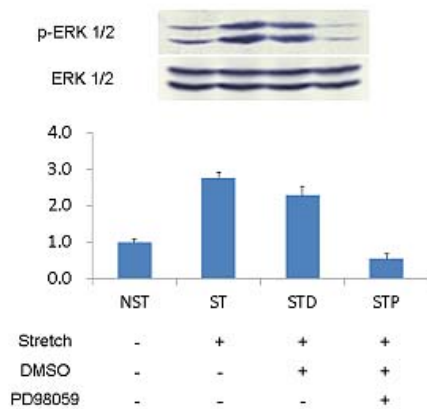


図3 伸展に伴う内部細胞の ERK リン酸化挙動。10%・5分間の伸展(ST)により、伸展無し(NST)に比べてリン酸化が約3倍亢進した。伸展効果はDMSO添加では変わらないが(STD)、DMSOにERKリン酸化阻害剤(PD98059)を加えると消失した(STP)。

④ 鋳型を用いて作成したPDMSシート(縦x横x高さ=20x1x2mm、側面にφ=1.2mmの穴x8)を装着した伸展容器を用いて、8日間静置培養したC2C12細胞について、伸展刺激{伸展パターン: 0%→10%(4.5秒/%)、伸展率10%で5分間維持、10%→0%(4.5秒/%)、伸展率0%を5分間保持→再び伸展開始}を48時間にわたり、加えたところ、細胞の増殖率が向上した。これにより、伸展培養システムを用いることにより、細胞の増殖率を制御可能であることが確認された。

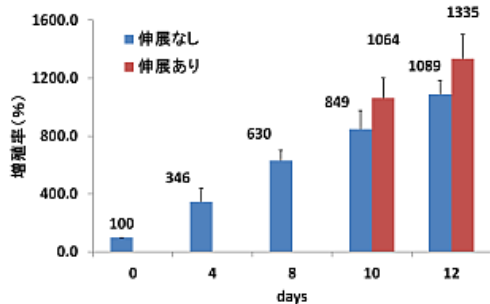


図4 C2C12細胞の3次元培養に対する機械刺激の効果(伸展率10%、伸展保持時間5分)

⑤ 伸展容器について、①発砲PDMSを用いたもの、②鋳型を用いて作成したPDMSシートを用いたもの、の双方について評価した。いずれの培養器を使用しても、マウス筋芽細胞を包含する自己集合性ペプチドゲルに10%、5分間の伸展刺激を加えることで細胞内ERKおよびP

38のリン酸化が促進されることを確認した。ただし、ゲルの脱離の発生頻度を考慮した場合、①の培養器を用いた方がより安定した結果が得られた。また、用いる細胞/ゲルの混合物の容量を90μLにすることで機械刺激を安定して細胞に伝えることが確認された。さらに、①の培養器を用いた培養において、伸展率を10%から15%に拡大するとERKのリン酸化がさらに向上する事象を確認するに至り、3次元培養ストレッチシステムの完成度を高めることができた。

従来、細胞への機械刺激についての研究は多くなされているがそのほとんどが2次元培養による基礎的なものであり、再生医療分野における3次元培養において、機械刺激の応用について検討した本研究は世界的にも類を見ない、先駆的なものであると言える。さらにスキャフォールドとして、これまで一般的に用いられてきたコラーゲンやマトリゲルといった動物由来の材料を使わず、独自開発した自己集合性ペプチドを用いることで、臨床応用への可能性を広げることができた。

今後、本研究によって得た知見をもとに、さらに実用的な組織再生のための機械刺激の検討を実施し、筋芽細胞のみならず、軟骨細胞など高齢化社会においてターゲットとなる組織の再生について研究を行う予定である。

なお、本研究に使用した自己集合性ペプチドは商品名PanaceaGelとして、株式会社メニコンから市販され、

(http://menicon-lifescience.com/panacea_gel.html)、2012年5月に開催された第51回日本生体医工学会大会において、平成23年度日本生体医工学会 科学新聞賞・新技術開発賞を受賞した。

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1件)

- ① Nagai Y, Yokoi H, Kaihara K, Naruse K, The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel. *Biomaterials*, 査読有、33(4), 2012, 1044-1051.

[学会発表] (計3件)

- ① 永井祐介、自己集合性ペプチドゲルを用いた3次元培養ストレッチシステムの開発、第12回日本再生医療学会総会、2013年3月22日、パシフィコ横浜
- ② Nagai Y, Development of a Three

dimensional Cell Culture System under Mechanical Stimulation with a Self-Assembling Peptide Scaffold, The 34th Annual International Conference of The IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2012 年 8 月 30 日, Hilton Bayfront Hotel in San Diego, California, USA

- ③ Nagai Y, A NEW SELF-ASSEMBLING PEPTIDE HYDROGEL FOR 3-D CULTURED CELL UNDER MECHANICAL STRESS, Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2011 Asia Pacific Meeting, 2011 年 8 月 4 日, Grand Copthorne Waterfront Hotel, Singapore

[その他]

ホームページ等

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム生理学 ウェブページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/phy2/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

貝原 恵子 (KAIHARA KEIKO)

岡山大学・医学部・技術専門職員

永井 祐介 (NAGAI YUSUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生