

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 28 日現在

機関番号：82670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791678

研究課題名(和文) 3次元マトリックスの硬さが幹細胞による軟骨細胞の分化に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells on the stiffness of three dimensional extracellular matrix

研究代表者

大藪 淑美 (Ohyabu, Yoshimi)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・副主任研究員

研究者番号：80587410

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)：従来、硬さ制御には細胞毒性がある架橋剤を用いるために、3次元での培養はできなかった。分子鎖が切断されていない非分解性ゼラチンは30℃でらせん構造を回復しやすく、コラーゲン線維に類似する線維を形成することを確認した。非分解性ゼラチンに含まれる線維形成成分を特定し、コラーゲンの取り扱いでタブーとされてきた熱変性を利用した新しい高強度コラーゲン線維ゲルの作製方法を開発した。高強度コラーゲン線維ゲルは、組織工学や再生医療のための、より耐久性のあるハイドロゲルを提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Generically, we used crosslinker that has a cytotoxic to control stiffness and was not able to be cultured for the cells in three-dimensional. Gelatin uncleaved molecular chains (uncleaved gelatin; UCG) were tends to restore the helical structure at 30 degrees C and confirmed to form fibrils similar to the collagen fibers. We identified the fiber-forming component that is included in UCG and developed a method for fabrication of high-density collagen fibril matrix gels from concentrated solutions of UCG. High-strength CFM may provide more durable hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：硬さ 3次元 ゼラチン 線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) 再生医療や創薬研究に期待される iPS 細胞等の幹細胞研究が活性化されるなか、分化制御には①分化誘導物質などの因子、②細胞の足場の3次元化、および③足場の硬さの3つが重要とされて、①に着目した研究が最も多くなされてきた。生体内で細胞は3次元の組織として存在するため、②3次元化に着目して分化制御の研究¹がされている。近年、従来の培養容器の硬さが問題視され、細胞が接着する足場が組織の硬さに類似すると、その組織を構成する細胞への分化が最も促進される²ことから、①足場の硬さに関する研究もなされている。分化誘導にはこの3つの因子の複合が重要であると考えられる。しかし、培養環境下(37°C)で硬さを制御できる適切な培養材料がなく、足場の硬さと分化の研究はいずれも2次元培養での検討に限られている。

(2) 細胞外マトリックスであるコラーゲンと化学的に等価であるゼラチンに着目した。市販ゼラチンは培養温度で融解するが、その融点を高める技術が開発できれば、細胞障害なく3次元包埋培養を実現し、その濃度により硬さを制御することが可能となる。3次元で硬さを制御できる培養材料の開発により、効率の良い分化誘導が実現されれば幹細胞の実用化を加速すると期待される。

2. 研究の目的

本研究では剛性(硬さ)制御可能な3次元培養用人工細胞外マトリックスを開発し、幹細胞の軟骨分化に3次元足場の硬さが影響するかどうかを明らかにする。

コラーゲンと化学的に等価であるゼラチンの融点を高める新技術を開発して3次元包埋培養を実現し、その濃度により硬さを制御する。3次元環境での分化誘導が必須である軟骨組織の再生に注目して、3次元細胞外マトリックスの硬さが幹細胞の分化にどのように関与しているかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 培養環境(37°C)で融解しない高融点ゼラチンを合成する。ゼラチンの原料にペプシン消化コラーゲン(アテロコラーゲン)を用いて分子が分解されていないゼラチン(非分解性ゼラチン)を合成し、物性(融点)を評価した。

(2) 非分解性ゼラチンの高強度化を試みる。線維形成のメカニズムを検討し、線維形成成分を分離して特定した。

(3) 培養材料の硬さを制御して3次元包埋培養の実験系を構築する。ゼラチン濃度により硬さを制御し、生存率が低下しない培養方法を検討した。

(4) 3次元細胞外マトリックスの硬さが幹細胞から軟骨細胞への分化に及ぼす影響を明らかにして詳細を検討する。最も硬いゲルにより分化培養した細胞の遺伝子発現を比較して、軟骨分化と足場の硬さに密接な関係があることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 37°Cで融解しないゼラチンの合成とその物性

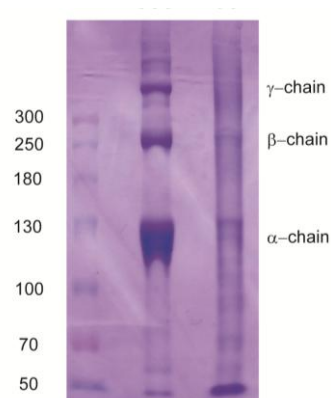


図1 非分解型ゼラチンと市販ゼラチンのSDS-PAGEのバンドパターン

主鎖の分解が抑制されたゼラチンは、アテロコラーゲンを熱変性させ、ゼラチン化することにより作製した。これを“非分解型ゼラチン”とした。作製した非分解型ゼラチン(図1中央)と市販ゼラチン(図1右)の分子鎖を確認するためにSDS-PAGEによる電気泳動結果を実施した。非分解型ゼラチンは125、140、250kDaのバンドパターンが確認され、コラーゲンの分子鎖でそれぞれ α -、 β -、 γ -鎖に相当し、コラーゲンの分子鎖が分解されていないことが明らかである。比べて、市販ゼラチンはバンドが明瞭ではなく、125kDa以下の幅のあるバンドが確認され、分解されていることが明らかである。

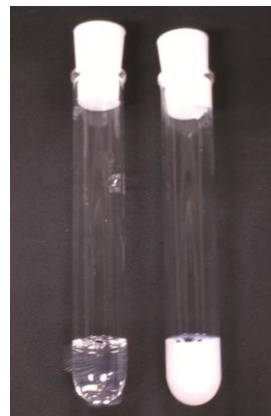


図2 静置する温度による非分解型ゼラチンゲルの外観の違い

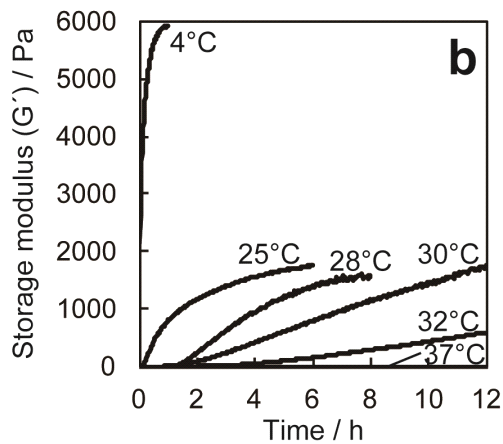


図3 異なる温度で静置した非分解型ゼラチンのゲル化挙動

非分解型ゼラチンの融点は動的粘弾性測定法により融点を測定した。リン酸緩衝生理食塩水により 5%ゼラチン水溶液を調製し、冷却してゲル化させ、その後 50°Cまで昇温した。貯蔵弾性率が 1Pa 以下になるまでの温度のうち、線形領域で近似曲線を求めて、その近似曲線の貯蔵弾性率が 0Pa となるときの温度を融点とした。非分解型ゼラチンの融点は 28°Cであり、市販ゼラチンより 7°C上昇した。

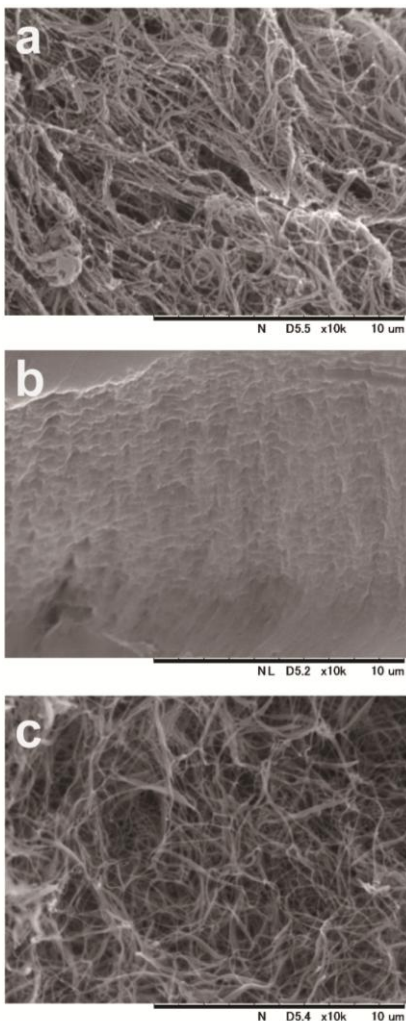


図4 非分解型ゼラチンゲル（静置温度 30°C . a、4°C : b）とコラーゲン線維ゲル（c）の SEM像

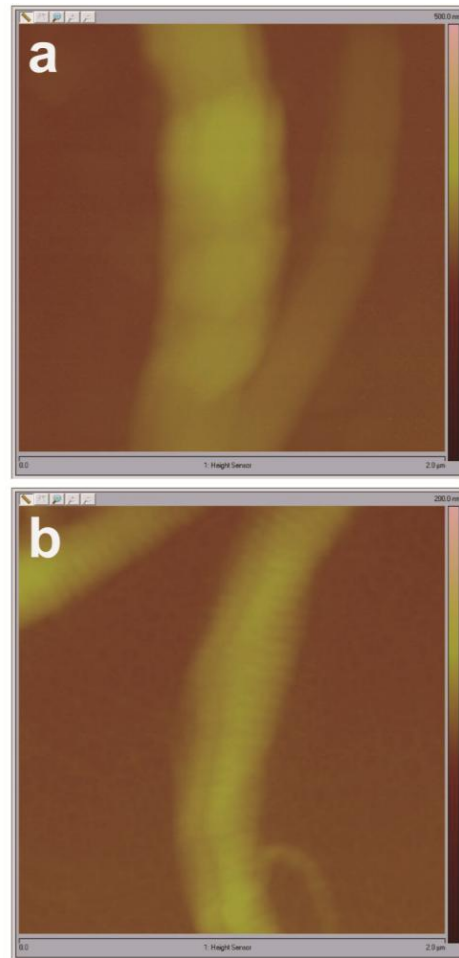


図5 非分解型ゼラチン（a）とコラーゲン（b）のナノ線維の AFM像

(2) 非分解性ゼラチンの高強度化

非分解型ゼラチンを 4°Cと 30°Cで静置したゲルの外観を図 2 に示す。4°C（左）ではゼラチンゲルのような透明なゲルになり、30°C（右）では線維ゲルのような白濁したゲルとなった。異なる温度での非分解型ゼラチンのゲル化挙動動的粘弾性試験機でモニタリングした（図 3）。4°Cでは急激な貯蔵弾性率 (G') の上昇があり、25°Cでも G' は 4°Cと比べて低い、急激に G' が上昇する同様の傾向があった。28~32°Cでは 2 時間後から緩やかに G' が上昇して、線維形成が示唆され、この白濁したゲルは 37°Cで融解しない高強度なゲルとなった。37°Cでゲル化が完全に阻害された。

この線維形成のメカニズムを解明するため、線維形成成分を分離した。図 4a に非分解型ゼラチンを 30°Cで静置したゲルの走査型電子顕微鏡の観察像を示す。密な線維ネットワークはモノメリックなコラーゲンから形成された線維に類似した（図 4c）。比べて、4°Cで静置したゲルには線維構造がなかった（図 4b）。非分解型ゼラチンを 30°Cで静置したゲルのナノ線維を原子間力顕微鏡で観察した

(図 5a)。コラーゲン線維に特有な横紋構造 (図 5b) は非分解型ゼラチンの繊維では明瞭でなかった。

一定時間 30°C に静置したときの市販ゼラチンと非分解ゼラチンの CD スペクトルを図 6 に示す。非分解型ゼラチンでは、60 分以内に 221nm にピークが現れ、時間経過とともに上昇した (図 6b)。比べて、市販ゼラチンは 120 分経過しても CD スペクトルに変化はなかった (図 6a)。このように非分解型ゼラチンは市販ゼラチンに比べて 30°C でコラーゲン三重らせん構造を回復する能力を有した。

さらなる高強度化を目指して、線維形成成分を分離し、非分解型ゼラチンに含まれる線維非形成成分と線維形成成分のゲル化挙動を図 7 に示す。線維非形成成分はゲル化せず、線維形成成分は非分解型ゼラチンと比べて、30 分で急激に G' が上昇し、12 時間以降も G' の上昇が見込まれた。

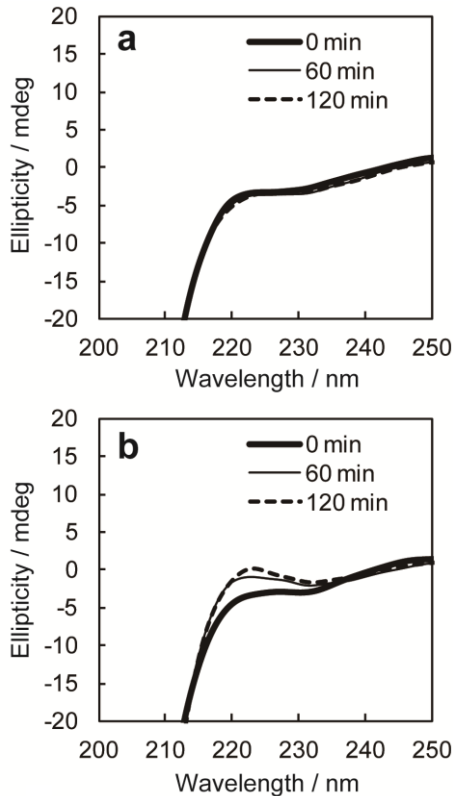


図 6 30°C に静置による市販ゼラチン (a) と非分解型ゼラチン (b) の CD スペクトル

非分解型ゼラチンと線維形成成分を同濃度で線維化させたゲルを比較すると、線維形成成分は白濁度が明らかに高かった。非分解型ゼラチンと線維形成成分の線維ゲルの弾性率を 30°C から 37°C に温度上昇させたときの弾性率の変化を図 8 に示す。非分解型ゼラチンは 15kPa から 2kPa に、線維形成成分は 20kPa から 12kPa に減少し、明らかに軟化が軽減した。線維形成成分の 37°C の線維ゲルは市販されるコラーゲン (Cellmatrix) の細胞包埋ゲルと比べて、顕著に高い強度となった。

(3) 硬さ制御した包埋培養法の検討
培養温度 (37°C) で高強度化するため、非

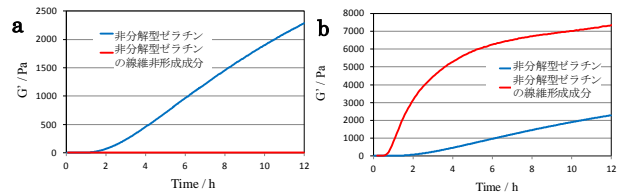


図 7 非分解型ゼラチン、線維非形成成分 (a) と線維形成成分 (b) のゲル化挙動の比較

分解型ゼラチン、培養液および細胞を 30°C で 12 時間静置させて線維化させたのち、37°C で包埋培養した。

非分解型ゼラチンと培養液を混合して、無細胞環境下で弾性率を測定し、同様の条件で

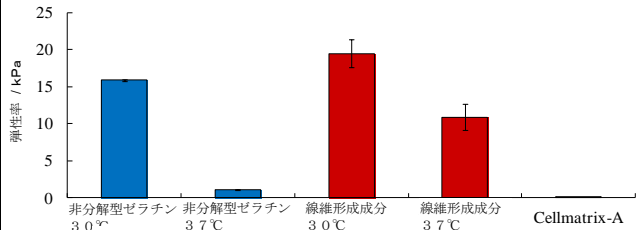


図 8 非分解型ゼラチンと線維非形成成分の 30°C 線維化直後と 37°C 静置後の弾性率

細胞を培養して生存率を測定した (表 1)。対照として、0.5% コラーゲンゲルを 1% コラーゲン溶液と培養液を等量混合して用意した。非分解型ゼラチンの弾性率はコラーゲンに比べて著しく高く、一般的に培養で用いられるコラーゲンゲル (0.38±0.08kPa) が脆弱であると示された。生存率は最も高い弾性率であった 8% 非分解型ゼラチン中でも低下しなかった。

表 1 ゲル包埋された細胞の生存率とゲルの弾性率

Gel substrate	Cell viability		Elastic modulus (kPa)	
	Collagen conc. (%)	1 day / 3 days (%)		
		(%)		(%)
UCG	8	92 ± 9	100 ¹⁾	4.82 ± 0.38
UCG	5	100 ¹⁾	100 ¹⁾	1.28 ± 0.15
Collagen	0.5	not tested	not tested	0.38 ± 0.08

1) No cells liberated from 5% UCG gels after 1 or 3 days' incubation were stained by trypan blue, indicating approximately 100% survival in this gel environment.

(4) 硬さと分化の相関関係の検討

非分解型ゼラチンを用いた間葉系幹細胞の軟骨分化誘導培養において、培養液の交換と培養期間 (転写因子の遺伝子発現で 3 日、基質産生で少なくとも 2 週間) を要する。しかしながら、非分解型ゼラチンでは長期安定性が乏しいことが分かった。

5% 非分解型ゼラチンを 30°C で 12 時間、線維化させたのち、37°C に温度上昇させたときのゲルの貯蔵弾性率を経時的に測定した (図 9)。30°C で 2 時間経過すると、貯蔵弾性率は 12 時間後まで上昇し続け、2kPa を超えた。しかしながら、37°C で急激に減少するが、その貯蔵弾性率は 0.3kPa まで減少した。3 日間線維化した非分解型ゼラチンの線維ゲルを、培地交換を想定して 37°C で PBS 洗浄したゲルで弾性率を測定した (図 10)。30°C で 3 日

間線維化したゲルと37°Cに1日静置させたゲルの弾性率も測定した。30°Cで弾性率は16kPaであったが、37°Cで2kPaに減少し、さらに洗浄後のゲルで1kPaに減少した。洗浄後のゲルはスラリー状態であり、培養に耐えるゲルの強度はなかった。

非分解型ゼラチンを用いて分化誘導培養を実施したが、軟化したゲルによる培養であったため、硬さによる転写因子の発現の顕著な差が認められなかった。

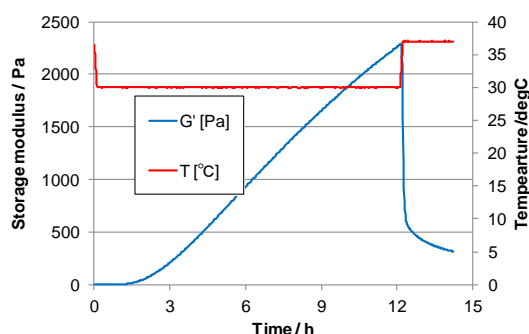


図9 30°Cでゲル化した非分解型ゼラチンの37°Cでの貯蔵弾性率の変化

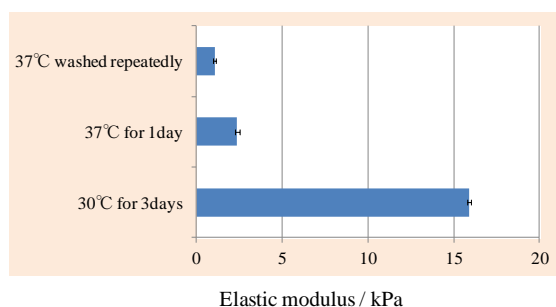


図10 非分解型ゼラチンの温度や洗浄による弾性率への影響

研究成果は次の3つである。成果①は非分解型ゼラチンを合成し、市販ゼラチンより融点が7°C高いゼラチンとなった。この非分解型ゼラチンは30°Cでコラーゲンらせん構造を回復することにより37°Cで安定な線維を形成することが明らかになり、線維形成メカニズムが解明できた。成果②は非分解型ゼラチンを用いた高強度コラーゲン線維ゲルが細胞の生存率に影響しないことを実証し、高強度コラーゲン様線維マトリックスの細胞移植に十分な機能を有することが明らかになった。成果③は非分解型ゼラチンには特定の線維形成成分があり、その成分の単離で作製したゲルは37°Cで強度低下を低減した長期安定な線維ゲルを作製することができた。

現状、長期安定な高強度コラーゲン線維の原料はアテロコラーゲンであり、非分解型ゼラチンにすると10%しか含まれていない線維形成成分を単離して得られるゼラチン溶液であるため、コストが高くなると予想される。したがって、製品化には線維形成成分の構造を明らかにして、線維形成成分の割合の高いコラーゲンの製造を検討する必要があると考えられる。

<引用文献>

1. Ohyabu Y, Kida N, Kojima H, Taguchi T,

Tanaka J, Uemura T. Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2006. 95(5):1003-8.

2. Sharona Even-Ram, Vira Artym, Kenneth M. Yamada, Matrix Control of Stem Cell Fate. *Cell.* 2006. 126,(4). pp645-7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

①Ohyabu Y, Hatayama H, Yunoki S., Evaluation of gelatin hydrogel as a potential carrier for cell transportation. *J Biosci. Bioeng.* 査読有、2014 118(1).pp112-5

doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.005.

②Ohyabu Y, Yunoki S, Hatayama H, Teranishi Y., Fabrication of high-density collagen fibril matrix gels by renaturation of triple-helix collagen from gelatin. *Int J Biol Macromol.* 査読有、2013. 62. pp296-303

doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.001.

〔学会発表〕(計 6件)

①畑山 博哉、大藪 淑美、柚木 俊二、細胞搬送に利用可能な高融点ゼラチンの開発、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、仙台

②柚木 俊二、畑山 博哉、大藪 淑美、ゼラチンの3重らせん回復現象による高密度コラーゲン線維マトリックスの作成、第62回高分子討論会、2013、金沢

③畑山 博哉、大藪 淑美、柚木 俊二、施設間細胞輸送用キャリアとしてのゼラチンハイドロゲルの可能性、第62回高分子討論会、2013、金沢

④Hatayama H, Ohyabu Y, Yunoki S. Evaluation of uncleaved gelatin as a potential carrier for cell transportation. *TERMIS-AP2013, Shanghai*

⑤Yunoki S, Hatayama H, Ohyabu Y, Preparation of high-density collagen matrix via renaturation of collagen. *TERMIS-AP2013, Shanghai*

⑥大藪 淑美、畑山 博哉、柚木 俊二、高いゲル化温度を有するゼラチンを用いた細胞輸送用ゲルマトリックスの開発、第13回日本再生医療学会総会、2014、京都

〔図書〕(計 1件)

柚木 俊二、大藪 淑美、技術情報協会、《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、2914、90

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：高融点ゼラチン組成物、その製造方法、およびその用途

発明者：大藪 淑美 他

権利者：地方独立法人東京都立産業技術研究

センター

種類：特許

番号：特願2012-255357

出願年月日：24年11月21日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大藪淑美 (OHYABU Yoshimi)

東京都立産業技術研究センター

開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ

副主任研究員

研究者番号: 80587410