

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300173

研究課題名(和文) 分化フラストレーション誘導基材を用いた幹細胞の未分化維持大量培養技術の開発

研究課題名(英文) Maintenance and amplification of stem cells using the well-designed biomaterials to induce frustrated differentiation

研究代表者

木戸秋 悟 (KIDOAKI, Satoru)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号：10336018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療においては幹細胞の安定大量供給が必要不可欠であるが、幹細胞は培養中に望まぬ表現型や系統への変質・分化を起こしやすく、幹細胞性を安定に保持しつつ大量に増殖させる技術の拡充が強く求められている。本研究はこの課題に応えるため、幹細胞の分化フラストレーションを誘導する微視的培養力学場のパターンニングに基づく新規の培養基材の構築を目的とする。幹細胞の分化フラストレーションとは、細胞サイズ以下の微視的な不均一弾性分布を有する培養基材上で幹細胞の系統決定が抑制される現象であり、我々が独自に見出した現象である。本研究ではこの現象の幹細胞操作材料構築への応用とそのメカニズム理解のための基礎研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Stable supply of enough numbers of stem cells are essential demand for effective regenerative medicine. However, stem cells tend to be deteriorated and differentiated into undesired lineages during culture on the conventional cell culture dishes. To maintenance its stemness with high quality and to stably amplify them, development of optimal culture technology and culture substrate or matrix are strongly required. To meet this requirement, this study focuses on construction of novel cell culture hydrogel to induce frustrated differentiation of stem cells based on the precise design of micromechanical field and elasticity patterning. Frustrated differentiation, which we had originally found before, is the phenomenon that the lineage specification of stem cells is inhibited on the microelastically-patterned hydrogels with subcellular-sized heteroritic distribution of elasticity. In this study, application of the phenomenon for stem cell manipulation and its mechanism were investigated.

研究分野：医用生物物理工学

キーワード：幹細胞 メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

病気や怪我等により自己治癒不能な状態に陥った組織や臓器の再生・置換・代替による治療を目的とする再生医療において、様々な組織の細胞へと分化し得る幹細胞の利用はその主要な方法論の一角をなしている。その取り組みにおいては、種々の幹細胞の安定大量供給が必要不可欠であるが、幹細胞は保存培養中や増殖操作の過程で、望まぬ表現型や系統への変質・分化を起しやすく、幹細胞性を長期間安定に保持しつつ大量に増殖させる技術の拡充が強く求められている。この課題に関連し、研究代表者は独自技術として、幹細胞の分化フラストレーションを誘導する微視的培養力学場の勾配材料・パターンニング材料を予備的に開発していた。この技術と材料をさらに確立できれば、間葉系幹細胞や iPS 細胞の大量増殖、安定供給を可能とする培養操作技術の拡充につながるものが期待されていた。幹細胞の分化フラストレーションとは、細胞サイズ以下の微視的な不均一弾性分布を有する培養基材上で、幹細胞の系統決定が抑制される現象であり、研究代表者が独自に見いだしていた現象である。

2. 研究の目的

再生医療において幹細胞を適切に利用するためには、患者から採取した幹細胞を未分化状態に維持したまま大量に増やしたのち、必要な種類の細胞へ分化させる必要がある。治療に必要な細胞を得る前の段階で、扱っている幹細胞が他の望まぬ種類の細胞へ分化してしまうと有効な治療は行えない。一方、幹細胞は特別な注意の下で扱わなければ容易に自発分化し、その幹細胞性を劣化させる。幹細胞の品質をよく保持した培養技術の確立・拡充は再生医療の促進に対する重要基盤の一つである。

従来、幹細胞の未分化保持培養は主として、分化抑制のための液性因子を培養液に添加することで行われる。このとき幹細胞は通常のプラスチックシャーレやマトリゲルなどに接着させて培養するのだが、幹細胞の接着培養に関して、培養基材の力学的特性が幹細胞性の変調・制御に重要な影響を与えるとの報告が近年相次いでいる。例えば、間葉系幹細胞 (MSC) は培養基板の硬さに依存した分化系統決定を示し、かつその硬さを経験する時間の長さや履歴を記憶する。また MSC はごく軟らかいゲル上で培養すると休眠状態となり増殖は停止するが、幹細胞性の保持に有効である。これらの知見から、従来汎用されている単純なプラスチックディッシュ上での幹細胞培養は、幹細胞を望まぬ種類の細胞へと変容させやすく、品質劣化を招きがちであるにも拘らず、その系統的な調査と最適な培養基材表面設計に関する定義はなされていない。いかなる培養基材が幹細胞を高品質に保持した培養に必要なか、現状の再生医療においては未確立である。

この課題に対して、当研究室では幹細胞の未分化維持・増殖の原理として、『幹細胞分化フラストレーション』仮説を独自に提唱し、その誘導のための基材設計と現象の実証に取り組んできた (図 1)、『幹細胞分化フラストレーション』とは、培養中の幹細胞に運動の過程で基材弾性率によるメカノシグナルの振動的入力を強制するときに現れると期待される未分化維持培養モードを指す。これまでに異なる細胞種への分化を誘導する硬領域と軟領域を交互に配置した弾性ストライプパターンゲル上で MSC の未分化保持培養に成功している。

すなわち、硬・軟領域を微細パターン化したゲル上で、成体幹細胞の一種である間葉系幹細胞 (MSC) を培養したところ、MSC は基材上の硬・軟いずれへの領域へも定住しない運動モードを示した。そのような状態で 1 週間培養した後に MSC の幹細胞性を評価したところ、MSC の各種幹細胞マーカーの発現および分化マーカーの発現抑制、脂肪・軟骨・骨の三方向分化能を維持していることがわかった (図 2)。MSC は培養床の弾性率に依存して異なる細胞種へ分化することが報告されており、もし硬・軟領域のいずれかに一定時間以上定住すると、特定の系統への分化方向の決定が起こるが、以上の観察は硬・軟領域をランダムあるいは周期的に経験させると MSC の系統決定はブロックされると考えられ、幹細胞の未分化能維持マトリックスとしての機能が発現する可能性を示している。申請者はこのような培養モードを幹細胞の“分化フラストレーション”と呼んでいる。

本研究課題では、この分化フラストレーション現象のさらに系統的な制御と、幹細胞の未分化維持材料としての応用の拡大を目的として、次の三課題に取り組んだ。(1) マイクロ弾性パターンニング基材による幹細胞の一定弾性領域非定住運動の系統的制御、(2) 幹細胞の分化フラストレーションの分子メカニズムの検証、(3) 幹細胞未分化能保持・大量増殖マトリックスの構築。

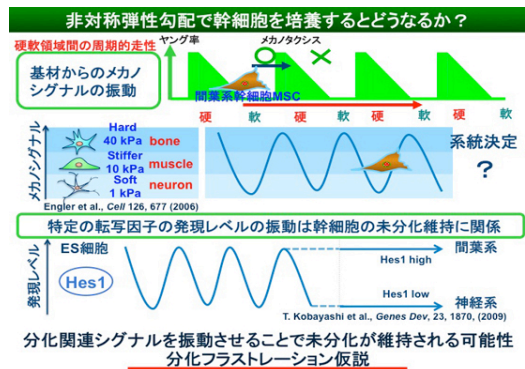


図1. 非対称周期的培養力学場で運動する幹細胞への周期性振動メカノシグナルの入力がもたらす、幹細胞の分化フラストレーション

3. 研究の方法

本課題では、細胞培養弾性材料の微視的力学場の精密設計技術に基づいた新しい幹細胞操作のための新技術と材料の確立を目的とする。具体的には、独自に確立しているマイクロ位置制御・縮小投影式光リソグラフィ弾性パターンニングにより細胞接着性ゲルの微視的弾性率分布を精密設計し、そのマイクロパターン化弾性基材を用いて間葉系幹細胞 (MSC) の運動を制御し、運動に伴う分化応答の系統的評価を行う。上述の三課題について研究を実施した。

(1) マイクロ弾性パターンニング基材による幹細胞の一定弾性領域非定住運動の系統的制御

研究代表者の独自技術であるマイクロ弾性勾配ゲルの微分弾性勾配および多段勾配の精密設計法を応用して、細胞運動の方向性・速度の制御条件の基材表面の弾性特性依存性を系統的に把握する。ファイマンラチェット型非対称弾性勾配ゲルを初め、ストライプ型パターンニングゲル等の作製条件を確立する。設計要因として、不連続弾性ジャンプ幅、弾性率の緩慢減衰幅、ユニットパターンのサイズ、間隔、および弾性境界の曲率・形状などの最適化を系統的に検討し、幹細胞の一定弾性領域への非定住運動モードを安定に誘導するマイクロ弾性パターンニングゲルの設計条件を確立する。

(2) 幹細胞の分化フラストレーションの精密評価および分子メカニズムの検証

マイクロ弾性パターンニングゲルによって誘導される幹細胞の一定弾性領域非定住運動が誘導する分化フラストレーション現象のより精密な分子生物学的根拠の探求に取り組む。まず未分化性の保持に直接関与するところのメカノシグナルの振動を、牽引力顕微鏡解析を用いて実証する。また幹細胞の未分化マーカー、分化マーカーの免疫蛍光顕微鏡解析、遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析を実施し、幹細胞の分化フラストレーション状態の基礎的確認を行うとともに、パターンの最適化を進める。

(3) 幹細胞未分化能保持・大量増殖マトリックスの構築

幹細胞の分化フラストレーションを誘導するマイクロ弾性パターンニングゲルの最適条件を踏まえて、これを実際の製品として実用用途に供し得る材料成形を想定し、未分化能を保持したままで幹細胞を大量に増殖させるためのゲルのスケールの拡大化、および三次元化への展開を検討する。

4. 研究成果

(1) マイクロ弾性パターンニング基材による幹細胞の一定弾性領域非定住運動の系統的制御

異なるユニット幅 (300 μm , 100 μm) にて作製した弾性ストライプパターンゲル上で hMSC を培養し細胞運動を解析することで、

硬軟非定住運動を誘導しうる最適パターン幅について検討を行った。得られたゲル上での細胞運動軌跡を図2に示す。300 μm 幅のゲルでは軟領域から硬領域へ運動する細胞、硬領域から軟領域に運動した後、すぐに硬領域へと戻る細胞が見られた。このことからメカノタクシスが誘起されていると判断した。硬領域の幅が 150 μm と広いため、硬領域に一度移動した細胞は長時間硬領域に滞在することとなり、結果として硬領域への滞在時間が軟領域へ滞在時間の約3倍となった。100 μm ゲルでは細胞運動に異方性は見られず等方的であった。これは、メカノタクシスにより細胞が軟領域から硬領域へと運動したものの、硬領域の幅が 50 μm と狭いので十分に伸展することができず、細胞本来のランダム運動により軟領域へと回帰したためだと考えられる。そして全体で見ると異方性のない運動軌跡になったと考えられる。100 μm 幅ゲルでは細胞は弾性率境界を数回またいでおり、各弾性率領域を経験している。また各弾性率領域への滞在時間は約 12 時間と均等に近い値を示した。以上より 100 μm 幅ゲルが、hMSC の非定住運動に最適と決定された。

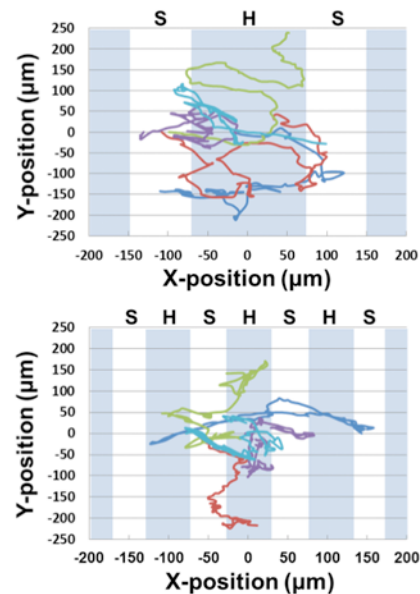


図2. 弾性ストライプパターンニングゲル上での hMSC の細胞運動軌跡. 上: 1unit=300 μm , 下: 1unit=100 μm

(2) 幹細胞の分化フラストレーションの精密評価および分子メカニズムの検証

幹細胞分化フラストレーション現象の直接の根拠となる細胞内メカノシグナルの振動を実測するため、表面に蛍光ビーズを埋め込んだ弾性率可変培養基材で細胞を培養し、このときの細胞骨格収縮力による培養基材の局所変位を顕微鏡的に実測することで牽引力の経時変化を解析、これをメカノシグナルとして検出した。

15/80 kPa弾性ストライプパターンゲル上でのタイムラプス観察により、MSCがsoft bandからhard bandへ侵入した後に、再びsoft bandへと遊走した観察画像が得られた。次に

このときの蛍光ビーズ画像をプログラムで処理を行った結果、弾性ストライプパターンゲル上でのMSCの牽引力を算出する事に成功した(図3)。コントロールとなる10 kPaと60 kPaの弾性率均一ゲルを用いて同様の解析を行ったところ、弾性率均一ゲル上ではMSCは常に一定のレベルで牽引力を生じさせており、その最頻値は10 kPaゲル上では0 ~ ±0.5 kPa、60 kPaゲル上では ±1.5 ~ ±2.0 kPaであった。これはMSCが弾性率依存的に牽引力の大きさを変化させたことを示唆している。その一方で、15/80 kPa弾性ストライプパターンゲル上ではMSCはhard bandでは-2.5 ~ -3.0 kPaに牽引力値のピークがあったが、soft bandではこのピークが消失し、0 ~ ±0.5 kPaの値を中心とした牽引力値となり、また最大牽引力値の低下が観察された(図4)。このようなMSCの遊走に伴う細胞牽引力の変化を検出したことから、本解析によって弾性ストライプパターンゲル上では基材から細胞へ入力されるメカノシグナルが振動することを実証した。

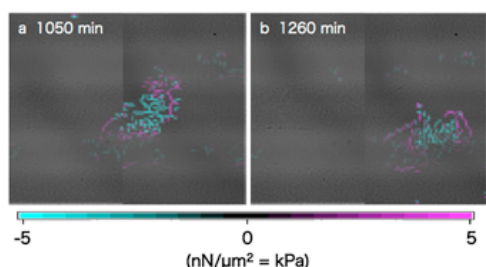


図3. 15/80kPa ストライプパターンゲル上で非定住運動を示す MSC の牽引カダイナミクス

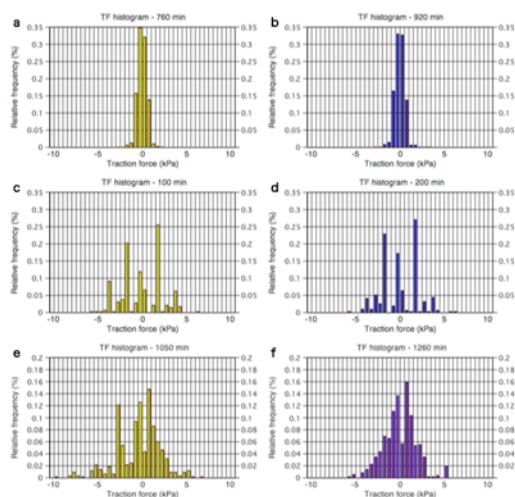


図4. (a, b) 10, (c, d) 60, (e, f) 15/80 kPa ゲル上の MSC が示す牽引力分布

分化フラストレート幹細胞の特性解析として、RT-PCRによりMSCの遺伝子発現解析を行った。弾性率均一ゲル上と比較して、弾性ストライプパターンゲル上ではMSCの遺伝子発現がどのように変化しているのかを調査した。骨分化マーカーであるALP, COL1, Id1, BMP6について遺伝子発現解析を行った。弾性率均一ゲルである10 kPaと60 kPaの条件では、controlと同様により硬い60 kPaのゲルにおいてMSCの骨分化マーカーの発現量が亢進し

ているがその一方で、10/50 kPa弾性ストライプパターンゲル上ではMSCの骨分化マーカーの発現量が60 kPaの条件と比較して全て抑制されていた(図5)。この結果は弾性ストライプパターンゲルというヘテロな弾性場においてはMSCの骨への分化系統の偏向が抑制されたことを示唆している。

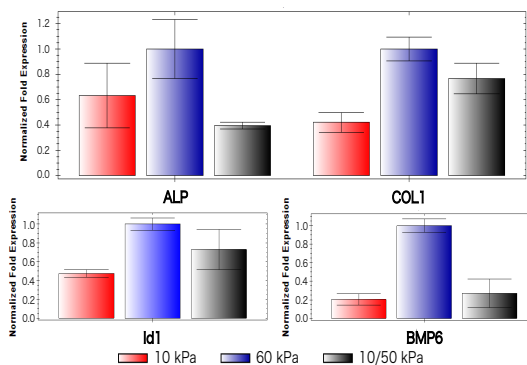


図5. 10, 60, 10/50kPa ゲル上における MSC の骨系統遺伝子発現の PCR 解析

以上の弾性率均一ゲル上での結果から、弾性ストライプパターンゲル上でのMSCの挙動を予測した。MSCがsoft bandに接着しているとき、牽引力は小さく、細胞骨格は未発達な状態であり、脂肪分化に関する遺伝子が優位的となる。その一方で、MSCがhard bandに接着しているとき、牽引力は大きく、細胞骨格が発達した状態となり骨分化に関する遺伝子発現が優位的となる。このとき、soft bandにおいて脂肪分化/hard bandにおいて骨分化のタンパク質発現ネットワークが完成する前にMSCがhard band/soft bandへ遊走することで各遺伝子発現の優位性が切り替わっていくことで、一定方向へのMSCの分化が抑えられるものと予測された。このようなメカニカルシグナルの振動が分化状態の決定を抑制する状況を遺伝子発現において確認することができ、分化フラストレート現象のメカニズムの一端を解明できたものと考えられる。

(3) 幹細胞未分化能保持・大量増殖マトリックスの構築

上述のような分化フラストレーションを誘導するストライプ型弾性マイクロパターンゲルは、光リソグラフィの手法により作製してきた。パターンニングの精度を確保するために縮小投影方式によりパターン画像をゾル試料に集光して照射するため、作製されるゲルの面積はあまり大きくできず、未分化保持されたMSCを大量に調製することが難しかった。この課題に対して、本研究ではパターンニングゲルを作製する際の試料台をPC自動制御のプログラムXYステージにより操作し、高精細設計された弾性パターンニングゲルを多数並べて作製することを検討した。XYステージを用いてゾルの異なる領域に同じパターンニングゲルを複製していく技術であるが、この際にパターンとパターンの間に一定のクリアランスが生じるため、この領域を細胞非接着

とするようポリエチレングリコールを表面化学固定した基材上にゼラチンの弾性パターンニングゲルを配置するプロトコルを確立し、パターンニングゲルの大面積化を達成した。

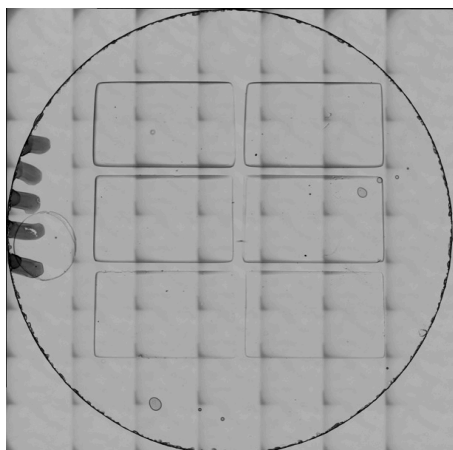


図6. ストライプ弾性パターンニングゲルのプログラム方式による複製大面積化

間葉系幹細胞は最も臨床应用到に近い幹細胞であり、その品質保持培養のための材料設計に対して本研究で実証した新たな原理とは、再生医療のための重要な基盤に貢献するものと期待される。

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8件)

1. Ayaka Ueki, Satoru Kidoaki, Manipulation of cell mechanotaxis by designing curvature of the elasticity boundary on hydrogel matrix, *Biomaterials*, 41, 45-52, 2015. 査読有, DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.11.030
2. Naohiko Shimada, Satoru Kidoaki, Atsushi Maruyama, Smart hydrogels exhibiting UCST-type volume changes under physiologically relevant conditions, *RSC Advances*, 4, 52346, 2014. 査読有, DOI: 10.1039/c4ra10612a
3. Thasaneeya Kuboki, Wei Chen, Satoru Kidoaki, Time-dependent migratory behaviors in the long-term studies of fibroblast durotaxis on a hydrogel substrate fabricated with a soft band, *Langmuir*, 30, 6187-6196, 2014. 査読有, dx.doi.org/10.1021/la501058j
4. 木戸秋 悟 メカノバイオマテリアル: 細胞のメカノバイオリジーを操作する材料, 32-36, 日本機械学会誌, 2014. 査読無
5. Hiroyuki Sakashita, Satoru Kidoaki, Rectified cell migration on saw-like micro-elastically patterned hydrogels with asymmetric gradient ratchet teeth, *PLOS One*, 8, 10, e78067, 2013. 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0078067

6. Hiroshi Yoshikawa, Takahito Kawano, Takehisa Matsuda, Satoru Kidoaki, Motomu Tanaka, Morphology and adhesion strength of myoblast cells on photocurable gelatin under native and non-native micromechanical environments, *J. Phys. Chem. Part B*, 117, 4081-4088, 2013. 査読有, DOI: DOI: 10.1021/jp4008224
7. T. Kuboki, F. Kantawong, R. Burchmore, M.J. Dalby, and S. Kidoaki, 2D-DIGE proteomic analysis of mesenchymal stem cell cultured on the elasticity-tunable hydrogels, *Cell Structure and Function*, 37, 127-139, 2012. 査読有
8. M. Horning, S. Kidoaki, T. Kawano, K. Yoshikawa, Rigidity-matching between cells and the extracellular matrix leads to the stabilization of cardiac conduction, *Biophys. J.*, 102, 379-387, 2012. 査読有

[学会発表] (計18件)

1. 濱野 浩佑, 木戸秋 悟. 間葉系幹細胞における基材牽引力と分化マーカー発現の定量的相関解析, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 2014年11月17日
2. 木戸秋 悟, 陣内 秀平, 内海 彩香. 幹細胞操作メカノバイオマテリアル, 第63回高分子討論会, 2014年09月24日
3. 木戸秋 悟. 幹細胞分化フラストレーション培養技術の開発, 九州大学生体材料・力学研究会, 2014年08月22日
4. Wei Chen, Thasaneeya Kuboki, Satoru Kidoaki. Time-dependent migratory behaviors in the long-term studies of fibroblast durotaxis on a hydrogel substrate fabricated with a soft band, 248th ACS National Meeting, 2014年08月11日
5. Satoru Kidoaki. Mechanobio-Materials Manipulating Cell Motility and Functions, NIMS Conference 2014, 2014年07月02日
6. Thasaneeya Kuboki, Satoru Kidoaki. Time-dependent migratory behaviors in the long-term studies of fibroblast durotaxis on a hydrogel substrate fabricated with a soft band, International Society for Mechanobiology 2014, 2014年05月23日
7. Satoru Kidoaki. Mechaobio-materials manipulating cell motility and functions, International Society for Mechanobiology 2014, 2014年05月23日
8. 木戸秋 悟. 細胞操作メカノバイオマテリアル~細胞メカノバイオリジーを操作するバイオマテリアル~, メカノセンシング研究会, 2014年03月18日

9. Satoru Kidoaki*. Mechanobio-Materials Manipulating Cell Motility and Functions, Joint international symposium on "Nature-inspired Technology (ISNIT) 2014" and "Engineering Neo-biomimetics V", 2014年02月14日
10. Satoru Kidoaki*. "Mechanobio-Materials": Design of Elastically-Micropatterned Gels To Control Cell Mechanotaxis And Motility-Related Functions, The 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013年12月05日
11. 浜野浩佑, 木戸秋 悟. 大面積弾性マイクロパターンニングゲルを用いた間葉系幹細胞の分化フラストレーションの誘導と評価, 第51回生物物理学会, 2013年10月29日
12. Satoru Kidoaki*. Frustrated differentiation of mesenchymal stem cell cultured on microelastically-patterned photocurable gelatinous gels, The 7th World Congress on Biomimetics, Artificial Muscles and Nano-Bio (BAMN2013), 2013年08月28日
13. Thasaneeya Kuboki, Wei Chen, Satoru Kidoaki*. Controlling mechano-repellent cell migration induced by a micro-scale soft band on a hydrogel matrix, Sydney International Nanomedicine Conference, 2013年07月02日
14. 木戸秋 悟. 細胞操作メカノバイオマテリアル, 第17回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム, 2013年06月06日
15. 木戸秋 悟. 細胞運動・機能を操作するナノ・マイクロメカニカルシステムの構築, 電子科学研究所学術講演会, 2013年03月11日
16. Satoru Kidoaki, Takahito Kawano, Hiroyuki Sakashita. "Mechanobio-Materials": Design of Elastically-Micropatterned Gels To Control Cell Mechanotaxis and Motility-Related Functions, IEEE-NMDC2012, 2012年10月16日
17. Satoru Kidoaki, Syuhei Jinnouchi. Frustrated Differentiation of Mesenchymal Stem Cell Cultured on Microelastically-Patterned Photocurable Gelatinous Gels, The 2012 International Conference on Flexible and Printed Electronics, 2012年09月06日
18. 木戸秋 悟. 微視的培養力学場設計に基づく幹細胞分化フラストレーションの誘

導, 第51回日本生体医工学会大会, 2012年05月10日

[図書] (計1件)

Satoru Kidoaki. "Mechanobio-materials: Design of elastically-micropatterned hydrogels to manipulate cell mechanotaxis and motility-coupled functions" in "Recent Advances in Mechanobiology", The Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House, 2012年11月

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 人工多能性幹細胞の培養方法及び培養材料

発明者: 木戸秋 悟、内海彩香、江藤浩之
権利者: 国立大学法人九州大学、国立大学法人京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-39524

出願年月日: 2014年02月

国内外の別: 国内

名称: 未分化性維持培養材料

発明者: 木戸秋 悟、辻 ゆきえ、林寿人、岩間武久、堀川雅人

権利者: 国立大学法人九州大学、日産化学工業株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2014-10593

出願年月日: 2014年01月

国内外の別: 国内/国際

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/mbbmc_imce_new/introduce/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸秋 悟 (KIDOAKI, Satoru)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号: 10336018

(2) 連携研究者

久保木 タッサニーヤ (KUBOKI, Thasaneeyaa)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号: 20526834