

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350515

研究課題名(和文)再生心筋組織構築のための蛍光タンパク質を用いた評価系の確立

研究課題名(英文)Studies on the evaluation system using fluorescence proteins for the regeneration of myocardium.

研究代表者

神澤 信行(KANZAWA, Nobuyuki)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：40286761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は三次元的に細胞を培養できるapatite-fiber scaffold (AFS)を用いて心筋細胞を培養している。本研究では三次元環境下での心筋の機能を評価するため、カルシウム濃度に依存して蛍光強度が変化するGCaMP5Gベクターを心筋特異的に発現させることを試みた。使用したコンストラクトはdish上で培養した心筋様細胞P19.CL6の拍動と同期して蛍光強度が変化した。AFS内で培養した細胞について、遺伝子発現等で心筋への分化が促進されることが確認できたが、蛍光強度の変化は見られていない。三次元環境では多様な細胞分化が同時並行で起こることが予想され、今後詳細な解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that apatite-fiber scaffold (AFS) is applicable for soft-tissue engineering. In this study, we cultured an embryonal carcinoma cell line, P19.CL6, in AFS to demonstrate the utility of this approach for providing a substitute for cardiac tissue. Furthermore, we introduced a GCaMP5G expression vector into the cells, for the real-time evaluation of the functional maturation of cardiac tissue. GCaMP5G includes green fluorescent protein (GFP) and calcium-binding domains, and is used as GFP-based calcium indicator. Changes in the fluorescence intensity, which synchronized with the spontaneous beating of the differentiated P19.CL6 cells, were observed. We also examined the cell differentiation after cell culturing in AFS. Markers for cardiac cell differentiation were detected by RT-PCR and real-time PCR; however, no change in fluorescence intensity was observed. It may be due to the complicated cell differentiation in three-dimensional AFS.

研究分野：生物化学

キーワード：心筋 蛍光タンパク質 拍動 足場材料 アパタイト

1. 研究開始当初の背景

組織再生に関する研究は日進月歩である。*In vitro*、つまりシャーレの中で培養されていた細胞は、私たちの体を作る細胞とは似て非なる存在であり、研究の対象ではあるものの、私たちの組織再生に利用されるのはずいぶん先の事と考えられていた。この状況を一変させたのは胚性幹細胞(ES cells)の発見であり、それに続く iPS cells 技術の確立であることは疑いようがない。これら幹細胞から心筋細胞をはじめ、各種の細胞系や組織が作り出されつつあることは報道等でも頻繁に取り上げられ、馴染みある話となっている。しかし、実際には細胞と組織の間にはもう一段の壁がある。細胞が組織再生に使われるようになった初期には、多能性細胞を再生させたい部位に単に注入し、組織自体の再生能力に成否を依存していた(第一世代)。そのため、期待できる再生は極めて限定的であった。その後は細胞シート技術²⁾を代表として、*in vitro* で組織の基となる組織原基を作り、高効率で組織再生を促す手法が試みられている(第二世代)。そして現在では、細胞の方向性を制御したものや、事前に複合組織化させたものなど、より高機能化させた代替組織の構築が試みられている(第三世代)¹⁾。

時々刻々発展し、即時性が求められるこの分野において、我々は、足場材料と幹細胞から心筋代替組織を作製することを最終目的とし、本研究では効率的に細胞や基材の機能性を評価できる系の開発を目的としている。

2. 研究の目的

我々は、明治大学の相澤守教授らと協力し、繊維状のアパタイトを足場材料(Apatite-fiber scaffold; AFS)として、骨代替組織の再生に関する研究を行ってきた。AFSはその構造的な特徴から、足場全体に細胞を均等分布(播種)させることが出来る。この性質は他の三次元生体材料では見られないもので、均一な組織再生や、複数細胞を導入した複合組織の再生にも有用であると考えている。今回の研究では、主に以下の二点について明らかにすることを目的とした。

- (1) 蛍光タンパク質の発現と、カルシウム依存的に明滅する蛍光を指標として、心筋の機能性を簡便に評価できる系を作製する
- (2) 実際に作製した系を用いて AFS および(β -TCP-fiber scaffold, TFS)の有用性を評価する

3. 研究の方法

(1) 心筋の機能性を評価するため、心筋特異的に蛍光タンパク質を発現する系の確立

蛍光タンパク質として GCaMP5G を用いた³⁾。GCaMP5G は EGFP の配列の途中にカルシウム結合部位を挿入した構造をしており、細胞内にカルシウムがある場合には EGFP としての蛍光を発し、カルシウムが無くなれば消光

する。つまりカルシウム濃度に依存して EGFP の蛍光が明滅するのが特徴である。今回、Addgene より購入した GCaMP5G のプロモーター領域を mouse *Tnnt2* プロモーター領域と交換した。*Tnnt2* は心筋特異的に発現する troponin をコードする遺伝子であり、そのプロモーターを使用することで、目的遺伝子を心筋特異的に発現する設計とした。さらに作製後のベクターで P19.CL6 細胞を一過的に形質転換し、発現および機能を評価した。安定導入とクローン単離に取り組み、AFS 内で培養した細胞についてもその機能を評価した。

(2) AFS および TFS の作製と評価

AFS は繊維状のアパタイトから創られていることから、溶解性は極めて低く、安定な足場材料として、細胞の機能性評価に必要な素材となる(図 1)。また、治療薬等のスクリーニングを前提としたデバイス開発には適材となる。その作製方法は確立し、性状についても多くが調べられている。一方 TFS も相澤博士らにより開発されたもので、繊維状の β -TCP からできていることから速やかに溶解し、組織再生においては適材となる。しかし、溶解性とのトレードで、繊維はもろく、足場材料としては力学的強度が不足する。本研究では、両方の性質をうまく使いながら、それぞれの材料としての特性評価を上記細胞を用いて実施した。

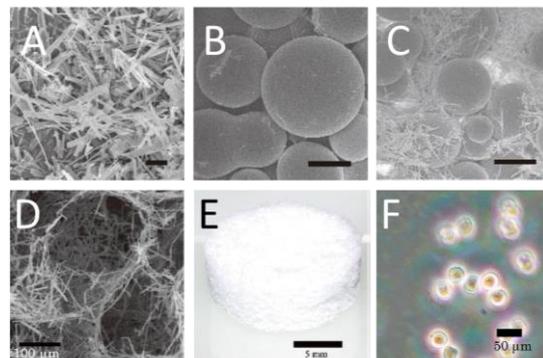


図 1. AFS の構造と P19.CL6 細胞
AFS を作製する際の各段階の観察像を示した。A, デカルシウム化後の apatite-fiber の SEM 像、B, AFS 内部の形状を決める carbon beads の SEM 像、C, Apatite-fiber と carbon beads を混合した成形体の SEM 像、D, 焼結後の AFS の SEM 像、E, ϕ 15 mm の AFS の外観、F; P19.CL6 細胞の浮遊時の形態。

4. 研究成果

(1)-1 ベクターの作製

マウス胚性腫瘍細胞 P19.CL6 を 10-cm dish で培養し、培養後の細胞から単離した genome DNA を template として PCR により、マウスの troponin type 2 (*Tnnt 2*) promoter を増幅した。この時、*Tnnt 2* promoter は *Tnnt 2* のタンパク質コード領域から上流の遺伝子である *Lad 1* までの 3 kbp と、既知の rat *Tnnt 2* プロモーター領域(497 bp)と相同性の高い領域を標的とした。PCR によって増幅された目

的遺伝子は pGEM-T Easy vector に TA cloning し、その後 GCaMP5G ベクターに組み入れた。上記の結果として、pTnnt2(3 kbp)::GCaMP5G, pTnnt2(497 bp)::GCaMP5G の計 2 種類のコストラクトを作製した。2 種類のコストラクトを P19.CL6 細胞に導入し、蛍光強度や拍動に違いが見られなかったため、pTnnt2(497 bp)::GCaMP5G を以後の実験では使用している。

(1)-2 一過的発現と機能評価

pTnnt2::GCaMP5G を用いて、リポフェクション法により P19.CL6 細胞を一過的に形質転換した。続けて G418 によって 3 日間選抜し、継代の際に浮遊培養に切り替えた。DMSO を含む培地で 4 日間の浮遊培養後、静置培養に切り替え、さらに通常培地で 8 日培養後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した。静置培養に移行する時期から、凝集体には赤い自家蛍光が見られるようになり、凝集体周辺では EGFP の緑色蛍光が見られるようになった(図 2)。

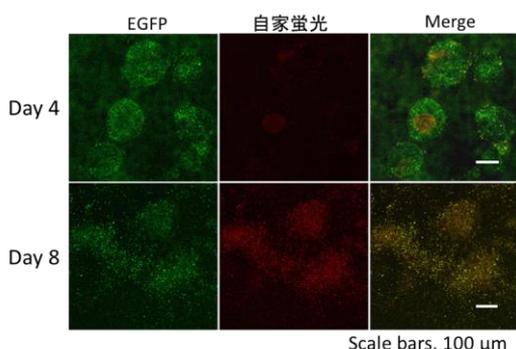


図 2. P19.CL6 細胞への一過的遺伝子発現
浮遊培養から静置培養に移行する時期(Day4)から細胞内には緑色の蛍光が見られるようになる。細胞の凝集に伴う赤い自家蛍光とは区別できるようになる。

さらに、細胞が拍動するようになると(Day12)、一部の細胞で緑色蛍光が明滅する様子が観察された(図 3)。

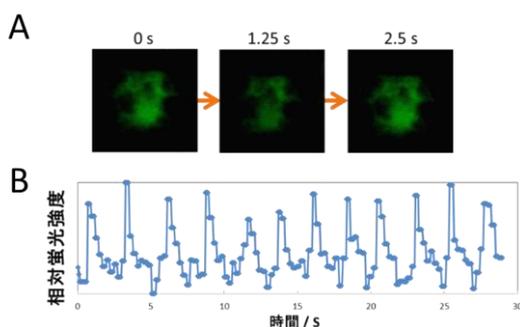


図 3. 拍動する P19.CL6 細胞
A, 蛍光顕微鏡で観察した細胞の明滅の様子を時系列順に示した。B, Image J により解析した相対蛍光強度である。心筋細胞の収縮と同調する蛍光強度変化を確認した。

(1)-3 安定導入株の樹立

上記のとおり、作製したベクターが一過的導入で機能発現することが確認できたため、

同じベクターを用いて P19.CL6 細胞を形質転換し、選抜用の抗生剤である G418 存在下、限界希釈法により安定導入株の単離を試みた。単離されたクローンの多くは、内生の *Tnnt2* 上流付近に遺伝子が挿入されたものや、継代を重ねたことにより、拍動性を失ったもので、今回の実験では 3 世代目までスクリーニングを実施した細胞で以下の実験を行った。

(1)-4 Connexin 43(Cx43)の局在

購入した Cx43 抗体の特異性を調べるため、細胞全抽出物に対して western blot を行った。期待される 43 kDa 付近には 2 本のバンドが検出された(図 4A)。下のバンドに対して上のバンドはリン酸化されたバンドであると考えられる。Cx43 は心筋細胞間でみられるギャップ結合を形成し、心筋の拍動刺激を隣接する細胞に伝える役割を担っている。この抗体を用いて免疫染色を行った(図 4B)。拍動が開始される以前には細胞質内にぼんやりした蛍光が観察されるのみで特別な局在化は見られなかった。しかし、拍動が開始される 12 日目以降は、細胞膜上、細胞の隣接する部分に明らかな局在化が観察された。膜上にパッチ上、または数珠を並べたような不均一な局在が見られた。この局在はその後の培養でも失わせることはなかった。

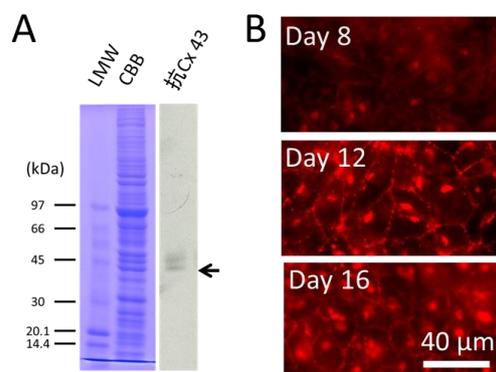


図 4. P19.CL6 細胞における connexin43 の局在

A, 抗 connexin43 (Cx43) 抗体の特異性を示している。矢印で示すのが予想される 43 kDa 付近だが、抗体では二本のバンドが検出されている(リン酸に伴うバンドと考えられる)。B, 培養日数に応じた Cx43 の局在を赤色蛍光として明らかになる。培養後期、心筋の拍動時期と同じタイミングで Cx43 が細胞膜上に数珠を並べたように局在化し始める。

(1)-5 心筋分化解析

細胞の分化状態を、RT-PCR および Real-time PCR で解析した。その結果、クローン化が進んだ細胞においても、これまで解析した心筋分化一カー (*Tnnt2*, 心筋型 myosin) 等の発現上昇が確認され、未分化細胞マーカーの発現の減少が確認された。

(1)-6 まとめ

以上のような解析から、当初の計画通り、

カルシウム濃度依存的に蛍光強度変化する GCaMP5G 遺伝子を持つ細胞は、通常の細胞と同じように心筋分化すること、また機能性に遜色ないことが確認でき、以後の実験で使用出来ることを明らかにした。

しかし、問題点として、蛍光タンパク質の発現が心筋分化の後期になることから、スクリーニングされる細胞の数が限られ、また継代数の進んだ細胞が本来の心筋様細胞の形質を失うことがあり、完全クローン化には至っていない。以下の実験に関しても第三世代までスクリーニングを進めた細胞を用いている。

(2)-1 AFS と TFS の作製

Dish を用い培養では、円柱状に成形した AFS (図 1) を用いた。TFS も定法に従い作製した。また、今回ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を作製するため、独自にリアクターの形状に合わせて型を作製し、ドーナツ状の成形・焼結体を得た。

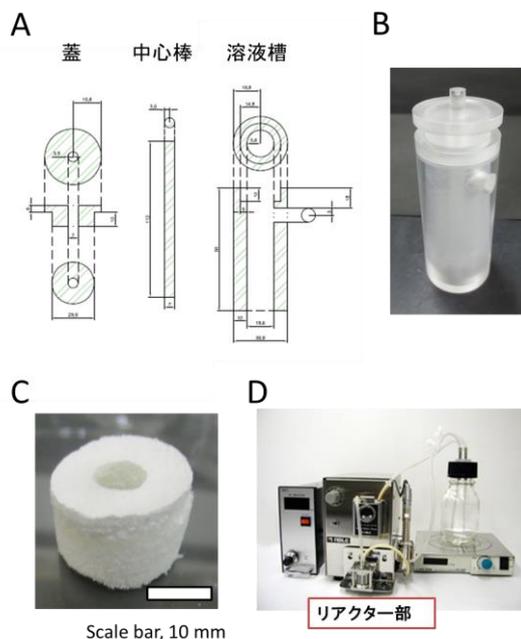


図 5. ラジアルフロー型リアクター用の AFS
A, 成形のための型の設計図。B, 特注で作製した型。
C, 作製したドーナツ状に成形された AFS。D, 本申請
で購入したラジアルフロー型バイオリアクター。

(2)-2 バイオリアクターを用いた細胞培養

これまでの静置培養と異なり、培地を流動させたままで細胞を培養するため、足場材料の形状や培地を流す速度など、様々なパラメーターについて検討する必要がある。先行研究を参考に条件を検討した。現時点の培養条件では十分に最適化されたとは言えないが、培養日数に応じた細胞の増殖が見られており、培地が流動する環境でも十分に心筋細胞を培養できることが確認できた。また、試行回数は少ないものの、リアクター内で心筋分化に伴うマーカー遺伝子の発現量が増加することも分かっている。

(2)-3 AFS および RFB 内で培養した細胞の Cx43 局在

AFS 内で培養した細胞について、機能性を反映する分化マーカーとして Cx43 の局在を調べた (図 6)。その結果、dish 培養とは異なり、数珠状に連なった局在は極めて限定的にしか観察されず、凝集したような蛍光シグナルが頻繁に観察された。これは、dish 培養とは異なり、三次元環境下では細胞間のネットワークは面ではなく点から開始され、また、そこから広がるねとワークも面としての広がりではなく、より複雑な三次元的な広がりを持つことが考えられた。

RFB 内で培養した細胞についても同様に Cx43 の局在を観察した。上記 AFS と類似する局在が見られ、培地が流動していることの影響は限定的であることが考えられた。

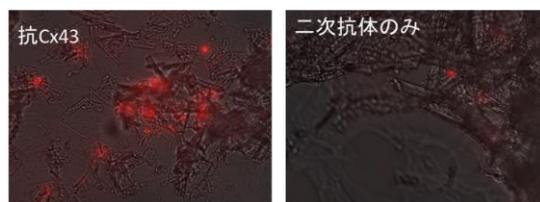


図 6. AFS で培養した P19.CL6 細胞における Cx43 の局在
右側のパネルはネガティブコントロールであり、二次抗体のみの非特異的の蛍光を示している。左側のパネルは抗 Cx43 抗体で Cx43 の局在を調べた。

(2)-4 AFS および RFB 内で培養した pTnnt2::GCaMP5G 遺伝子導入細胞の蛍光観察

本研究では、培養条件の設定に時間がかかったことから、pTnnt2::GCaMP5G 導入細胞を用いた実験については予備的な結果となっている。AFS 内で培養した細胞は培養日数に伴い、蛍光強度の減衰が見られた。細胞をクローン化していないことから、正確な発現量の変化として解析することができないが、継代数の増加や、プロモーターの性質などが影響している可能性が考えられる。

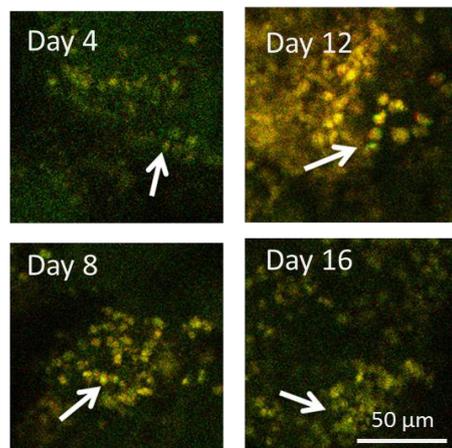


図 7. AFS で培養した pTnnt2::GCaMP5G 遺伝子導入細胞の蛍光観察
pTnnt2::GCaMP5G 遺伝子を導入した P19.CL6 細胞を AFS で培養し、蛍光観察を行った。黄色に見えるのは自家蛍光の赤色と、EGFP による緑色蛍光が重なったものと考えられる。矢印は緑色蛍光を発する細胞

(2)-5 まとめ

RBF 培養に向けた準備は整っている。成形に必要な型も出来上がり、今回データを示していないが、XRD や SEM 観察によって、これまで静置培養で使用していた AFS と変わらない足場材料の作製に成功したことを確認している。細胞の培養条件の最適化に関しては今後の課題となる。また本報告書で示したのは AFS についてであるが、 β -TCP を基にした TFS も作製している。しかし、TFS はあまりに機械的強度が低く、TFS 単体では細胞培養することが困難なことが分かった。そのため、繊維状足場材料としての特性を保持したまま力学的な強度を上げるため、現在は生分解性ポリマーとのコンポジット作製に取り組んでいる。AFS 内培養した細胞の機能的な成熟は Cx43 の発現で解析することができたが、AFS 内で心筋様細胞が拍動するかを可視化するために用いた EGFP の系が現時点では完成していない。

結果として、本研究では申請時の計画に基づき、おおむね予定どおり研究を進めることができた。しかし、目的遺伝子の安定導入株のクローン化が未完である。未完である理由の一つとして、上記コンストラクトを用いたクローニングを停止していることがある。使用したコンストラクトが、AFS 内では期待したほどの蛍光強度を持たないことが結果として見えつつあり、現在、可視化に適した新しいコンストラクトを用いて、再度細胞スクリーニングを実施している。

<引用文献>

- ① Fujita et al., *Heart Circ. Physiol.* 303: H1169-H1182 (2012)
- ② Matsuura et al., *J. Cont. Rel.* 169: 336-340 (2013)
- ③ Nakai et al., *Nature Biotech* 19: 137-141 (2001)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Proline decreases the suppressive effect of histidine on food intake and fat accumulation. Asahi R., Tanaka K., Fujimi T. J., Kanzawa N., Nakajima S. *J. Nutri. Sci Vitaminol.* 査読有, 62: 277-280 (2016) DOI: 10.3177/jnsv.62.277
- ② *Staphylococcus aureus* detection by fluorescent silica nanoparticles modified with metal-dipicolylamine complexes. Kasai Y., Kobayashi H., Tsuchido Y., Hashimoto T., Kanzawa N., Hayashita T. *Chem. Lett.* 査読有, 45: 749-751 (2016) DOI: 10.1246/cl.160261
- ③ cDNA sequence analysis and structural

phylogenetic tree of novel myoglobin from striped snake-head fish (*Ophicephalus striatus*). Chotichayapong C., Chanthai S., Sattayasai N., Kanzawa N., Tamiya T., Tsuchiya T. *Orient. J. Chem.* 査読有, 32: 9-28 (2016) DOI: 10.13005/ojc/320102

- ④ Purification, peptide mapping and spectroscopic characterization of myoglobin from striped snake-head fish (*Ophicephalus striatus*). Chotichayapong C., Sattayasai N., Kanzawa N., Tamiya T., Tsuchiya T., Chanthai S. *Orient. J. Chem.* 査読有, 32: 181-194 (2016) DOI: 10.13005/ojc/320119
- ⑤ Studies on connexin 43, a gap-junction protein, in P19 embryonal carcinoma cells after culture on an apatite fiber scaffold. Kanzawa N., Takano H., Yasuda K., Takahara M., Aizawa M. *Key Engineer. Mater.* 査読有, 696: 230-233 (2016). DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.696.230
- ⑥ Real-time evaluation of the effects of dexamethasone on osteoblasts using dual labeling with fluorescent probes. Ohsugi H., Hatsukawa J., Takahara M., Aizawa M., Kanzawa N. *Key Engineer. Mater.* 査読有, 631: 379-383 (2015) DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.631.379
- ⑦ P19.CL6 cells cultured in AFS differentiate into cardiomyocytes. Yasuda K., Takahara M., Aizawa M., Kanzawa N. *Key Engineer. Mater.* 査読有, 631: 295-299 (2015) DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.631.295
- ⑧ Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties. Shimizu Y., Kawanobe Y., Konishi T., Kanzawa N., Honda M., Aizawa M. *Key Engineer. Mater.* 査読有, 631: 107-112 (2015) DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.631.107
- ⑨ Fabrication of apatite-fiber scaffolds with enhanced mechanical property using chemical cross-linking of type I-collagen and their biocompatibility. Motojima S., Igeta N., Muramatsu H., Uchida H., Itatani K., Kanzawa N., Honda M., Aizawa M. *J Soc Inorg Mater Jpn* 査読有, 21: 278-285 (2014)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020200853>

- ⑩ バイオセラミックスを足場材料とした心筋組織の創, 神澤 信行, *Sophia Sci-Tech* 査読なし 25: 16-18 (2014)
<http://www.st.sophia.ac.jp/scitech/wp-content/uploads/2014/11/n25.pdf>

[学会発表] (計 7 件)

- ① Mechanical and biological properties of alginate-coated beta-tricalcium phosphate-fiber scaffold. Izawa K., Takeoka Y., Aizawa M., Kanzawa N., 10th World Biomaterials Congress (WBC), Montreal, QC Canada, May 17-22, 2016
- ② Studies on connexin 43, a gap-junction protein, in P19 embryonal carcinoma cells after culture on an apatite fiber scaffold. Kanzawa N., Takano H., Yasuda K., Takahara M., Aizawa M. *Bioceramics* 27, 27 th International Symposium on Ceramics in Medicine. Bali, Indonesia, Oct 27-29, 2015
- ③ AFS 上で培養した骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞のインテグリン発現パターンの解析. 富田祐樹, 相澤守, 神澤信行 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月 9~10 日(京都テルサ, 京都)
- ④ Detection of bacteria by using fluorescent silica nanoparticles modified by dipicolylamino probes. Tsuchido Y., Kobayashi H., Kasai Y., Yamasawa A., Hashimoto T., Kanzawa N., Hayashita T., RSC Tokyo International Conference 2014, Makuhari messe, Chiba Japan, September 4-5, 2014
- ⑤ P19.CL6 cells cultured in AFS differentiate into cardiomyocytes. Yasuda K., Ishii H., Takahara M., Aizawa M. and Kanzawa N. *Bioceramics* 26, 26th International Symposium on Ceramics in Medicine. Barcelona, Spain, November 06-08, 2014
- ⑥ Real-time evaluation of the effects of dexamethasone on osteoblasts using dual labeling with fluorescent probes. Ohsugi H., Hatsukawa J., Takahara M., Aizawa M. and Kanzawa N. *Bioceramics* 26, 26th International Symposium on Ceramics in Medicine. Barcelona, Spain, November 06-08, 2014
- ⑦ Cytotoxicity of anti-bacterial calcium-phosphate cement with anti-washout property. Shimizu Yusuke, Kawanobe Yusuke, Konishi Toshiisa, Kanzawa N., Honda M., Aizawa M. *Bioceramics* 26, 26th International Symposium on Ceramics in Medicine.

Barcelona, Spain, November 06-08, 2014

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sophia.ac.jp/~kanzawa/home/%e7%a0%94%e7%a9%b6/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神澤 信行(KANZAWA, Nobuyuki)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号: 40286761