

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630435

研究課題名(和文)酸化ストレス刺激のパターン制御を利用した幹細胞の増殖・分化挙動調節システムの開発

研究課題名(英文) Study on the system to control the proliferation and differentiation of stem cells and by moderate oxidative stress.

研究代表者

原 正之(Hara, Masayuki)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50344172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光増感色素(PS)の可視光照射で生じた活性酸素種(ROS)がラット骨髄由来の間葉系幹細胞(MSC)の増殖と分化に与える影響を調べた。増殖培地で培養したMSC、骨分化誘導培地で培養した細胞の両者にPSを添加し、LED光源の白色光にて細胞が死滅しない程度のROSを発生させ、両条件で培養したMSCの分化関連遺伝子の発現の変化を定量的RT-PCR法で調べた。骨分化、軟骨分化、脂肪分化、に関わる遺伝子の発現がROS負荷でやや上昇した。従って、細胞を死滅させない程度の適度な酸化ストレスはMSCの分化促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied about effect of reactive oxygen species (ROS) evolved by visible light-activated photosensitizer (PS) on the cultured mesenchymal stem cells (MSCs) derived from rat bone marrow. White light from light emitting diode (LED) was used for activation of PS in the experiments. MSCs proliferated well in the growth medium and differentiated into osteoblasts in the osteogenic culture medium. Gene expression levels were measured by quantitative RT-PCR method after the MSCs cultured in both media were exposed to moderate level of ROS. Genes concerning osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation in MSCs were up-regulated. Then we considered that moderate oxidative stress not strong enough to kill the cultured MSCs promoted the differentiation of MSCs.

研究分野：生物学

キーワード：mesenchymal stem cell bone photosensitizer hematorporphyrin rhodamine reative oxygen species

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療技術や薬物・毒物評価系への応用を目指して多能性幹細胞や体性幹細胞を培養し、分化誘導する培養技術が盛んに開発されている。未分化な状態で増殖させる技術と分化誘導により目的の分化細胞を均一な集団として得るための技術が重要である。

活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) などの酸化ストレスは細胞に損傷を及ぼす場合が多く、細胞周期の停止、遺伝子 DNA の損傷と修復など、従来は細胞傷害機構の研究が主流であった。最近、温和な条件の酸化ストレスは、むしろ細胞の分化や増殖を調節する刺激として、生理的役割を演じているとの知見が多く蓄積しつつある。

2. 研究の目的

本研究では、光増感反応を利用した時空間制御が可能な酸化ストレス刺激装置を開発して、間葉系幹細胞に対する酸化ストレス刺激の負荷を行った。この刺激が間葉系幹細胞の増殖・分化能に与える影響を解析し、将来的には幹細胞の増殖・分化制御を可能とすることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

本研究では光増感反応を利用した酸化ストレス刺激装置を開発し、白色 LED 光源の励起光で誘起される適度な強さの酸化ストレスを間葉系幹細胞に負荷した。その際に間葉系幹細胞の増殖能、分化能などにどのような影響が及ぶか否かを解析した。

以下の様に装置や実験系作りと細胞への影響評価の2項目の実験計画を立てて研究を開始した。

平成26年度：酸化ストレス刺激のための光照射制御部と光増感色素固定化フィルムの開発

光照射部と制御プログラムの作製

光増感色素固定化フィルムの作製

平成27年度：間葉系幹細胞およびiPS細胞の増殖特性と分化能の評価

間葉系幹細胞の増殖、分化特性評価

iPS細胞の増殖、分化特性評価

実験系の確立における技術的な問題解決に当初の予定よりも多くの時間がかかったため、主に間葉系幹細胞についての実験結果を得たが、iPS細胞については期間中には準備と予備的な検討に留まった。

4. 研究成果

本研究では、光増感色素の可視光照射により生じる活性酸素種を利用して、細胞を死滅させない程度の酸化ストレスが間葉系幹細胞の増殖や分化に与える影響を調べ、

細胞の増殖や分化の制御方法に役立てようという興味に基づいて研究を行った。

研究の初年度にあたる平成26年度は、研究提案書に記載の「酸化ストレス刺激のための光照射制御部と光増感色素固定化フィルムの開発」に関して、光照射部と制御プログラムの作製および、光増感色素固定化フィルムの作製、に関する基礎的な検討を行なった。

光増感反応(photodynamic reaction)を利用して、Hematoporphyrin や Rhodamine などの光増感色素(PS: photosensitizer)に可視光を照射した際に、照射部位に局所的に活性酸素(ROS: reactive oxygen species)を生じる為の条件の検討を行った。これらの色素は、可視光の照射により細胞培養用の培地中で ROS を生じる事を、*p*-Nitrodimethylaniline 法(比色法)などの測定方法で確認・定量する実験を様々な条件で行い、光照射時間や PS 濃度への依存性を検討した。

間葉系幹細胞(MSC: mesenchymal stem cell)は骨髄中などに多く含まれ、骨、軟骨、脂肪組織、などに分化可能な体性幹細胞である。本研究ではラット大腿骨の骨髄から分離した MSC を培養して、細胞への ROS の効果を確かめる実験に用いた。細胞の採取、培養については、以前より我々の研究室で行ってきた方法(Takitoh, et. al., (2014) J. Biosci. Bioeng., 119, 217-225.)に準拠して行った。

間葉系幹細胞(MSC)に ROS 刺激を与え、細胞数の変化や qRT-PCR で測定した遺伝子発現の変化をもとにして、ROS 刺激に対する MSC の生死や分化能、増殖能に関する応答反応を解析した。これらの実験より MSC が生存できる光増感色素濃度および照射条件等を求めることができた。光照射装置の材料の調達と制御部の作製に時間を要したため、予定より実験が予定より遅れた部分も有るが、次年度に実験を進める予定である。

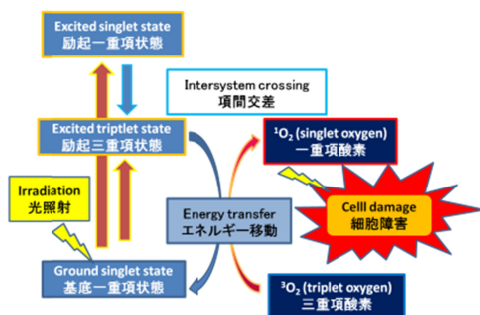
2年目で終了年度に当たる H27 年度は、研究提案書に記載の「間葉系幹細胞および iPS 細胞の増殖特性と分化能の評価」に関して、間葉系幹細胞の増殖、分化特性評価、ならびに iPS 細胞の増殖、分化特性評価について検討を行なった。なお、研究の開始当初には予想していなかった事として、培養の途中で細胞が死滅する場合もあり、細胞が死滅しない程度の酸化ストレスを再現性良く付与する事には実験の技術的な改良と習熟が必要であった。

ラットの大腿骨より分離した間葉系幹細胞(MSC)を増殖培地で培養し数回継代したものを実験に用いた。MSC を増殖培地で引き続き培養したもの、および骨分化誘導培地にて培養したもの、の両者について、光増感色素の存在下で LED 光源の白色光を照射して細胞が死滅しない程度の活性酸素種(ROS)を発生させた際に、両条件で培養し

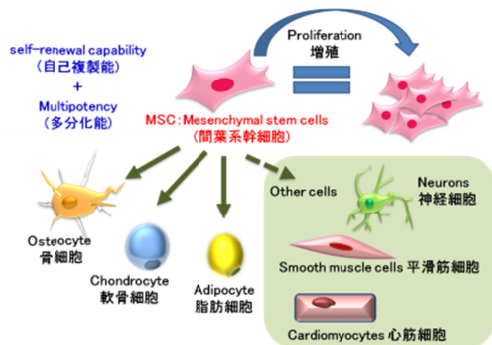
た MSC における各種分化関連遺伝子の発現が変化するかどうかを定量的 RT-PCR 法により調べた。骨分化、軟骨分化、脂肪分化、に関わる遺伝子の発現が ROS によりやや上昇する傾向が見られた。従って、細胞を死滅させない程度の適度な酸化ストレスは MSC の分化を正の方向に制御する可能性が示唆された。

上記の実験結果は、MSC の増殖や分化の制御技術を確立する上で多くの示唆を与えるものであると思うが、まだ詳しいメカニズムは解らない部分も多く、また光の on/off により細胞の状態を制御するデバイスについても試作段階なのでより改良した実験系を構築して今後の研究を進めてゆきたいと考えている。

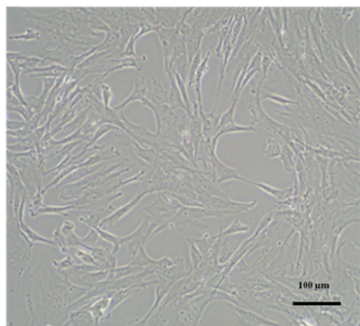
Photodynamic reaction with photosensitizer (PS), type II (光増感反応、type II)



Mesenchymal stem cell (MSCs) 間葉系幹細胞



Mesenchymal stem cell (MSCs) 間葉系幹細胞



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 2件)

Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, Takako Takitoh, Masahiko Bessho, Motohiro Hirose, Hajime Ohgushi, Hideki Mori, Masayuki Hara, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2015) 119, 217-225. (査読有り)

Porous hydrogel of wool keratin prepared by a novel method: an extraction with guanidine/2-mercaptoethanol solution followed by a dialysis, Yuki Ozaki, Yusuke Takagi, Hideki Mori, Masayuki Hara, *Materials Science and Engineering C* (2014) 42, 146-154. (Corrigendum (一部の数値など訂正)は *Materials Science and Engineering C* (2016) 63, 690.) (査読有り)

(学会発表)(計 6件)

間葉系幹細胞の生存と分化に対する光増感反応による酸化ストレス刺激の影響、城田祐介、森英樹、原正之、日本化学会第 96 春季年会、平成 28 年 3 月 24 日(京田辺市、同志社大学)

培養ラット間葉系幹細胞に対する光増感反応による活性酸素ストレスの影響、森英樹、田中太陽、原正之、第 38 日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会(BMB 2015)平成 27 年 12 月 1 日(神戸市、神戸国際会議場)

培養ラット間葉系幹細胞に対する活性酸素ストレスの影響、森英樹、田中太陽、原正之、第 67 回日本生物工学会大会(2015)平成 27 年 10 月 26 日(鹿児島市、城山観光ホテル)

In vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on two types of collagen gels with and without collagen fibrils., Takako Takitoh, Masahiko Bessho, Motohiro Hirose, Hajime Ohgushi, Hideki Mori, Masayuki Hara、8th KIFEE-Symposium 平成 27 年 9 月 23 日(NTNU, Trondheim, Norway) Poster presentation

多孔質ケラチンハイドロゲルの研究、村田重徳、尾崎由季、高木優輔、森英樹、原正之、日本バイオマテリアル学会第 10 回関西若手研究発表会 平成 27 年 8 月 5 日(吹田市、関西大学)

間葉系幹細胞への光増感反応の影響評価、田中太陽、森英樹、原正之、第 66 回日本生

物工学会大会 (2014) 平成 26 年 9 月 10 日
(札幌市、札幌コンベンションセンター)

〔その他〕

ホームページ等

研究室のホームページ (大阪府立大学 大
学院理学系研究科 生物科学専攻 細胞組
織工学分野)

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~hara/>

Research Gate

https://www.researchgate.net/profile/Masayuki_Hara3/citations

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 正之 (HARA Masayuki)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号 : 50344172

(2)研究分担者

森 英樹 (MORI Hideki)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教

授

研究者番号 : 30450894