

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670456

研究課題名(和文)細胞外マトリックスの機能モジュールを修飾した基板による間葉系幹細胞の分化制御

研究課題名(英文)Regulation of mesenchymal stem cell differentiation by the substrates immobilized with functional modules of extracellular matrix

研究代表者

干場 隆志 (HOSHIBA, Takashi)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：00469769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)の培養基板による分化制御のために、骨/脂肪分化に関与するWnt、BMP、あるいは細胞外マトリックス(ECM)タンパク質をそれぞれ修飾した培養基板の作製を試みた。特に本研究では、Wntタンパク質の修飾を行ったところ、MSCの増殖を促進するとともに、Wntシグナル経路に関する分子の一つであるβ-カテニン量の増大および細胞核内への移行の促進を観察することができた。さらに本研究を発展させ、MSCの分化制御につなげたい。

研究成果の概要(英文)：The proteins inducible of osteogenesis and adipogenesis are tried to immobilized to the substrate for the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. Here, Wnt protein was successfully immobilized to the substrates to regulate cell growth and intracellular signaling.

研究分野：生体材料学

キーワード：間葉系幹細胞 バイオマテリアル 再生医療 Wntシグナル 細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は骨芽細胞や脂肪細胞に分化できる細胞であり、その分化制御機構の解明は骨粗しょう症などの疾患の新たな治療法の開発につながる。また、分化能維持を含む分化制御方法の確立はMSCを用いた再生医療の確立に重要である。MSCの分化制御にはBMP、Wnt、細胞外マトリックス(ECM)が重要であり、これらを用いて、MSCの分化制御が試みられている。一方、MSCの分化能は継代培養とともに失われるが、MSCの幹細胞ニッチを模倣した培養基板により維持可能である(Y Lai, *Stem Cells Dev*, 2010)。しかし、分化バランスの制御、分化能の維持をすべて行うことができる培養基板はこれまでに開発されていない。

## 2. 研究の目的

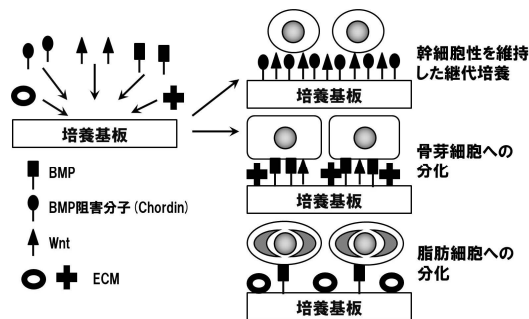


図1: 本研究で作製する培養基板

## 大目標: MSCの分化制御を可能にする人工タンパク質を修飾した培養基板の作製

我々はこれまでに、MSCの骨/脂肪分化時におけるECMを模倣した培養基板を作製し、ECMにより、適切なBMPシグナルおよびWntシグナルが伝達されることにより、骨あるいは脂肪分化が最大限に引き出されることを明らかにしている(T Hoshiba, *J Biol. Chem*, 2009, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2011)。さらに、未分化性の維持も上記の2つのシグナルが重要であることを見出してきた。そこで、Wntタンパク質、BMP、骨分化に必要なコラーゲンあるいは脂肪分化に必要なラミニンを

組み合わせて修飾し、修飾比率を変化させることによって、培養基板によりMSCの分化制御ができるのではないかと考えた(図1)。

本研究では特に、Wntを培養基板表面に修飾し、細胞増殖数を計測するとともに、古典的Wntシグナルであるβ-カテニンの核移行量を定量した。

## 3. 研究の方法

Wnt3aタンパク質を、濃度を変えて溶解させた後、96wellプレート内に各wellにつき、50 μL添加した。添加後、クリーンベンチ内で一晚風乾することにより、Wnt3aタンパク質を培養表面に修飾した。

ヒト間葉系幹細胞(Lonza)を継代培養し、4継代目あるいは5継代目のものを用いた。分化能の確認は、骨分化誘導培地(100 nM デキサメタゾン、10 mM β-グリセロフォスフェート、10%ウシ胎仔血清含有、低グルコース濃度 DMEM 培地)あるいは脂肪分化誘導培地(1 μM デキサメタゾン、0.5mM IBMX、10 μg/ml インスリン、10%ウシ胎仔血清含有、高グルコース濃度 DMEM 培地)中で培養後、1~2週間経過後に、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色あるいは位相差顕微鏡で脂肪滴の観察を行った。

作製した培養基板上に5000 cells/cm<sup>2</sup>となるように播種した。培養1日後、固定を行い、細胞核およびアクチンをHoechst33258およびAlexa488結合ファロイジンで染色した。染色後、イメージサイトメトリー(横河電機、CQ1)を用い、10xの対物レンズを用いた際の9枚の視野から、細胞核数を計測した。さらに、β-カテニンの細胞内分布を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) MSCの骨/脂肪細胞への分化の確認

まず、MSCが骨または脂肪細胞へと分化するかを確認した。培養2週間後に、細胞内において、ALP活性および脂肪滴がそれぞれ観

察されたため、購入した MSC には分化能があることを確認できた。

(2) Wnt3A 修飾培養基板上での MSC の増殖  
上記の MSC を、Wnt3A を修飾した培養基板上に播種し、1 日培養した。

1 日培養後の細胞数は下表の通りである。

表:1 日後の細胞数

溶液濃度(μg/ml)	0	2.5	10
9視野中の細胞数	349	503	570

Wnt-β-カテニンシグナルは細胞増殖を促進することが報告されているが、修飾濃度に応じて細胞数が増大していた。この結果は、本方法によって Wnt3A を修飾しても、活性が失われないことを示唆している。

(3) Wnt3A 修飾培養基板上でのβ-カテニンの細胞内分布

さらに、MSC 内部のβ-カテニンの細胞内分布を観察した(図 2)。

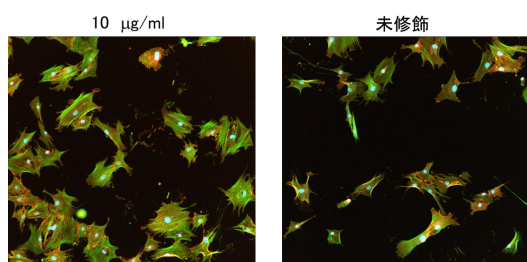


図 2 : β-カテニンの細胞内分布 . 青 : 細胞核、緑、アクチン、赤 : β-カテニン

Wnt3A を修飾した培養基板上におけるβ-カテニンの量は、未修飾のものと比較して増大していた。さらに、β-カテニンの細胞核内への移行も促進されていた。本結果も、修飾された Wnt3A は活性を有することが示している。

(4) 本研究のまとめ

本研究では、MSC の分化状態の制御を、Wnt

あるいは BMP を修飾した細胞培養基板上により制御することを目標として開始した。今回は、MSC の分化状態の制御には至らなかったが、Wnt 分子の修飾により、細胞内シグナル伝達および細胞機能を制御することに成功した。また、定量的に修飾することで、細胞内シグナル伝達を変化させることを目標としていたが、未修飾の培養基板上を除き、今回修飾した濃度範囲においては、細胞の増殖については、顕著な差を観察することができなかった。アッセイ法を変更するなど、さらなる検討が必要である。本研究をさらに進展させ、BMP の修飾等を実施し、MSC の分化制御につなげたいと考えている。

## 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 1 件 )

1. T. Hoshiba<sup>a</sup>, G. Chen, C. Endo, H. Maruyama, M. Wakui, E. Nemoto, N. Kawazoe, M. Tanaka. Decellularized extracellular matrix (ECM) as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. *Stem Cells Int.* 2016, Article ID 6397820 (2016) doi:10.1155/2016/6397820. (<sup>a</sup>:corresponding author) 【査読有】

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

干場 隆志 (Hoshiba, Takashi)

山形大学・大学院理工学研究科・プロジェクト  
ト教員(准教授)

研究者番号：00469769

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

堀田 純一 (Hotta, Junichi)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：80301919

古澤 宏幸 (Furusawa, Hiroyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：60345395

沓沢 好一 (Kutsuzawa, Koichi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・研  
究員

研究者番号：90572066