

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702016

研究課題名(和文) バイオ界面のリモデリング現象を利用して細胞機能を誘導する培養基板の開発

研究課題名(英文) Cell culture substrates regulating cell functions by the remodeling of biomaterials interfaces

研究代表者

干場 隆志 (Hoshiba, Takashi)

山形大学・有機材料システム研究推進本部・准教授

研究者番号：00469769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリ(2-メトキシエチルアクリレート)類似体を用いることにより、基板表面に吸着するタンパク質量を制御することによって、細胞形態の制御を通じ、肝細胞の機能維持ならびに間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化促進が可能な新しい培養基板の開発に成功した。また、培養中の細胞-バイオマテリアル界面のリモデリング現象を制御するために、細胞外マトリックス遺伝子の発現がどのように制御されているか検討し、一部の遺伝子は細胞骨格の状態により制御されていることを見出した。また細胞骨格、細胞形態を制御する初期接着の状態を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Protein adsorption behaviors can be regulated by the coating of poly(2-methoxy ethyl acrylate) analogous polymers. And various cell functions (Hepatocyte: Hepatic gene expression, mesenchymal stem cell: adipogenesis) can be regulated through the control of cell shapes through the suppression of protein adsorption by PMEA analogous polymers. Understanding of regulation mechanisms of extracellular matrix (ECM) gene expression is important to control of biomaterial interface remodeling during the culture. A part of ECM gene expression was regulated through the regulation of actin assembly. Additionally, initial cell adhesion mechanisms which can regulate cell shapes and actin assembly was assessed. Cells adhered on PMEA analogous polymers via both integrin-dependent and -independent mechanisms.

研究分野：生体材料

キーワード：生体材料 バイオ界面 タンパク質吸着 インテグリン 肝細胞 間葉系幹細胞 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

細胞が組み込まれたバイオハイブリッド人工臓器や再生医療/組織工学用の培養担体として、細胞の機能を制御できる培養基板の開発が求められている。従来は細胞外マトリックス(ECM)タンパク質や増殖因子などの生理活性物質を培養基板表面に修飾し、細胞機能の制御が試みられてきた。一方で、生体内に埋植したり、培養基板上での細胞培養によりタンパク質が沈着し、培養基板表面のリモデリングが生じ、細胞機能に影響を与えることが知られている。すなわち、従来の培養基板への生理活性物質の修飾による制御は短期的には細胞機能を精密に制御できるが、修飾された生理活性物質との相互作用は時間とともに変化し、当初の期待通りに細胞機能を制御できない可能性がある。そのため、長期間あるいは生体中での細胞機能の制御には、培養中の培養基板表面のリモデリングを制御する必要がある。そのために、培養基板表面がリモデリングされにくい培養基板の開発が行われてきた。

我々は適切にリモデリングされた培養基板が細胞機能を強く誘導することを報告し、また PMEA 塗布基板では、タンパク質の種類によりその吸着挙動が変化することを見出してきた。そこで、PMEA 類似体を塗布した培養基板上では、培養中のリモデリングをタンパク質の吸着状態を通じて制御できる可能性がある。そのため、培養基板表面への生理活性物質の修飾を行わずに、PMEA 類似体を用いて、培養中のリモデリングを適切に誘導することで、リモデリング後に細胞に機能発現をさせることにより、細胞機能をより長期間制御できる新しい培養基板の開発ができると考えた。

2. 研究の目的

以下に研究開始当初の目標を示す。特に本研究期間内では、目標 1、目標 4、目標 5 を中心に検討を行うとともに、ECM の発現制御機構の検討を行った。

大目標：培養中のリモデリング現象を利用し細胞機能が発現する培養基板の実現

目標 1: PMEA 類似体を塗布した基板(PMEA 類似体基板)上で細胞が産生する ECM タンパク質/分解酵素の種類と量

目標 2: PMEA 類似体基板上に吸着する ECM タンパク質の量と構造

目標 3: 細胞培養時の PMEA 類似体基板のリモデリングの経時的変化

目標 4: 細胞培養時の PMEA 類似体基板上での接着機構の経時的変化

目標 5: PMEA 類似体基板上での細胞の機能発現の経時的変化

また、標的となる細胞として、埋め込み型バイオハイブリッド人工肝臓に向けた肝細胞の機能維持と、再生医療の重要な細胞源である幹細胞の分化制御を可能とする培養基板を作製する。

3. 研究の方法

肝細胞のモデルとして、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を、幹細胞として特に脂肪前駆細胞株である 3T3-L1 細胞を用いて研究を行った。また、PMEA 類似体はスピンコート法あるいはキャスト法によりコートして培養に供した。

(1)細胞機能の評価

まず初めに、各種の PMEA 上における HepG2 あるいは 3T3-L1 の細胞機能(細胞接着、増殖、特異的な分化マーカーの発現)をリアルタイム PCR 法により評価した。

(2)ECM の発現制御機構の評価

その後、各種の PMEA 類似体上における HepG2 の ECM 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により定量するとともに、細胞形態との関係性についてサイトカラシン D を用いて評価を行った。

(3)細胞接着機構の解析

また、細胞形態は細胞の培養基板への接着に強く依存するため、PMEA 類似体基板上への細胞接着機構について、阻害剤や Single cell force spectroscopy 法を用いながら詳細に検討を行った。

4. 研究成果

(1)細胞機能の評価

HepG2 細胞を PMEA あるいはポリテトラヒドロフルフルルアクリレート(PTHFA)を塗布した基板に播種したところ、HepG2 は PMEA、PTHFA 基板共に接着することができた(図 1)。

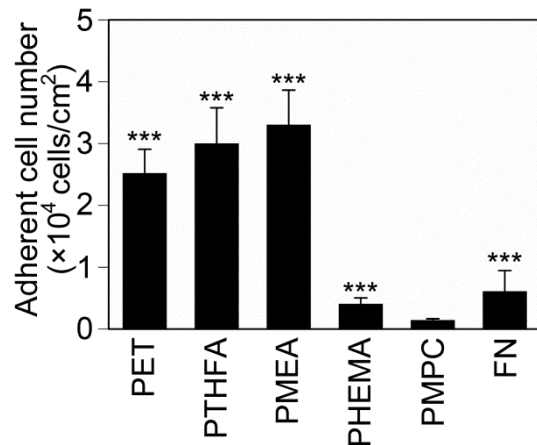


図 1: HepG2 の PMEA 類似体への接着

さらに、細胞形態を評価したところ、PMEA 基板上では球形を維持していたが、PTHFA 基板上では大きく伸展していた(次頁図 2)。細胞形態に加え、肝機能マーカー遺伝子である、*HNF4A* および *ALB* の発現量を比較したところ、PMEA 基板上で、通常の培養基板上や PTHFA 上と比較し、有意に上昇していた(次頁図 3)。このメカニズムを明らかにするために、肝機能の発現に必要な *HNF4A* の発現を制御する Yes-associated protein (YAP) の細胞内局在を比較したところ、PMEA 上では細胞質内に分散していたのに対し、PTHFA 上では細胞核に局在していた(次頁図 4)。YAP の核局在は

HNF4A の発現を阻害することから、PMEA 基板上では YAP の核移行が阻害されたため、肝機能マーカー遺伝子の発現量が上昇したと考えられた。

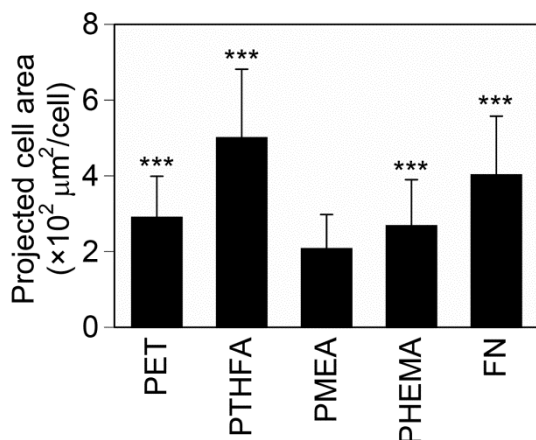


図 2 : HepG2 の投影面積

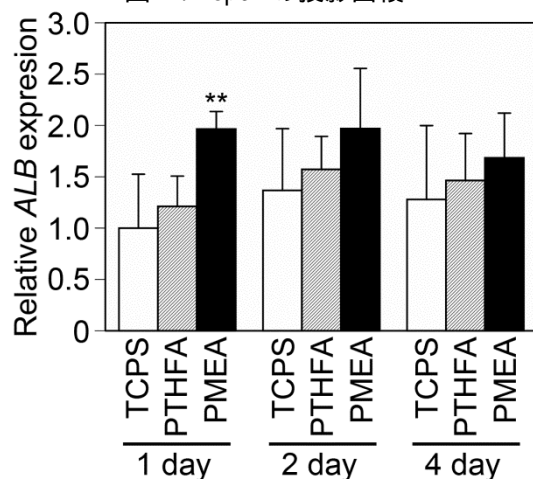


図 3 : ALB の発現量

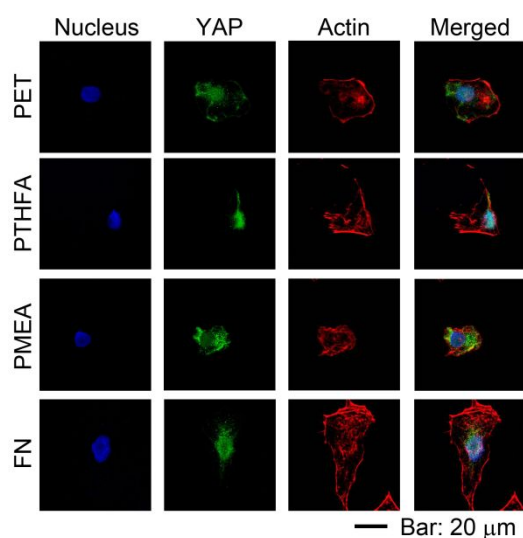


図 4 : YAP の局在

以上の結果から、血液適合性を有する PMEA 上では肝機能を維持でき、ハイブリッド型人工肝臓の材料としての利用が期待された。

脂肪前駆細胞モデルである 3T3-L1 細胞についても、同様に種々の PMEA 類似体上で培養を行った。その結果、3T3-L1 細胞は各 PMEA

類似体基板上に接着することができた。一方で、細胞増殖について検討したところ、PMEA 類似体の種類に応じて増殖性に違いが観察された(図 5)。

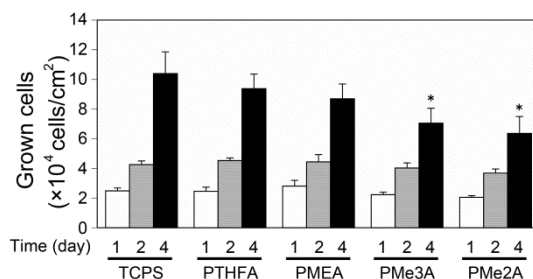


図 5 : 3T3-L1 細胞の増殖

さらに、脂肪分化マーカー遺伝子の発現量を調べたところ、PMEA、PMe3A、PMe2A 上で発現量が上昇していた(図 6)。

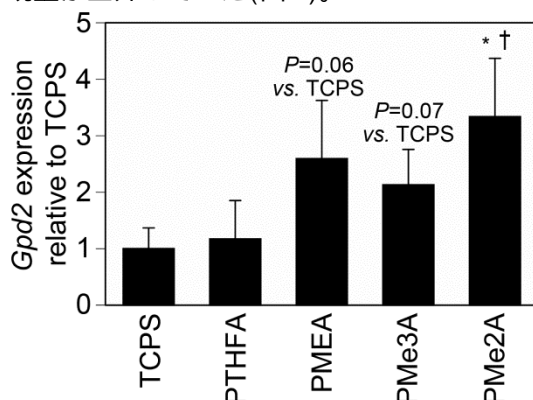


図 6 : 脂肪分化マーカー Gpd2 の発現量

脂肪分化は細胞の形態に大きく影響している。そこで、各 PMEA 類似体上での細胞形態を比較したところ、PMEA、PMe3A、PMe2A 上において、細胞の伸展が抑制されており、そのため、脂肪分化が促進されたと考えられた。

(2) ECM の発現制御機構の評価

PMEA 類似体上における ECM の発現パターンを調べるために、HepG2 細胞を各基板上で培養し、培養後、フィブロネクチンおよびラミニン 5 鎖の発現を半定量 RT-PCR 法にて評価した(図 7)。

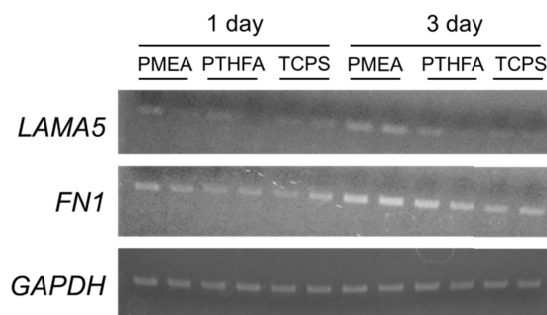


図 7 : PMEA 類似体上での ECM の発現

その結果、細胞が球形を呈する PMEA 上で、ラミニン 5 鎖の発現量が上昇していた。そこで、アクチンの線維化により、ラミニン 5 鎖の発現が阻害されるのではないかと、考

え、アクチン線維の形成を阻害するサイトカラシン D を添加し、ラミニン 5 鎖の発現量を評価した(図 8)。

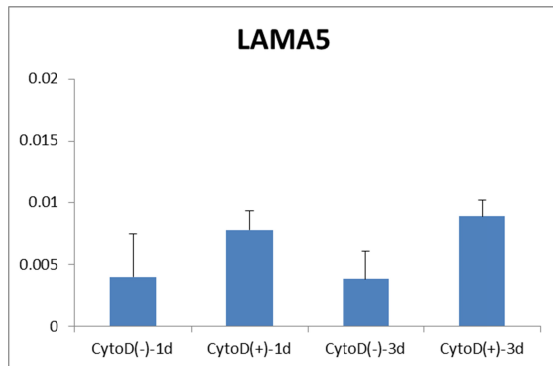


図 8: サイトカラシン D 添加時のラミニン 5 鎖の発現量

その結果、サイトカラシン D を添加することにより、ラミニン 5 鎖の発現の上昇が観察された。

(3)PMEA 類似体基板上への細胞の接着機構の解明

PMEA 類似体基板上への接着のインテグリン依存性を確認するために、HepG2 あるいは 3T3-L1 細胞を EDTA 存在下で播種し、1 時間後の接着数を計測した。その結果、PET、TCPS、あるいは PTHFA 上では EDTA によりその接着はほぼ抑制された。しかしながら、PMEA, PMe2A, PMe3A 上では EDTA を添加しても、接着した細胞が多数観察された(図 9)。

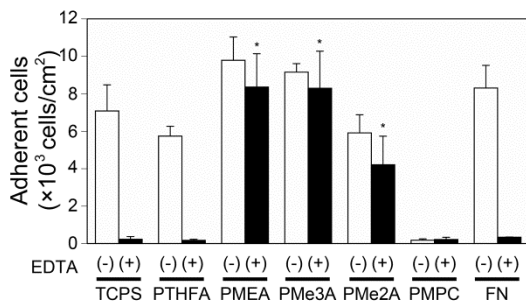


図 9: 3T3-L1 細胞の EDTA による接着阻害

さらにインテグリンによる接着が生じることで形成される接着斑を、ピンキュリンをマーカーとして培養 1 日後に観察したところ、HepG2、3T3-L1 とともに PET、TCPS あるいは PTHFA 上では明瞭な接着斑が観察されたのに対し、PMEA, PMe2A, PMe3A 上では接着斑はほとんど観察されなかった(図 10)。

以上の結果から、PET、TCPS、PTHFA 上では細胞はほぼインテグリンを介して接着するのに対し、PMEA, PMe2A, PMe3A 上ではインテグリン依存的な接着の他に、インテグリンに依存しない接着が生じていることが示唆された。

PMEA 類似体上ではタンパク質の吸着量が変化し、特に、PMEA, PMe2A, PMe3A 上ではタンパク質の吸着量は半分程度に抑制される

(図 11)。

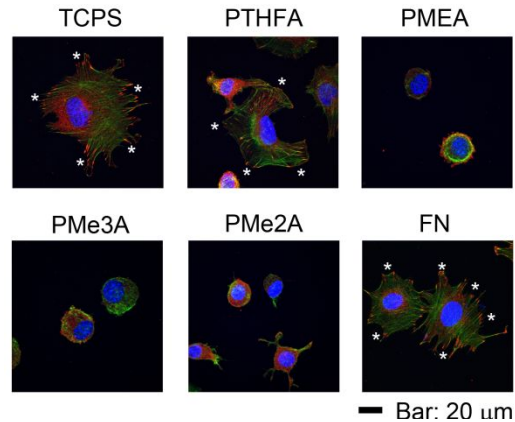


図 10: 3T3-L1 細胞の接着斑形成

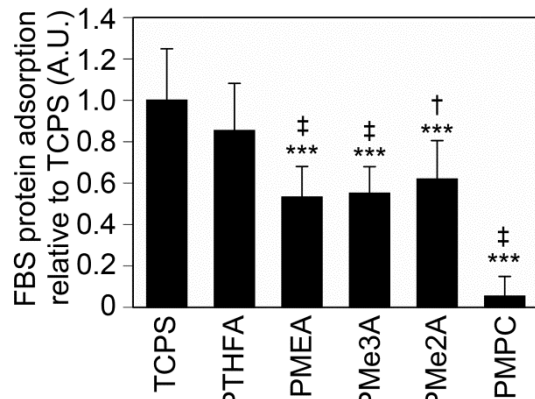


図 11: タンパク質の吸着量

そのため、PMEA、PMe2A、PMe3A 上では、吸着タンパク質による基板表面が完全に被覆されず、基板表面が露出していると考えられる。そのため、細胞は露出した基板表面に非特異的に相互作用しているのではないかと考えられた。事実、同様の接着機構を有する HT-1080 の細胞接着力を single cell force spectroscopy で測定したところ、タンパク質の吸着量の多い TCPS、PTHFA 上では、血清培地中において、基板上に吸着タンパク質が存在しない無血清培地中と比較し、接着力は著しく低下する一方、タンパク質の吸着が抑制される PMEA 上では血清培地あるいは無血清培地中で接着力に大きな違いは見られなかった(図 12)。

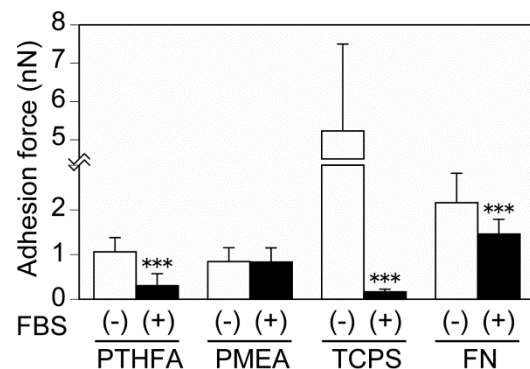


図 12: PMEA 類似体への接着力

本結果から、PMEA 上で観察されるインテグリンに依存しない細胞接着は、基板表面に直接相互作用しているものであると示唆された。

以上の結果から、培養基板表面にタンパク質の吸着により生じるリモデリングにより、細胞機能を制御できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. T. Hoshiba, A. Yoshihiro, M. Tanaka, Evaluation of initial cell adhesion on poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogous polymers. *J. Biomed. Sci. Polym. Edn.* In press. (査読有)
2. T. Hoshiba, M. Tanaka, Integrin-independent cell adhesion substrates: Possibility of applications for mechanobiology research. *Analytical Sciences*, 32, 1151-1158 (2016). (査読有)
3. T. Hoshiba, T. Orui, C. Endo, K. Sato, A. Yoshihiro, Y. Minagawa, M. Tanaka, Adhesion-Based Simple Capture and Recovery of Circulating Tumor Cells Using a Blood-Compatible and Thermo-Responsive Polymer-Coated Substrate. *RSC Advances*, 6, 89103-89112 (2016). (査読有)
4. T. Hoshiba, E. Nemoto, K. Sato, H. Maruyama, C. Endo, M. Tanaka, Promotion of adipogenesis of 3T3-L1 cells on protein adsorption-suppressing poly(2-methoxyethyl acrylate) analogs. *Biomacromolecules*, 17, 3808-3815 (2016). (査読有)
5. T. Hoshiba, 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 Cell Int.* 2016, 6397820 (2016). (査読有)
6. T. Hoshiba, E. Nemoto, K. Sato, T. Orui, T. Otaki, A. Yoshihiro, M. Tanaka, Regulation of the contribution of integrin to cell attachment on poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogous polymers for attachment-based cell enrichment. *PLoS One*, 10, e013066 (2015). (査読有)
7. T. Hoshiba, T. Otaki, E. Nemoto, H. Maruyama, M. Tanaka, Blood compatible polymer for hepatocyte culture with high hepatocyte-specific functions toward bioartificial liver development. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 18096-18103 (2015). (査読有)
8. T. Hoshiba, M. Tanaka, Optimization of the tissue sources, malignancy, and initial substrate of tumor cell-derived

matrices to increase cancer cell chemoresistance against 5-fluorouracil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 353-357 (2015). (査読有)

9. M. Tanaka, K. Sato, E. Kitakami, S. Kobayashi, T. Hoshiba, K. Fukushima, Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept. *Polym. J.* 47, 114-121 (2015). (査読有)

10. R. Cai, T. Nakamoto, T. Hoshiba, N. Kawazoe, G. Chen, Control of simultaneous osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Stem Cell Res. Ther.* 4, 223, (2014) DOI: 10.4172/2157-7633.1000223. (査読有)

11. B. Joddar, T. Hoshiba, G. Chen, Y. Ito, Stem cell culture using cell-derived substrates. *Biomater. Sci.* 2, 1595-1603 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 王場隆志、組織工学。再生医療を目指した高分子材料界面の設計、平成 28 年度東北地区先端高分子セミナー(招待講演)、2017 年 3 月 13-14 日、かみのやま温泉 天神の御湯 あづま屋(山形・上山)
2. 王場隆志、培養基板界面へのタンパク質吸着現象の変化による細胞接着機構の制御とその応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016(招待講演)、2016 年 11 月 21-22 日、福岡国際会議場(福岡・福岡)
3. 王場隆志、バイオマテリアル研究における QCM の応用～細胞接着・機能を制御する高分子培養基板の開発～、第 9 回 QCM 研究会(招待講演)、2015 年 8 月 28 日、機械振興会館(東京)
4. 王場隆志、細胞生物学的手法を用いた細胞と医療用材料の相互作用の解析、第 65 回医用高分子研究会(招待講演)、2015 年 3 月 8 日、東京理科大学森戸記念館(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：細胞を回収する方法、およびそれを用いられるポリマー

発明者：田中賢、王場隆志、大類寿彦、佐藤一博、遠藤千穂、大瀧貴之

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-010751

出願年月日：2015 年 1 月 22 日

国内外の別：国内

名称：細胞培養用支持体と、それを用いた細胞培養方法

発明者：田中賢、干場隆志、他 5 名
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014-214456
出願年月日：2014 年 10 月 21 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

【受賞】

・2015 MRS Fall Meeting & Exhibit Best Poster Award Nominee

・第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 ハイライト講演(丸山寛花、干場隆志、佐藤一博、田中賢「中間水を有する高分子基板による軟骨細胞の形態制御を通じた機能維持の試み」)(supervisor として)

・第 64 回高分子討論会 優秀ポスター賞(丸山寛花、干場隆志、佐藤一博、田中賢「中間水を有する高分子により軟骨細胞の形態を制御する培養基板の開発」)(supervisor として)

・第 44 回医用高分子シンポジウム学生奨励発表 優秀賞(丸山寛花、干場隆志、佐藤一博、田中賢「軟骨細胞の機能維持を目的とした中間水を有する合成高分子培養基板による接着形態制御」)(supervisor として)

・2015 年帝人 21 世紀フォーラム 優秀賞(根本絵梨、干場隆志、佐藤一博、田中賢「水和構造の異なる合成高分子上へのタンパク質吸着の制御による幹細胞機能の制御～再生医療用培養基板の創製に向けて～」)(supervisor として)

・第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 ハイライト講演(根本絵梨、干場隆志、佐藤一博、田中賢「中間水量の異なる PMEA 類似高分子上へのタンパク質吸着の制御による幹細胞機能の制御」)(supervisor として)

【ホームページ】

<http://th-lab.wixsite.com/matrix-eng>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

干場 隆志 (Takashi, Hoshiba)

山形大学・有機材料システム研究推進本部・

プロジェクト教員(准教授)

研究者番号：00469769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉弘彩乃 (Ayano, Yoshihiro)

山形大学・工学部・技術職員

古澤宏幸 (Hiroyuki, Furusawa)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

田中賢 (Masaru, Tanaka)

九州大学・先導化学物質研究所・教授