

分担研究報告書

細胞工学技術による高機能Scaffold開発

分担研究者

大阪大学産業科学研究所 特任助教授 (常勤)

齋藤 敬

研究要旨

我々の独自技術である高効率細胞膜穿孔法は、細胞内への新規な物質導入法として、既存法では不可避であった導入分子量の制約や細胞死の頻発を大幅に改善している。現在までは付着性の細胞一個単位を対象に技術を実証してきたが、脳循環系の細胞治療に適した細胞標識化ないし細胞改変を行えるよう、本年度は付着性の細胞集団への大規模物質導入、また浮遊細胞への膜穿孔法の適用を試み、有意な成果を得た。今後両者を統合し、血球系細胞の大規模改変スキュフォールド開発に繋げる予定である。

A. 研究目的

わが国が直面している高齢化社会において、要介護者発生原因の40%以上を占める脳血管障害や認知症など中枢神経障害に対する有効な治療法の開発は緊急の課題である。しかし神経系幹細胞を用いた様々な研究において、単なる神経幹細胞移植では治療効果が不十分であり、血管系の修復が必要である旨が臨床試験などにおいても明らかにされつつある。本研究全体の主たる課題である脳梗塞の修復を目的とした神経幹細胞移植に適した血管新生網の開発、及び移植治療に適した神経幹細胞の開発に対し、その修復過程の評価や治療能力の向上のため、幹細胞への新たな機能付与を行う高機能スキュフォールドを分担している。その核として、我々は従来の機械的・光学的細胞膜穿孔では困難であった、細胞死を引き起こしにくい細胞膜穿孔法を発見し、細胞機能の任意の改変を目指した新しい分野への応用を進めている。この細胞膜穿孔技術は、化学反応による細胞膜穿孔であり、細胞に対する作業の精度が低くとも実施可能である。この点が既存の穿孔法と異なり、本質的に大規模化に適した技術である。我々は現在までの成果として、マイクロインジェクション法にこの化学的な膜穿孔を応用し、注入処理後3日目に約9割の生存率を達成した(T.K. Saito et al., *Biotechnol. Lett.*, Vol. 24, 2002, pp. 309-314)。

図1に運用例を示す。更に機能性色素、抗体、メッセンジャーRNAをラット神経系の細胞に注入し、細胞の生存および注入した物質の機能が維持されていることも実証している (Ryoji Yano et al., *NeuroReport*, Vol. 13, 2002, pp. 1263-1266)。なお細胞集団を対象とした物質導入法として、競合技術としてはウイルスベクター等の生物学的な物質導入法が挙げられるが、臨床適用時の生理活性が予測しきれない点から非生物学的な手段が見直されているのが現状である。化学的な穿孔原理に基づくその他の利点として、物理的細胞膜穿孔法では不可欠な穿孔材料先端の鋭さ、穿孔材料の強度は不要である。このため、安価に作成可能でかつ低精度な自己組織化ナノ材料でも膜を穿孔しうると予想されていた。

このような準備状況から、脳循環系の細胞治療に適した細胞標識化ないし細胞改変を具体化すべく、本年度は(1)付着性の細胞集団への大規模物質導入、また(2)浮遊細胞への膜穿孔法の適用を試みた。以降、共通する事項以外は(1)、(2)の2系統に分けて記述する。

B. 研究方法

本研究においては、外部より適宜制御された酸化を誘発するために、Terthienyl系光増感剤を適用、また穿孔処理対象としてラット副腎髄質細胞腫PC12(理研細胞開発銀行より購入)を使用している。細胞膜穿孔の評価には、水溶性蛍光色素 Lucifer Yellow CH (Molecular Probes)の細胞内への滲入を利用した。なお細胞の培養には NeuroBasal medium + B27 supplement による無血清培地 (Invitrogen)を利用した。穿孔対象とする細胞は、ディッシュ上に初期密度 140 cell/・1で3ml滴下し継代培養を行い、(1)では3~4日経過したディッシュ上の細胞をそのまま、(2)では2~3日経過したディッシュから細胞を培地1mlで洗浄後、更に培地1mlに剥離・再分散したものを使用した。以下に装置や作業内容の詳細を述べる。

(1) 自己組織化ナノロッドによる細胞膜穿孔細胞膜穿孔体として今回はパル

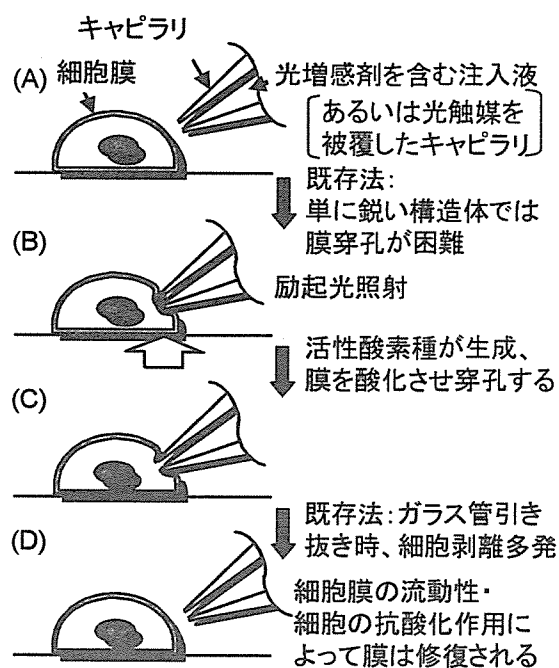
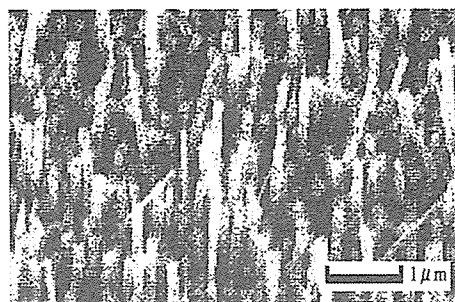


図1: 光増感利用マイクロインジェクション

スレーザー蒸着法(PLD法)を用いて作成された酸化亜鉛(ZnO)ナノロッドを穿孔材料とし、細胞膜穿孔操作を行った。

このナノロッド成長機構は金を核としたVLS(Vapor-Liquid-Solid)成長に基づき説明できると考えられ、ロッド先端に多く含まれる金に対して、硫黄を含むチオフェン系光増感剤を自己組織化修飾することが可能である。図2にロッドの写真及び α -Terthienyl修飾の模式図を示す。この修飾基板によって0~140g/cm²の範囲の圧力で培養ディッシュ上の付着状態にあるPC12群を圧迫し、増感剤を励起する光照射を行った。基板の光増感



ZnOロッド: 径200-300nm[細径]
: 径500-600nm[太径]

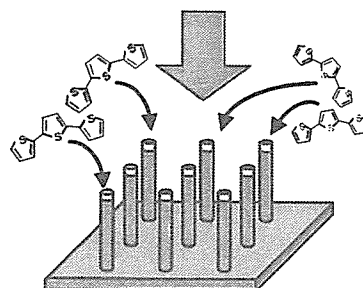


図2: α -Terthienyl 結合ナノロッド

剤による修飾プロセスとしては、2mM α -Terthienyl メタノール溶液中にロッド基板を2時間静置し、自己組織化により修飾を行う。修飾処理後、純水で基板を洗浄し乾燥、保管する。基板は倒立蛍光顕微鏡(オリンパスIX70)上で運用し、穿孔用の光源は顕微鏡標準装備の100W水銀ランプである。具体的な手順としては、ディッシュ中の培地を細胞培地から培地に水溶性光増感剤ビスアミノメチルターチオフェン(BAT)

100 \cdot Mと蛍光マーカーLucifer Yellow 2mMを混合した液に置換し、膜穿孔基板を細胞に接触・加圧し増感剤を光励起する。膜穿孔が達成されれば、細胞内がLucifer Yellow由来の蛍光を示すことになる。適用した基板の面積は約0.5cm²であり、35g、70gの錘を基板上に静置して加圧を行った。

図3に以上の穿孔試験の模式図とフローチャートを示す。また従来、細胞集団の定量評価は浮遊細胞にセルソーター

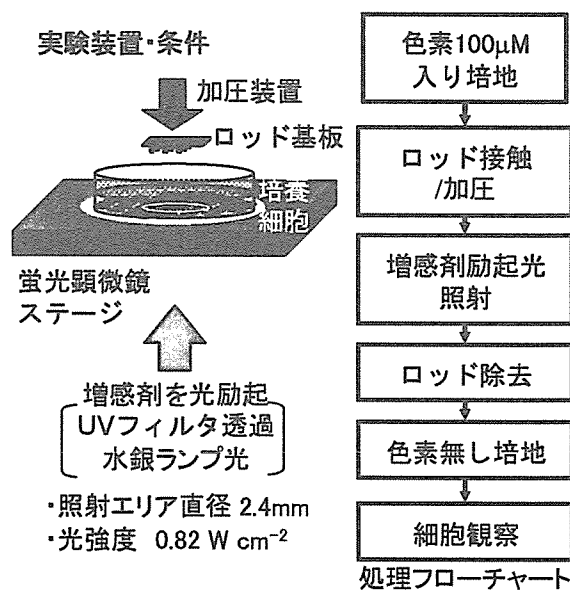


図3 自己組織化ナノロッドによる細胞膜穿孔の大規模化試験

を適用するといったケースに限られ、ディッシュ上に付着したままの細胞の改変効率について定量評価はほとんど検討されていない。このような細胞集団を対象とした穿孔の定量評価を行うべく、画像解析ツールImageJにより、顕微鏡による透過像と蛍光像の解析を行った。標準サンプルとして色素導入効率がほぼ100%に近かったZnOナノロッド 500-600nm直径、70g/cm²加圧、60秒光照射条件の透過光写真、蛍光写真をモデルに、細胞の占める面積を導出した。図4に処理例を示す。ImageJの画像処理機能のうち、エッジ強調→二値化→粒子解析でほぼ細胞部分の分離に成功したため、透過光での細胞面積と蛍光での色素導入細胞面積を比較し、定量評価を行った。なお図4の点線枠内を十字線で仕切った各象限毎に細胞の投影面積と、蛍光染色された細胞の投影面積を計算し、4象限の平均をグラフ化した。

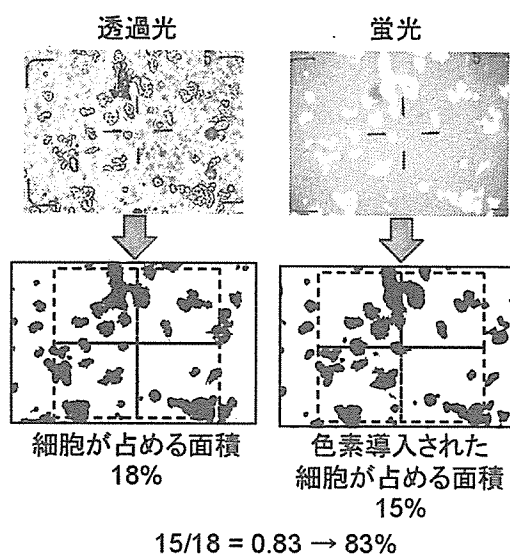
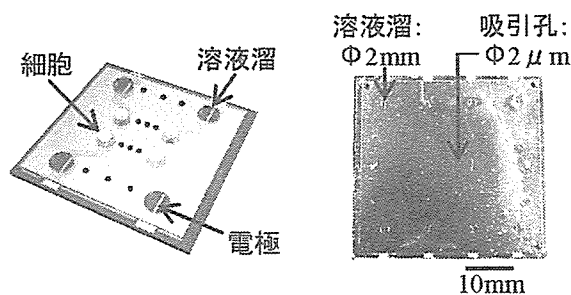


図4 細胞集団対象膜穿孔の定量評価例

(2) 平面パッチクランプ法互換デバイスとして、微細加工処理を行ったシリコン基板を作成した。基板の詳細を図5に示す。デバイス表面の孔は内部に独立した吸引・灌流用配管を持つため、シリンジを配管に接続し孔内部の減圧が可能で、浮遊状態にあるPC12細胞をデバイス表面の孔に吸着して使用する。なお将来的な電気生理実験への拡張に備え、吸引孔内に金電極も併設されている。デバイスは正立蛍光顕微鏡（オリンパス BX51WI）に設置し、電動マイクロマニピュレータ（Eppendorf NI）による細胞操作を併用して評価を行った。穿孔用の光源は顕微鏡標準装備の100W水銀ランプである。なおデバイスは立命館大学マイクロ機械システム工学科小西研究室が細胞膜穿孔に必要な仕様に合わせ作成し、共同研究を実施した。



- ・光増感剤による化学的細胞膜穿孔
→ 可逆性・低侵襲
- ・パッチクランプ法のような陰圧による膜穿孔においては、穿孔後すぐに吸引を停止しなければ、細胞内部を吸い出して破壊してしまう。
→ 個別の吸引孔毎に精密な圧力制御が必須で実現困難。しかし化学法ではより安全に大規模化可能

図5 平面パッチクランプデバイス

具体的な手順としては、細胞吸着後に、配管内の液を細胞培地から培地に水溶性光増感剤ビスアミノメチルターチオフェン(BAT) 100・Mと蛍光マーカー Lucifer Yellow 2mMを混合した液に置換し、増感剤を光励起する。膜穿孔が達成されれば、細胞内がLucifer Yellow由来の蛍光を示すことになる。

(倫理面への配慮)

現段階ではいずれもラット株化細胞を対象とした実験であり、特に倫理面に配慮する必要はない。

C. 研究結果

(1) 図6にディッシュ上のPC12細胞群に対するナノロッド適用写真を示す。全体として従来の一細胞を対象とした光化学細胞膜穿孔と同様に、光増感剤と励起光存在下で細胞外のLucifer Yellowが細胞内に取り込まれ、細胞集団を対象に細胞膜穿孔が達成された結果が得られている。個々の条件

について述べると、500-600nm径ロッド適用時の特長として、加圧70g/cm²、光照射なしでは色素導入はほぼ認められない一方、同照射30秒時点での細胞への色素導入効率はほぼ100%であった。加圧140g/cm²では同様な穿孔が認められるが、細胞が減少した。また、200nm径ロッドの特長として、加圧70-140g/cm²で膜穿孔が認められたが、光照射の時間依存性はほぼ認められなかった。以上の傾向について画像解析による定量評価を行った結果を図7に示す。グラフにIで表記した投影面積の幅は、各光照射時間における計測領域第一～第四象限の投影面積比の最小～最大幅である。なお一部、幅の上限が100%を超えているが、これは特に透過光写真において細胞輪郭を撮影画像毎に均一な条件で自動抽出処理した結果、画像中の個々の象限のデータとしては輪郭抽出後の細胞投影面積が一部小さめに認識されたことが原因である。またディッシュ上の各象限における細胞数のば

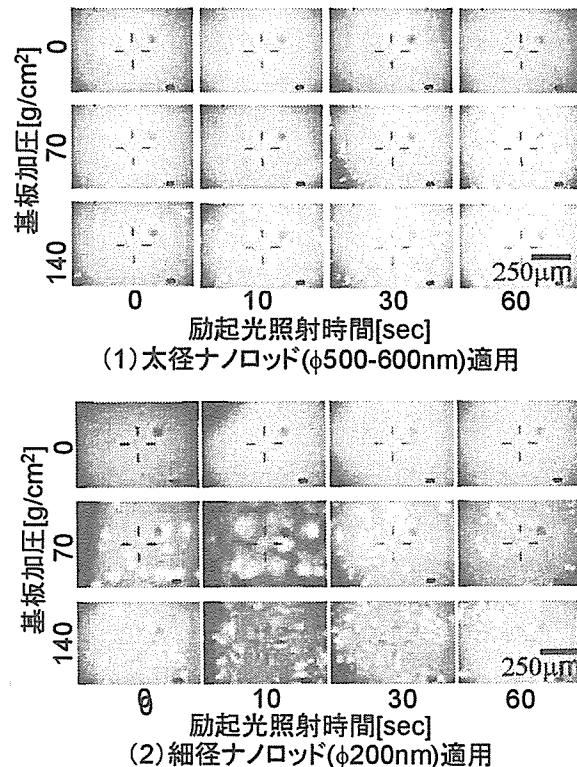


図6 ロッド基板加圧条件・光増感剤励起時間による膜傷害の差

らつきも、投影面積の幅に大きく影響している。しかしながら全象限の平均値としては有意な傾向を把握できた。

(2) デバイス作成に成功し、光化学穿孔を試みた結果、吸引孔周辺の細胞に膜穿孔に伴うLucifer Yellowによる染色が確認された。特に細胞と吸引孔の吸着が良好であった場合、複数の細胞が密着した状態であっても、吸引孔の直上にある細胞のみ染色が認められた。またマイクロマニピュレータによって、蛍光染色された細胞を吸引口から移動させることが可能であり、かつ移動後も蛍光が維持された。図8にデバイス運用の各段階と、対応する写真を示す。

D. 考察

(1) 光化学反応による細胞膜穿孔には、光量依存性、光増感剤の細胞との距離の依存性という2つの特長がある。この点、直径500-600nmナノロッドで光化学的な穿孔の特長が見られ、直径200nmナノロッドでは光量依存性はなく、機械的な穿孔の特長を示した。これは近年Han, Knoblauchらが報告している数百nm径の微小構造体による機械的な細胞膜穿孔と同様の現象と推定される (Han SW. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 332, 633-639, 2005; M. Knoblauch et al., Nature Biotechnol. 17, 906-909, 1999)。ただし機械的な細胞膜穿孔は一時的に達成できても、その後の細胞生存率を保つためには膜穿孔体の円柱部テーパ角が0度かつ先端部が平坦である等、高精度な構造体での穿孔が必要であることが明らかになってきている。この点、形状にばらつきが避けられない自己組織化ナノロッドによる膜穿孔で

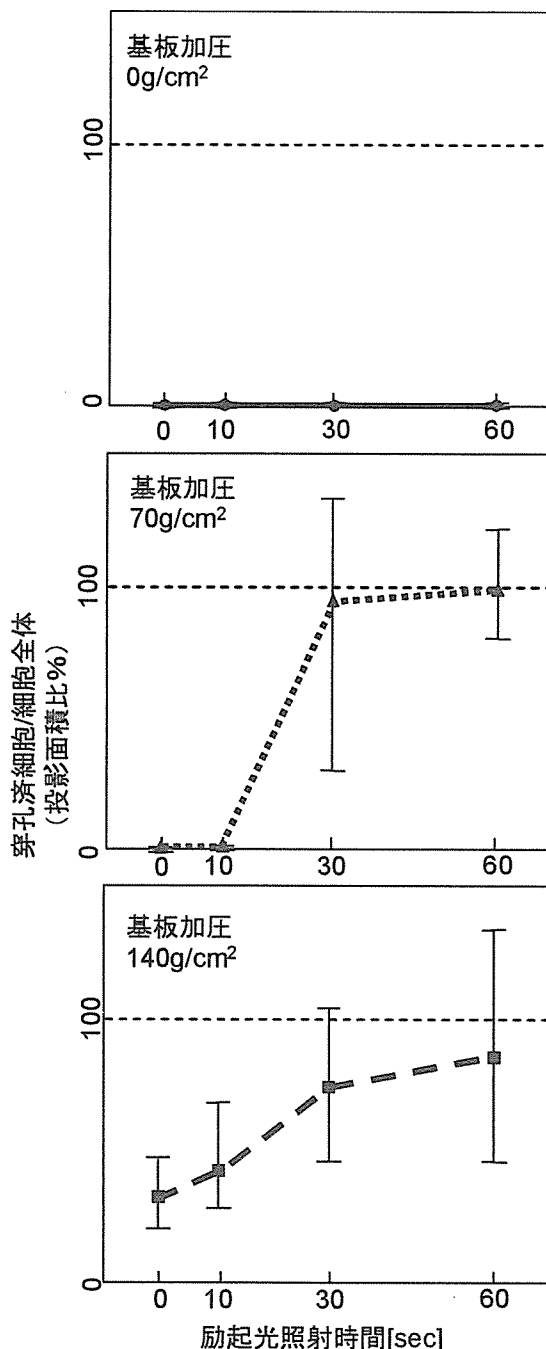


図7 細胞集団に対する膜穿孔処理効率
(1)太径ナノロッド(ϕ 500-600nm)適用

の細胞生存率については、今後慎重な検討が必要と考える。また加圧140g/cm²での細胞減少は、光化学反応による剥離性の向上以上に細胞と基板が過剰に密着し、基板除去時に細胞がディッシュ表面から剥離している可能性がある。また定量評価について、現状はプロットのばらつきが大きい、先に述べたとおり自動輪郭抽出処理のわずかな差で大きな面積差が生じてしまった点が挙げられる。これに加え、本質的に透過光での細胞面積の自動抽出が困難である点、染色された細胞の蛍光強度が一律でない点が影響していると考えられる。具体的な対策として、膜穿孔評価用の蛍光染色に加え、細胞全体を他の蛍光色素で染色し、不明瞭な透過光を利用せず二重蛍光染色によって細胞と穿孔済細胞の明確化が可能と考える。また細胞毎の蛍光強度の差を考慮せず、染色・非染色の2値化処理を行ったが、今後は蛍光強度も含めた解析を行うことで、定量評価の改善に繋がると考える。

(2) 膜穿孔用の光増感剤は吸引孔から多少は拡散するため、吸引孔が細胞で密閉されない場合には孔周辺の細胞が穿孔されることは

予想されていた。また、既存のパッチクランプ法では細胞膜を管状デバイスで局所的に吸引し、その箇所を吸い抜く。このため管状デバイスと細胞が過度に密着し、細胞をデバイスから剥離できない問題があった。ガラスキャピラリーを細胞に刺入するマイクロインジェクションでも、キャピラリーと細胞が密着し、剥離できない問題点は同様に認められている。これに対し、本法では膜穿孔後の細胞をデバイスから剥離、移動出来ている。現在までマイクロインジェクシ

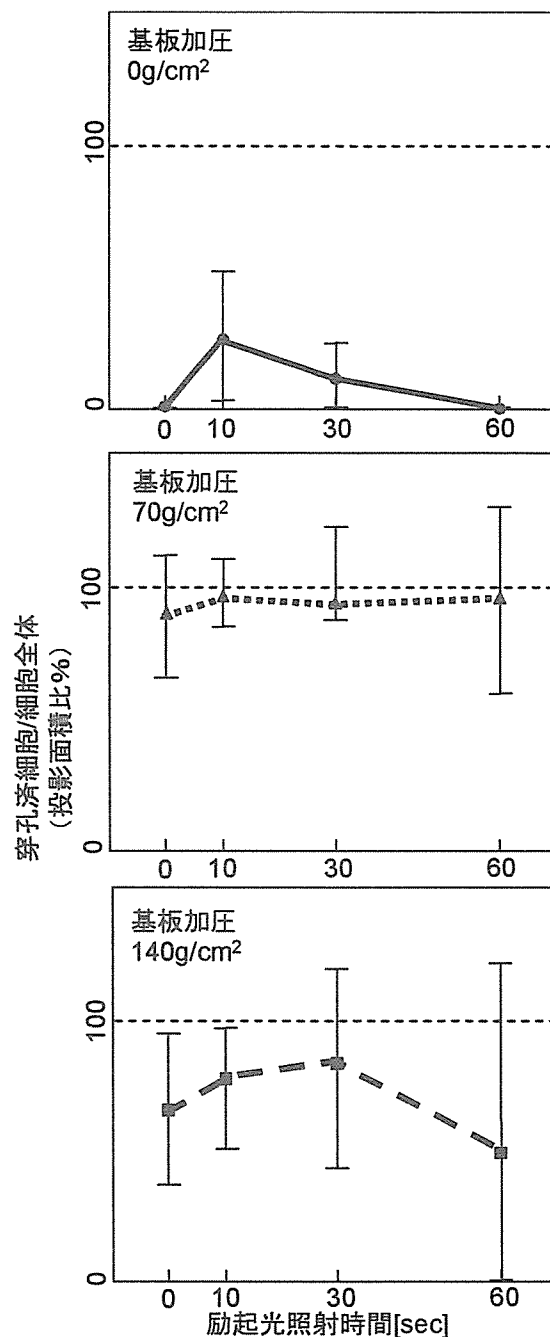


図7 細胞集団に対する膜穿孔処理効率 (2) 細径ナノロッド(φ200nm)適用

ョンで達成されてきた光化学的な細胞膜穿孔でも、キャピラリと細胞の剥離性の良さは確認されており、その特長は維持されている。この特長から血球系細胞のような浮遊細胞の膜を固体デバイス上で穿孔し、その後に細胞を再度液中に浮遊させることが可能と考えられ

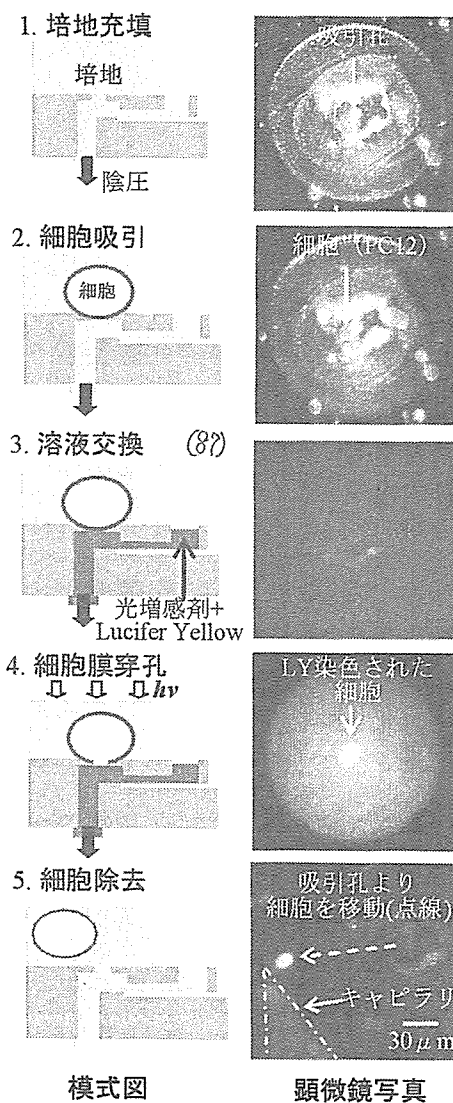
る。この良好な剥離性には、本来軽油のような流動性を有する細胞膜に対し、膜脂質の局地的な酸化により膜の流動性を低下させているのが原因と考えている。なお良好な剥離性は細胞膜の酸化傷害と同時に生ずるため、最終的に傷害が修復されるにせよ、酸化傷害が細胞に誘起されていることを考慮しつつ適用範囲を探る必要がある。

E. 結論

(1) 自己組織化材料による光増感細胞膜穿孔を試みた結果、光増感法に特有の光量依存性、圧力依存性が認められた。また今後の膜穿孔処理細胞の生存率等評価への端緒として、画像解析による定量的な評価にもある程度の目処を付けた。

(2) 浮遊状態の細胞に対し、吸引固定を行った上で細胞膜穿孔法の適用を可能とした。特に既存のパッチクランプ法において困難であった、細胞膜穿孔後に細胞を改変媒体から切り離せる点は、浮遊細胞の改変とその後の臨床適用に道を拓くものである。

以上、今回は酸化亜鉛やシリコンといった硬質材料を母材とした膜穿孔を行ったが、目的でも述べたとおり穿孔原理は酸化反応であり、材料の硬度や形状精度への依存性は低いと考えられる。既に一細胞対象実験から、光増感法は細胞の長期生存率に優れる結果が得られている。今回、加えて大量の細胞処理、浮遊細胞への適用の可能性が示され、今後の展開としては穿孔処理細胞群の長期生存率評価を行い、量産性に優れたスキャフォールドによる血球系細胞の大規



模式図 顕微鏡写真
図8 デバイス運用例

模改変に繋げる予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

『光酸化的な細胞膜穿孔機能を付加した自己組織化ナノロッド』

齋藤 敬, 関 宗俊, M. A. El-Maghraby, 大石聡司, 田畑 仁

2006年春期 第53回応用物理学関係連合講演会 24p-I8

武蔵工業大学, 2006. 3. 22. -26.

『光酸化機構による細胞膜穿孔ナノロッドの特性解析』

齋藤 敬, 関 宗俊, 藤村 哲也, Supab Chooapun, 田畑 仁

2006年秋期 第67回応用物理学会学術講演会30a-RB-6/ III

立命館大学, 2006. 8. 29. -9. 1.

『高効率細胞加工に向けた自己組織化ZnOナノ構造の作製』

関 宗俊, 藤村 哲也, 齋藤 敬, Supab Chooapun, 田畑 仁,

2006年秋季第67回応用物理学会学術講演会

立命館大学, 2006. 8. 29. -9. 1.

“High-efficiency cell membrane perforation technique based on self-organized ZnO nanorods.”

Seki M, Saito T, Tabata H.

2006 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2006)

Sept. 12-15, Yokohama, JAPAN

“Self-assembled Oxide Nanorods and Their Applications to Bio Systems.”

Seki M, Saito T, Tabata H.

第5回 大阪大学産業科学研究所21世紀COEプログラム国際シンポジウム 「新産業創造指向インターナノサイエンス」

淡路島, 2006. 12. 8-9.

“Photodynamic Perforation of Cell Membrane on Micro Channel Array

toward Intracellular Technology”

Iso K, Saito T, Muguruma H, Tabata H, Konishi S.

20th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems
(MEMS 2007 Kobe)

January 21 - 25, 2007, Kobe, JAPAN

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

分担研究報告書

軟骨細胞三次元培養におけるグリコサミノグリカン関連糖の添加効果

分担研究者

北海道大学大学院 工学研究科 教授
高木 睦

研究要旨

軟骨細胞の三次元培養におけるグルクロン酸(GlcA)と N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)の添加を検討した結果、II型コラーゲン蓄積に効果があることが判明した。

A. 研究目的

関節軟骨は軟骨細胞とそれらが生産するII型コラーゲン、アグリカンなどの細胞外マトリックスによって構成される自己修復能力の非常に乏しい組織である。このアグリカンはコアタンパク質とそれに結合するグリコサミノグリカン(GAG)糖鎖から成り、GAGの中でも軟骨には、グルクロン酸(GlcA)と N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)の繰り返し構造が硫酸化されたコンドロイチン硫酸(CS)が最も多く含まれている。関節軟骨の欠損に対する細胞治療法として、他部位の軟骨小片を患者に移植するモザイク移植法や軟骨小片から分離した軟骨細胞を増殖させて移植する方法があるが、移植片の大きさに限界がある、増殖中に軟骨細胞が脱分化するなどの問題点がある。そこで、近年患者本人の間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させ、更に分化により得られた軟骨細胞を用いてII型コラーゲングルなどを細胞担体とする三次元培養を行い、軟骨組織を再生する治療法が注目されている。この三次元培養においてはII型コラーゲンやアグリカンの蓄積量を増加させることが組織移植後の早期再生のために重要であり、線維芽細胞増殖因子(FGF)、形質転換成長因子(TGF)、骨由来成長因子(BMP)などのサイトカインの添加効果が数多く調べられている。一方、GlcA や GalNAc など安価な GAG 関連糖の影響についてはほとんど調べられていない。そこで、II型コラーゲングルを用いたブタ初代軟骨細胞の三次元培養において細胞外マトリックスの生産に対する GAG 関連糖添加の効果を検討することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

ブタ大腿骨関節から分離した初代軟骨細胞をウシ胎仔血清、アスコルビン酸リン酸などを含むMEM培地を用いて三次元培養した。すなわち、軟骨細胞(1×10^7 cells/mlゲル)を含む□型アテロコラーゲン65 μ lを96マルチウェル (0.32 cm^2) 中に注入し37度で30分間ゲル化させた後、GlcA (5、50、500 mg/l)、GalNAc (5、50 mg/l)、CSC (10、100、1000 mg/l)を添加した上記培地を260 μ l重層し、37□、5% CO_2 雰囲気下で三次元培養を開始した。24時間後、ゲルを24マルチウェル (1.8 cm^2) に移し、GAG関連糖を含む培地1.8 mlを加えて、さらに3週間培養した。培地は1週間毎に全量交換し、培養終了後、細胞密度 (トリパンプルー法)、グルコース消費速度、アグリカン蓄積量 (DMMB法)、II型コラーゲン蓄積量 (ELISA法)、II型コラーゲンとアグリカンのmRNA発現量 (定量的RT-PCR) を測定した。

C. 研究結果

GlcA、GalNAc、CSC を添加すると、三次元培養後の細胞密度は少し増大するものの、アグリカンの蓄積にはほとんど影響を及ぼさなかった。一方、GAG関連糖の添加によりII型コラーゲン蓄積量は顕著に増大し、GlcA (50、500 mg/l)およびGalNAc (5、50 mg/l)で約6倍となった。GlcAとGalNAcの同時添加における相乗効果は認められず、GlcAとGalNAcに比べてCSCの添加効果は小さく不安定だった。さらに、II型コラーゲンのmRNA発現はGlcA、GalNAc、CSCの添加により明らかに促進されていた。

D. 考察

グルクロン酸(GlcA)とN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)がII型コラーゲン遺伝子発現を促進する作用機作を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

軟骨細胞の三次元培養による軟骨再生プロセスにおいて、GlcAやGalNAcの添加は有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

“High Inoculation Cell Density Could Accelerate the Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocyte Cells.”

Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, Wakitani S.

J. Biosci. Bioeng. in press.

『バイオテクノロジーの基本技術 2. 1 動物細胞の形質転換と培養』
実験化学講座 第5版 29巻 (共著) (編集 今中 忠行)
ISBN 4-621-07328-1 C 3343 丸善 2006.7.25
別刷なし

『バイオプロダクション—ものつくりのためのバイオテクノロジー』
化学工学会バイオ部会 (代表者 大阪大学 大竹 久夫)
6章 培養技術 6.3 tPA 生産
ISBN 4-339-06736-9 コロナ社 2006.5.26
別刷なし

2. 論文発表

日本再生医療学会 P-026 (要旨集P.187)

『顕微鏡画像による間葉系幹細胞からの軟骨細胞への分化度診断の試み』
高木 睦, 近藤 真一, 小泉 覚, 梅津 洋介, 藤原 政司, 脇谷 滋之
岡山, 2006.3.8-9

日本再生医療学会 O-17-1 (要旨集P.144)

『交互汚染無く多患者対応可能な自動細胞培養装置モデルの試作』
高木 睦
岡山, 2006.3.8-9

3. その他(シンポジウム・招待講演)

日本生物工学会 年会 1K10-3 (要旨集P.192)

『間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導における播種細胞密度の影響』
梅津 洋介, 藤原 政司, 脇谷 滋之, 高木 睦
大阪, 2006.9.11-13

日本生物工学会 年会 1K09-3 (要旨集P.191)

『位相シフトレーザー顕微鏡を用いた接着動物細胞の非侵襲的な立体形状測定法開発』
伊藤 俊輔, 徳田 彰男, 藤原 政司, 高木 睦
大阪, 2006.9.11-13

日本生物工学会 年会 3K11-4 (要旨集P.206)

『魚血清を利用した CHO 細胞の接着培養法の検討』

塚田 亮平, 藤原 政司, 高木 睦

大阪, 2006.9.11-13

日本生物工学会 年会 1K10-2 (要旨集P.192)

『軟骨細胞三次元培養におけるグリコサミノグリカン関連糖の添加効果』

鍵田 恵梨奈, 藤原 政司, 脇谷 滋之, 高木 睦

大阪, 2006.9.11-13

日本生物工学会 年会 1K09-4 (要旨集P.191)

『フェムト秒レーザーを利用した単一接着細胞の遺伝子発現解析』

北林 孝之, 上野 貢生, 三澤 弘明, 細川 陽一郎, 増原 宏, 脇谷 滋之,
藤原 政司, 高木 睦

大阪, 2006.9.11-13

日本生物工学会 年会 シンポジウム 1C-PM2 (要旨集P.45)

『接着動物細胞の形態解析による非侵襲的分化診断の試み』

高木 睦

大阪, 2006.9.11-13

(社)化学工学会北海道支部第9回技術懇談会

『再生医療実用化のための生物化学工学：セルプロセッシング工学』

高木 睦

札幌, 2006.4.25

第16回化学工学・粉体工学研究発表会 特1 (要旨集P.42)

『再生医療実用化のための技術的課題』

高木 睦

札幌, 2007.1.26-27

H. 知的財産権の出願・登録状況

高木 睦

1. 特許取得

特願2006-144698

発明の名称：軟骨細胞培養用の培地組成物と培養組成物

発明者：高木 睦、鍵田恵里奈

出願人：国立大学法人 北海道大学

出願日 : 2006.5.24

2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

分担研究報告書

ハニカムフィルム開発

分担研究者

国立循環器病センター研究所 先進治療機器開発室 室長
西川 雄大

研究要旨

既存の多孔性高分子薄膜の作製に用いられる両親媒性高分子（ポリアクリルアミド誘導体）を新たに合成し、これを用いたフィルム作製を行った。本手法により、ポリ乳酸およびポリε-カプロラクトンから多孔性薄膜（ハニカムフィルム）を作製できた。このハニカムフィルムを一軸延伸し、ライン状パターンを付与した細胞培養基材を作成することに成功した。このハニカムフィルムをコラーゲン水溶液に浸漬することで、細胞接着性の向上を図った。ハニカムフィルム上で間葉系幹細胞を培養し、間葉系幹細胞シートを得ることに成功した。

A. 研究目的

中枢神経障害に対する細胞移植治療の新たな試みとして、新生血管網を中心とした血管再構築に基づく神経（幹）細胞の生理的な生着および成熟が着目されている。本研究ではティッシュエンジニアリング的手法に基づき神経幹細胞と血管内皮前駆細胞の共培養細胞シートを作製し、これを障害部位に移植することで血管再構築と神経組織の再生を同時に図ることを目標とする。今年度は、細胞培養マトリックス材料としてマイクロメーターサイズの細孔が規則的に配列した多孔性フィルム（ハニカムフィルム）を用い、間葉系幹細胞からなる細胞シートの作製を試みた。

B. 研究方法

多孔性高分子薄膜は高分子（ポリε-カプロラクトンと両親媒性ポリアクリルアミド）の希薄溶液を水面上に展開し、これに高湿度空気を吹き付けることにより作製した。得られた多孔性フィルムを水面上で一軸に延伸し、ライン状パターン化処理をフィルムに施した。このフィルムをテフロンフレームに移し培養基材とした。次に、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（Cambrex 社より購入）を延伸多孔性薄膜の表面に播種し、専用培地中で2週間培養した。さらに、細胞接着性を向上する目的で、コラーゲン（I型）を物理吸着によりハニカムフィルム上に固定化した。

C. 研究結果

ポリ ϵ -カプロラクトンと両親媒性ポリアクリルアミドのブレンド溶液を水面上に展開し、高湿度空気を吹き付けることにより、孔径5マイクロメートル程度の細孔がハニカム状に配列した多孔性フィルムが得られた (図1 (a))。さらに、このフィルムを一軸に延伸することで、細孔の形状が一方向に伸び、ライン状のパターン構造を誘起することができた (図1 (b))。ハニカムフィルムを0.02% コラーゲン水溶液中に浸漬することで、ハニカム構造表面にコラーゲンを固定化することができた (図2)。

この延伸多孔性フィルム上でヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を培養した。その結果、hMSCはパターン化多孔性フィルムに接着、ラインにパターンに沿って伸展することが明らかとなった (図3)。また、hMSCはこの培養基材上で増殖し、高密度の配向化細胞シートを形成することが明らかとなった。

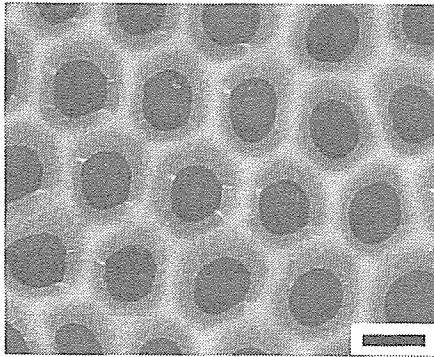
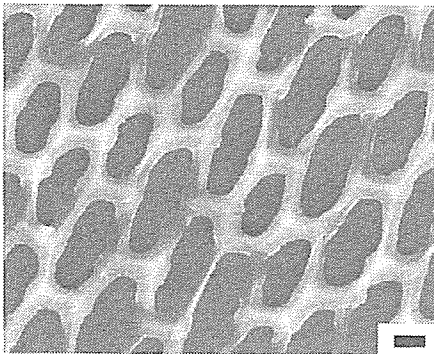


図1 ハニカムフィルム (左) および延伸ハニカムフィルム (右) の走査型電子顕微鏡イメージ。スケールは5 \cdot m。



(98)

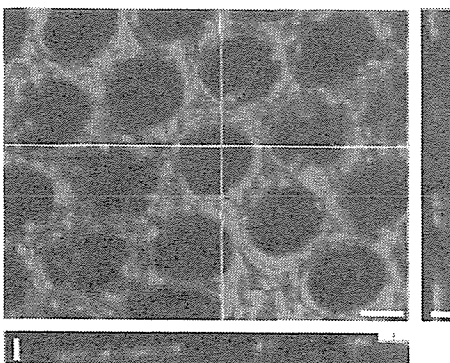


図2 コラーゲン固定化ハニカムフィルム (共焦点レーザー顕微鏡イメージ)。抗 Type-I コラーゲン抗体および Oregon green488 ラベル化二次抗体”により、ハニカムフィルムに吸着したコラーゲンを検出した。スケールは3 \cdot m。

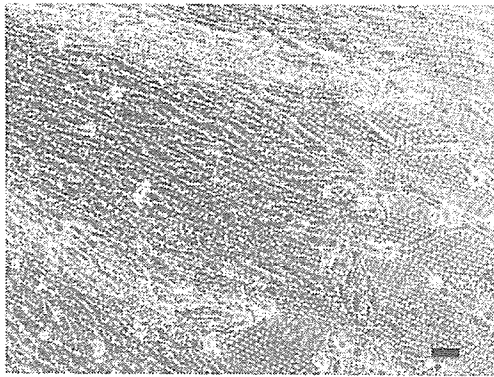


図3 延伸ハニカムフィルム上で培養した間葉系幹細胞 (hMSC) (位相差顕微鏡イメージ)。hMSCは細孔の長軸方向に沿って配向し伸びた形状をとるとともに、増殖することで高密度な組織を形成した。スケールは50・ μ m。

D. 考察

本研究により、hMSCは延伸多孔性フィルム上で高密度配向化細胞シート組織を形成することが明らかとなった。hMSCはパターン化細胞培養基材上で培養することで、脂肪細胞および骨芽細胞等に分化することが報告されている。一方、延伸ハニカムフィルム上で、hMSCはどのような分化マーカーを発現しているのだろうか。hMSCの成長培地であるMSCGMを用いた予備実験の結果によると、神経細胞、心筋細胞に特異的な分化マーカーの有意な発現は見られなかった。このことから、培養基材の表面構造のみならず使用する培地の組成なども含めて培養条件を再検討する必要があると示唆された。

E. 結論

延伸多孔性フィルムを培養基材として用いることで、ヒト骨髄間葉系幹細胞の高密度配向化細胞シートを作製することが可能であることを見出した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

“Amphiphilic Poly(*N*-propargylamide) Having Galactose and Lauryloyl Groups”

Suenaga M, Kaneko Y, Kadokawa J, Nishikawa T, Mori H, Tabata M.
Macromolecular Chemistry and Physics. 6, 1009-1018, (2006).

2. 学会発表

「細胞足場材料の創製」：臨床医工学・情報科学技術者再教育ユニット・
バイオマテリアル学コース/先端バイオマテリアル

西川 雄大

大阪, 2006. 2. 10

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

掲載論文一覧表