

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福田 淳二

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発 ----- 1

福田淳二

II. 分担研究報告

1. 細胞シートの移植と血管内皮細胞との共培養 ----- 7

蛭沢克己

2. 2液混合型ゼラチンハイドロゲルの作製 ----- 18

伊藤大知

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 32

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発

研究代表者 福田 淳二 横浜国立大学 大学院工学研究院

研究要旨

本研究では、電気化学的な原理を用いて、細胞シートを培養表面から素早く脱離する独自技術を提案している。特に、ナノ孔を有するメンブラン上へこの技術を応用し、厚みのある細胞シートの作製・積層化を実現する。当該細胞脱離のメカニズムには、金-チオール結合によって培養表面に結合させたオリゴペプチドが電気化学的に還元され脱離する現象を利用している。研究2年目である平成24年度は、電気化学的な細胞脱離に利用するオリゴペプチドについて、静電的な相互作用により自己組織化する配列を2次構造の形成の観点から分子動力学計算により選別し、さらに実験的に最適な配列を決定した。一方、多孔質メンブラン上で形成させた厚みのある細胞シートをヌードマウスに移植することでプロセスの安全性を示した。また、細胞シートの取り扱いを容易にするために、膨潤を低減したゼラチンベースの2液混合型ハイドロゲルを作製した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

蛭沢克己・名古屋大医学部 病院助教

伊藤大知・東京大医学部 准教授

A. 研究目的

近年、日本発のアプローチである細胞シート工学を利用した再生医療が注目されており、臨床試験を含めた精力的な研究が進められている。本研究では、電気化学的原理に基づき、電位印加により培養表面から素早く細胞を脱離する独自技術を提案する。特に、ナノ孔を有するメンブラン上にこの技術を応用し、物質移動を促進した厚みのある細胞シートの形成により、従来にない高度な組織形成を実現する。本研究の

細胞脱離には、金-チオール結合によって培養表面に結合させたオリゴペプチドが、負電位の印加により還元され脱離する現象を利用する（Fig. 1）。すなわち、ペプチドを介して金蒸着メンブラン上で細胞シートを形成・高度化し、ペプチドの還元脱離とともに回収するものである。ペプチドは分解されてもアミノ酸が生じるのみであり、将来の臨床応用においても高い安全性が期待できる。特に従来技術との差別化を意識し、脱離時間の10分の1までの短縮や素早いゲル化が可能なハイドロゲルとの融合などを目指す。

研究期間内に、静電力によって自己組織化し、密な層を形成するオリゴペプチドを設計する。そして、この表面に接着させた

細胞を短時間で電気化学的に脱離させる。特に、酸素拡散の観点からメンブラン上で形成できる細胞シートの厚みを決定するとともに、血管構造導入などの工夫を施し、組織を高度化させた上で脱離・回収する。さらに、作製した細胞シートをゼラチンベースの生分解性水ゲルを利用して転写し、脱離後の細胞シートの操作および移植部位への確実な固定に供する。このようにして作製した細胞シートは、実験動物に移植し、その安全性を実証する。そして、汎用的な研究用ツールとして普及させることが将来的な目標である。

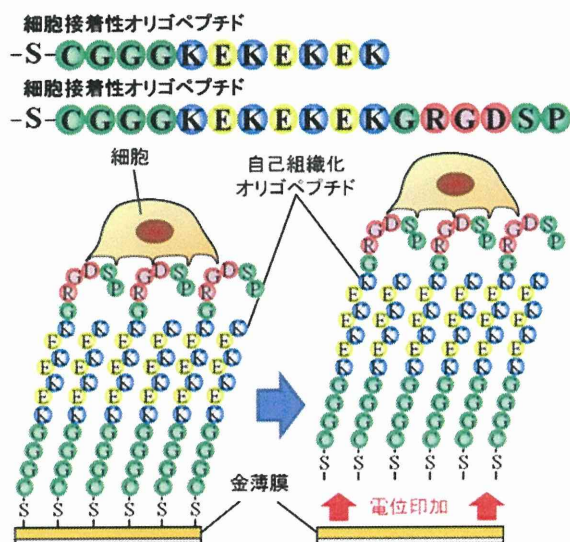


Fig. 1 自己組織化ペプチドを用いた細胞脱離

B. 研究方法

1. オリゴペプチドの設計

電気化学的な細胞脱離を行うためには、金薄膜表面を蜜に覆う分子層の形成が重要である。なぜなら、培地中のタンパクが直接金の表面に非特異吸着すると、電位を印加しても細胞は脱離しないためである。そこで本研究では、金表面に結合するととも

に自己組織化して密な層を形成するオリゴペプチドを設計した。そして、このオリゴペプチドの末端に細胞付着配列を付与することで、タンパクの非特異吸着を抑制した上で細胞を付着させる表面とした。

一般にタンパクの非特異吸着を抑制するためには、表面を親水性にすることが重要であると考えられている。一方近年、両性イオン分子を修飾した表面が良好なタンパク非接着表面として注目されている。例えば、ポリカルボキシベタイン修飾表面へのタンパクの吸着は、SPR測定で検出不可能な程に少ないことが明らかとなっている。こうした、非特異吸着を非常によく抑制する表面は、分子レベルで正負の電荷が中和されていることが重要である。そこで本研究では、このような正負の電荷を交互に有する両性イオン配列を含むオリゴペプチドを設計した。オリゴペプチドの配列は、3つのセグメントに分けてデザインした。つまり、アンカー (C)、スペーサー (PPP、FFF等)、両性イオン部分 (KEKE、KEKEKEKE等) から構成される。そして、分子動力学計算により、これら3つのセグメントの合計80種類の組み合わせについて、二次構造を計算した。この結果、表面で密な自己組織化単分子膜を形成すると予想された4種類 (CPPPKKEKEKEKEK、CFFFKEKEKEKEKEKEK、CFFFKEKEK、及びCFKEKEKEK) について、実験的に、溶液中での二次構造、金表面への吸着量、ペプチド修飾表面の濡れ性、タンパクの非特異吸着抑制能の評価を行った。以上により、タンパクの非特異吸着および細胞接着を強く抑制する配列を設計した。

1.1 実験装置と試薬・材料

【装置】

- Quartz Crystal Microbalance (QCM), AFFINIX QN, Initium 社
- スパッタデポジション装置、CFS-4ES-231、Shibaura Eletec
- 円二色性分散計、J-820 (JASCO 製)
- マイクロスコープ、VHX-S50 (KEYENCE 製)
- 超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)

【試薬・材料】

- カバーガラス
- オリゴペプチド、CPPPKKEKEKEKEK (株式会社スクラム)
- オリゴペプチド、CFFFKEKEKEKEKEKEK (株式会社スクラム)
- オリゴペプチド：CFFFKEKEK, (株式会社スクラム)
- オリゴペプチド：CFKEKEKEK, (株式会社スクラム)
- フィブリノーゲン Sigma-Aldrich Japan

1.2 実験手順

1.2.1 CDスペクトルによる溶液中でのペプチド二次構造の評価

1) オリゴペプチド溶液の調整

0.1 mg/ml のオリゴペプチド溶液 (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK) をそれぞれ調製し、光路長 1 mm のセルにそれぞれ 400 μ l ずつ滴下した。

2) CD スペクトルの測定

円二色性分散計にオリゴペプチド溶液を調製したセルをセットし、190 nm から 250 nm の波長において CD スペクトルを測定した。

1.2.2 QCMによるオリゴペプチド吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

濃硫酸：過酸化水素水=3：1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗

浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面に50 μ Mのオリゴペプチド溶液 (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK) をそれぞれ滴下し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

1.2.3 ペプチド修飾表面の濡れ性の評価

1) 基板洗浄

カバーガラスを25 %アンモニア水：30 %過酸化水素水：純水=1：1：4の沸騰水溶液に5分間浸漬し、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

2) Au/Cr層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを1分間スパッタした。CrはAuの密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。

3)オリゴペプチドの修飾

金基板を50 μ Mオリゴペプチド溶液 (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK) にそれぞれ浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 接触角の測定

それぞれのオリゴペプチドを修飾した金基板に超純水40 μ lを滴下し、マイクロスコープを用いて接触角を測定した。

1.2.4 オリゴペプチド修飾表面へのタンパ

クの非特異吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

濃硫酸：過酸化水素水=3：1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面に50 μ Mのオリゴペプチド溶液(CPPPKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)をそれぞれ滴下し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

5) タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に1 mg/mlフィブリノーゲン、を滴下し、室温で30分間放置した。

6) タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

C. 研究結果と考察

1. オリゴペプチドの設計

1.1 CD スペクトルによる溶液中での二次構造の評価

オリゴペプチド(CPPPKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)それぞれの溶液中での二次構造を CD スペクトルにより評価した。その結果を、Fig. 2 に示す。オリゴペプチド CPPPKEKEKEKEK においては、200 nm 付近に大きな負の極大、225 nm 付近に弱い正の極大がみられた。これは、

CPPPKEKEKEKEK が溶液中で安定な二次構造であるポリプロリンヘリックス構造を形成していることを示している。一方、その他の配列のオリゴペプチド(CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)においては、210 nm 付近の楕円率が小さく、195 nm 付近に負の極大がみられる。つまり、ランダムな構造をとっていることが示された。

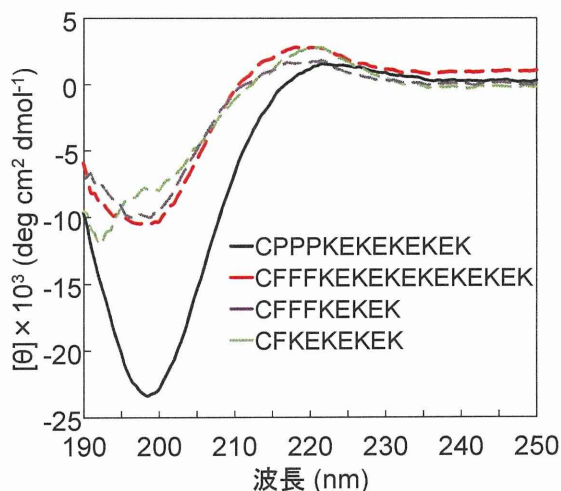


Fig. 2 CD スペクトル

1.2 QCMを用いたオリゴペプチド吸着量の評価

オリゴペプチド(CPPPKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)の吸着量をFig. 3に示した。このオリゴペプチドが表面に四角配置で吸着していると仮定すると、ペプチド分子間の距離は約1.2~1.4 nmと見積もられる。この値は、アルカンチオール自己組織化単分子膜の分子間距離が約0.6 nmであること、およびアミノ酸のサイズがおおよそ0.5 nmであることを考慮すると十分に密に吸着していると判断できる。一般にタンパクは、直径10 nm~50 nm程度である。したがって、今回の吸着密度からタンパクの非特異吸着

を抑制できる可能性が示唆された。

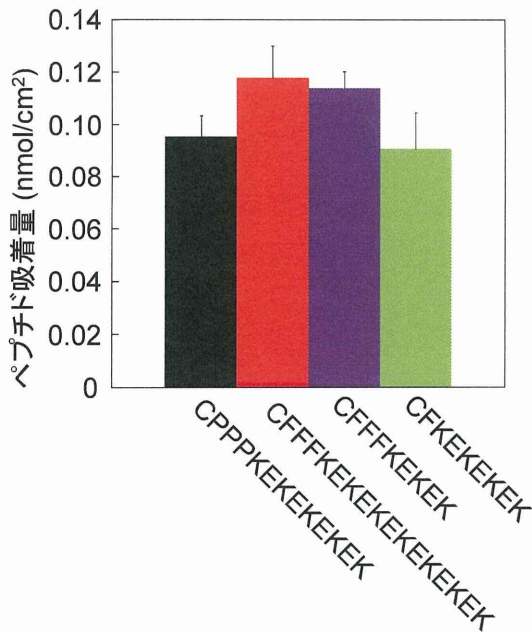


Fig. 3 金表面へのオリゴペプチド吸着量

1.3 ペプチド修飾表面の濡れ性評価

Fig. 4 に示すように、いずれのオリゴペプチドを修飾した表面においても、ペプチド修飾前の金表面と比較して金表面は親水性となった。特に、CPPPKEKEKEKEKEK もしくは CFFFKEKEKEKEKEKEKEK を修飾した場合、特に親水性となった。続いて、実際にペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着抑制効果を評価した。

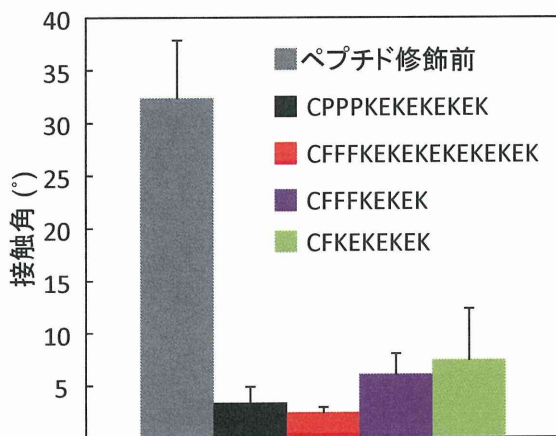


Fig. 4 ペプチド修飾表面への水の接触角

1.4 オリゴペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着量の評価

Fig. 5 に示すように、いずれのオリゴペプチドを修飾した表面においても、未修飾表面と比較してタンパク質の吸着は抑制された。ただし、減少割合には大きな差があり、最も吸着が抑制されたオリゴペプチド (CPPPKEKEKEKEKEK) では 6.3%、その他のオリゴペプチド (CFFFKEKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEK, CFKEKEKEK) では 50~65% であった。フィブリノーゲンは細胞外マトリックスの一種であるフィブロネクチンと構造的に似ており、通常の培養系においても培養表面に素早く吸着する。したがって、このフィブリノーゲンの吸着を抑制できる表面は、細胞接着抑制や、細胞のパターニングに有用である可能性が高い。

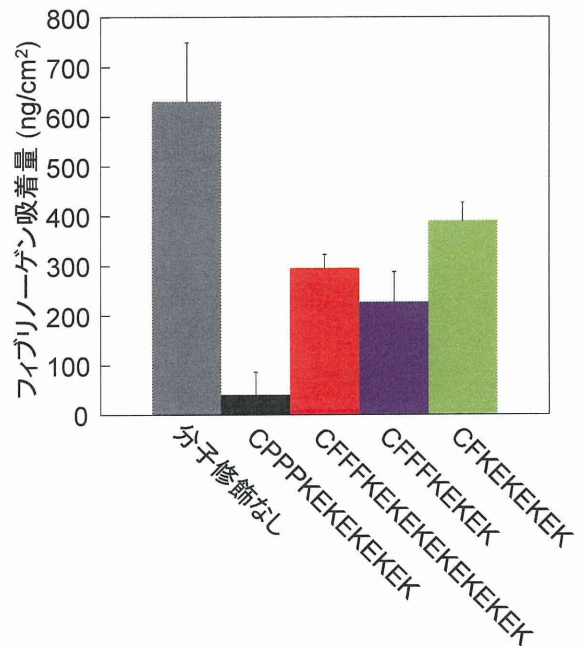


Fig. 5 オリゴペプチド修飾表面におけるタンパク質吸着の抑制効果

D. 結論

分子動力学計算と実験的な手法により、新しくオリゴペプチドを設計した。このオリゴペプチドは、リンカー部分にプロリンを配置したことで、プロリンヘリックス構造を形成し、このペプチドの修飾表面へのタンパクの非特異吸着を、ほかの両性イオンペプチドと比較しても優位に抑制できることが示された。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Kakegawa, N. Mochizuki, N. Sadr, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell-Adhesive and Cell-Repulsive Zwitterionic Oligopeptides for Micropatterning and Rapid Electrochemical Detachment of Cells, **TISSUE ENGINEERING: Part A (IF=4.022)**, (2013) Doi: 10.1089/ten.tea.2011.0739

2. 学会発表

国際学会

1. T. Kakegawa, A. Gautieri, N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Zwitterionic Oligopeptides for Cell Micropatterning and Electrochemical Rapid Cell Detachment, 3rd TERMIS World Congress, 2012.9.8, Vienna, Austria
2. T. Kakegawa, A. Gautieri, N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrochemical Cell Detachment using Zwitterionic Oligopeptides, Biofabrication 2012, 2012.10.29, Manchester, U. K.

国内学会

1. 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞脱離、

第11回日本再生医療学会総会、
2012.6.13, パシフィコ横浜(神奈川)

2. 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、生物工学会第4回若手研究シンポジウム、2012.7.1, モンタナリゾート岩沼(宮城県)
3. 掛川貴弘、Alfonso Gautieri、鈴木博章、福田淳二、電気化学的細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、2012.11.26, 仙台国際センター(宮城県)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2012-533032 (平成 25 年 2 月 18 日)
Inventors: J. Fukuda, H. Suzuki, N. Mochizuki, T. Kakegawa、Applicants: University of Tsukuba、Cell culture method and device、International Application No.: PCT/JP2011/070533、International Filing Date: 8.9.2011

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

細胞シートの移植と血管内皮細胞との共培養
研究分担者 蛭沢 克己 名古屋大医学部

研究要旨

前年度、培養皿の材料として、ナノ孔を有する多孔質メンブレンを用いることで、細胞シートへの酸素の供給を改善し、厚みのある組織を作製できることを示した。また、電気化学的な細胞回収法により、多孔質メンブレン上に構築した細胞シート（厚さ 50 μm 、直径 2.5 cm）を支持体を用いることなく回収した。今年度は、この手法で回収した細胞シートをヌードマウスに移植し、1、2ヶ月後の生着状態や腫瘍化、細胞浸潤などを評価した。また、細胞シートの厚みが 200 μm を超えると内部で酸素枯渇による壊死層の形成が生じる。そこで、細胞シート内に血管内皮細胞を導入し、血管ネットワークの形成が可能かどうか検討した。これらの検討により、生体外において厚みのある細胞シートを構築し、非侵襲的に回収および積層化する技術を確立した。

A. 研究目的

細胞シートを多層積層化して、生体外で生体類似構造を形成させるためには、実用的なサイズ、厚みを有する細胞シートの回収が求められる。本研究では、培養担体としてナノ孔を有する多孔質メンブレンを用いることによって、細胞への酸素供給を改善し、なおかつ広範囲の細胞シートに均一に電圧が印加できる系を考案した。これらより、厚みのある細胞シートを形成させ、かつ回収・積層化する技術の確立を目的とした。今年度は、この手法を用いて回収した細胞シートをマウスに移植して、その安全性を確認するとともに、細胞シート内に血管ネットワーク構造を導入する手法について検討した。

B. 研究方法

1. マウス皮下への細胞シート移植

多孔質メンブレン上で作製・回収した細胞シートをヌードマウスの皮下に移植し、ホストへの生着やコラーゲンの発現を、組織切片の免疫染色によって組織学的に評価した。

1.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, BD Falcon
- Multiwell 6well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列：-CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- 正常ヒト皮膚線維芽細胞 Normal Human Dermal Fibroblasts (NB1RGB), Riken Cell Bank

- ・エタノール, 関東化学
- ・リン酸緩衝液 : Phosphate Buffered Saline : PBS-, GIBCO
- ・KSN/Slc nude mice (4週齢), 中部科学資材株式会社
- ・イソフルラン, 大日本住友製薬
- ・PKH26 red fluorescent cell linker, Sigma-Aldrich
- ・ベスキチン, UNITIKA LTD
- ・Monoclonal Rabbit Anti-Collagen I antibody(M0851), Abacam
- ・Goat Anti Rabbit IgG Antibody (Alexa Fluor488 Code A11034), Invitrogen
- ・PermaFluorAqueous mounting medium containing DAPI, Thermo Fisher Scientific LTD

[装置]

- ・クリーンベンチ, 三洋電機
- ・遠心分離機, 三洋電機
- ・インキュベータ, 三洋電機
- ・超純水製造装置 : Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE
- ・スパッタデポジション装置 : CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ・ポテンショスタット/ガルバナスタット : HA-151, Hokuto denko.
- ・Ag/AgCl 参照電極 : #012167, BAS Inc.
- ・蛍光顕微鏡 ; DC20, Olympus

1.2 実験手順

1.2.1 移植用細胞シートの作製・染色・回収

1) Au/Cr層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCell Culture InsertにCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。

2) オリゴペプチドの固定

0.5mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成したCell Culture Insertのメンブレン全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐために4°Cの冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。

3) 基板の滅菌

オリゴペプチドを固定したCell Culture Insertを、クリーンベンチ内で70%エタノール→滅菌水の順に洗浄し滅菌し、専用の培養容器である6 wellマルチウェルプレートに入れた。

4) 細胞の播種

正常ヒト皮膚線維芽細胞を10%FBS添加培地に 5.0×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells / dishの密度で細胞を播種した。

5) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で37°C、5% CO₂-Airのもとで2週間培養した。

6) 細胞シートの膜染色

PKH26 red fluorescent cell linker溶液を培養した細胞シートの表面に滴下し、室温で5分間インキュベートした。

7) 電位の印加

Cell Culture Insert内の培地をPBS-に交換した。細胞培養ディッシュを作用極、市販のAg/AgCl電極(内部電解液 : 飽和NaCl溶液)を参照極、白金板を対極とし、3電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続して定電位-1.0 V(vs Ag/AgCl)を5分間印加した。

8) 細胞シートの回収

シリコンシートをメンブレンの直径に合うようにリング状にくり抜き、φ3 cmディッシュに固定した。シリコンリングとディッシュによって形成されたくぼみに、あらかじめPBS-を満たしておき、その上からCell Culture Insertを押し込むことで、気孔

からPBS-が供給されることで細胞シートを浮き上がらせた。最後に、浮遊した細胞シートをピペットで回収した。

9) 核型検査

回収した細胞シートの一部 (PKH非染色群) は、DAPI染色とQバンド法 (ヘキストーキナクリン染色) 核型検査を行った。

1.2.2 細胞シートの移植と組織切片の作製

1) 移植片の作製

染色した移植用細胞シートを、移植担体であるベスキチン(1.5 × 1.0 cm)上に展開した。

2) ノードマウスへの移植

4週齢のノードマウス(KSN/Slc)をイソフルランで麻酔後、背側に2箇所皮下ポケットを作製し、ベスキチンと共に細胞シート片を移植した。1分後、ベスキチンのみを取り除き、挙上した皮弁を縫着した。なお、動物実験は、名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程を遵守して実施した。

3) 組織切片の作製

移植して1-2ヶ月後、移植片とその周辺部位を取り出し、組織切片を作製した。

4) 組織切片コラーゲンの染色

一次抗体反応にはMonoclonal Rabbit Anti-Collagen I antibodyを、二次抗体反応にはGoat Anti Rabbit IgG Antibodyを用いた。また、PermaFluorAqueous mounting medium containing DAPIを用いてカバーガラスに封入し、蛍光顕微鏡により蛍光観察を行った。

2. 血管内皮細胞との共培養シートの作製・回収および積層化

多孔質メンブレン上で線維芽細胞シートを回収・積層化することで、厚みのある細胞シートを構築させることができる。し

かし、厚みが増せば増すほど、細胞シート内への酸素供給が律速となる。つまり、より厚みのある組織を構築するには、細胞シート内に血管構造を導入する必要がある。

そこで、血管構造を含んだ厚みのある細胞シートを作製するために、あらかじめ線維芽細胞シート内に血管内皮細胞を含有させた細胞シートを、メンブレン基板上でそれら2種類の細胞を共培養することによって構築した。メンブレン表面には、直径400 nmの貫通孔が多数形成されており、細胞層の上下に培地成分を置くことが出来るため、酸素や栄養供給の改善、また代謝産物の拡散促進が期待できる。

作製した共培養シートは、共焦点顕微鏡を用いて組織内部の血管内皮細胞の形態を観察し、また解析ソフトウェアを用いて定量評価した。さらに回収した共培養シートを積層化することで、血管様構造を付与した多層化組織の作製を試みた。

2.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD (a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, BD Falcon
- Multiwell 6well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列: -CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- 正常ヒト皮膚線維芽細胞 Normal Human Dermal Fibroblasts (NB1RGB), Riken Cell Bank
- ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (GFP導入済): Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, from Dr. J. Folkman, Children's Hospital, Boston)
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS-, GIBCO

- ・正常ヤギ血清 (X0907), DAKO
- ・Rabbit Anti-Fibronectin (LB-1027), LSL
- ・Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin (M0851), DAKO
- ・Goat Anti Mouse IgG Antibodies (Alexa Fluor488 Code A11001), Invitrogen
- ・Goat Anti Rabbit IgG Antibodies (Alexa Fluor568 Code A11011), Invitrogen
- ・DAPI-Flioromount-G (Code 0100-20), Southern Biotechnology Associa

[装置]

- ・クリーンベンチ, 三洋電機
- ・遠心分離機, 三洋電機
- ・インキュベータ, 三洋電機
- ・超純水製造装置: Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE・スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ・ポテンショスタット/ガルバノスタット: HA-151, Hokuto denko.
- ・Ag/AgCl 参照電極: #012167, BAS Inc.
- ・共焦点顕微鏡: LSM700, ZEISS
- ・3次元画像解析ソフトウェア: Imaris, Bitplane

2.2 実験手順

2.2.1 多孔質メンブラン上での共培養シートの作製・評価

1) Au/Cr層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 Paにてガラス基板と2種類の多孔質メンブランにCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。

2) オリゴペプチドの固定

0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成した多孔質メンブラン、ガラス基板全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐた

めに4℃の冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。

3) 基板の滅菌

オリゴペプチドを固定したガラス基板と多孔質メンブランを、クリーンベンチ内で70%エタノール→滅菌水の順に洗浄、滅菌し、専用の培養容器である6 wellマルチウェルプレートに入れた。

4) 細胞の播種

正常ヒト皮膚線維芽細胞を10% FBS添加培地に 3.25×10^5 cells / mlの密度で、またヒト臍帯静脈血管内皮細胞を 1.25×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、メンブラン容器の上部に2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells / dishの密度で細胞を播種した。一方、メンブラン容器の下部(6 wellマルチウェルプレート側)には、2.5mLの10% FBS添加培地を入れた。

5) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で37℃、5% CO₂-Airのもとで1-2週間培養した。

6) 細胞シートの観察・評価

メンブラン基板上で所定時間培養した細胞シートをメンブランごと切り出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてGFP導入済の血管内皮細胞の形態を観察し、3次元の像を取得した。取得した画像をもとに、3次元画像解析ソフトウェアを用いて解析を行った。

2.2.2 共培養シートの回収・積層化

1) Au/Cr層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCell Culture InsertにCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。

2) オリゴペプチドの固定

0.5mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成したCell Culture Insertのメンブレン全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐために4℃の冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。

3) 基板の滅菌

オリゴペプチドを固定したCell Culture Insertを、クリーンベンチ内で70%エタノール→滅菌水の順に洗浄し滅菌し、専用の培養容器である6 wellマルチウェルプレートに入れた。

4) 細胞の播種

正常ヒト皮膚線維芽細胞を10% FBS添加培地に 3.25×10^5 cells / mlの密度で、またヒト臍帯静脈血管内皮細胞を 1.25×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、メンブレン容器の上部に2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells / dishの密度で細胞を播種した。一方、メンブレン容器の下部(6 wellマルチウェルプレート側)には、2.5mLの10% FBS添加培地を入れた。

5) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で37℃、5% CO₂-Airのもとで2週間培養した。

6) 電位の印加

Cell Culture Insert内の培地をPBS-に交換した。細胞培養ディッシュを作用極、市販のAg/AgCl電極(内部電解液: 飽和NaCl溶液)を参照極、白金板を対極とし、3電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続して定電位-1.0 V(vs Ag/AgCl)を5分間印加した。

7) 細胞シートの回収

シリコンシートをメンブレンの直径に合うようにリング状にくり抜き、φ3 cmディッシュに固定した。シリコンリングとディッシュによって形成されたくぼみに、あらかじめPBS-を満たしておき、その上から

Cell Culture Insert押し込むことで、気孔からPBS-が供給されることで細胞シート浮き上がらせた。最後に、浮遊した細胞シートをピペットで回収した。

8) 細胞シートの積層化

回収した細胞シートをディッシュに移動させ、その上から新たな細胞シートを重ね、37℃、5% CO₂-Airの雰囲気下で30分間インキュベートした。その後、さらに新たな細胞シートをその上から重ね、同様にインキュベートさせることで、積層化された細胞シートを形成した。

9) アクチン・フィブロネクチン免疫蛍光2重染色

エタノールで脱パラフィン化し、正常ヤギ血清に20分間浸漬させ、非特異的反応のブロッキングをした。一次抗体反応には、Rabbit Anti-Fibronectin 1 μLとMonoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin 10 μLを489 μLの1% BSA/TBSで混合希釈したものを用い、室温で2時間インキュベートした。二次抗体反応には、Goat Anti Mouse IgG Antibodies (Alexa Fluor488) 2 μLとGoat Anti Rabbit IgG Antibodies (Alexa Fluor568) 2 μLを596 μLの1% BSA/TBSで混合希釈したものを用い、室温で1時間インキュベートした。

最後に、DAPI-Flioromount-Gを用いてカバーガラスに封入し、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡により蛍光観察を行った。

C. 研究結果と考察

3. マウス皮下への細胞シート移植

3.1 移植用細胞シートの準備と移植

オリゴペプチドを修飾した多孔質メンブレン上で1週間培養した線維芽細胞シートを、電気化学的手法に基づき培養基板から回収した。まず、電位印加によって細胞の

染色体に影響が無いかどうかを調べるために、性状変化の有無を核型分析によって解析した。DAPI染色による50細胞の染色体数検査の結果、48細胞が正常染色体数の46であり、正常ヒト細胞と一致した。その他、正常染色体数±1の45本と47本の細胞がそれぞれ1細胞ずつ観察された (Fig. 1)。次に、培養過程における性状変化の有無を調べるために、Qバンド法（ヘキストーキナクリン染色）を用いて、トリプシン処理で回収した細胞および電位印加によって回収した細胞、それぞれ5細胞の核型解析を行った。結果、全ての細胞が44+XYの正常核型であった (Fig. 2)。すなわち、いずれの細胞も50細胞中2細胞に染色体数のずれ（±1）があり、低頻度で染色体数のばらつきがあったが、最頻値は46本であり、正常ヒト細胞と一致した。また、キナクリン・ヘキスト2重染色による染色体分染では、5細胞分の染色体のバンドパターンを正常ヒト染色体と比較した結果、核板バンドパターンが正常ヒト染色体と一致し、欠失、転座、重複など染色体レベルで、確認できる目立った異常は認められなかった。

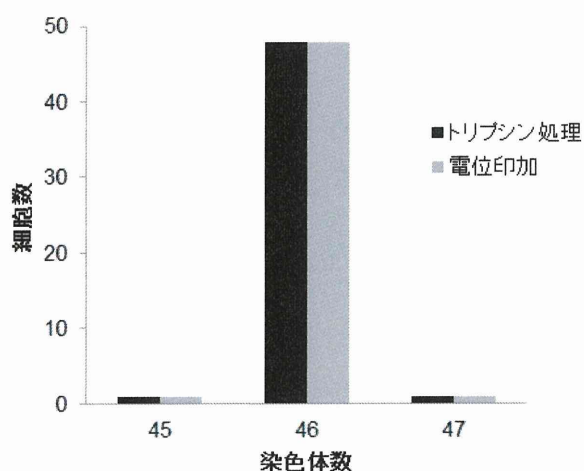


Fig. 1 染色体分布

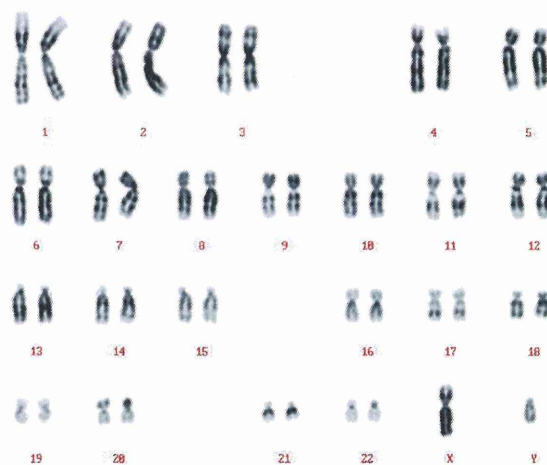


Fig. 2 移植細胞の核型解析

次に、PKHによる細胞膜染色を施した後に回収した細胞シートは、移植担体であるベスキチン(1.5 × 1.0 cm)上に展開した (Fig. 3A)。準備した移植片を、4週齢のヌードマウスの皮下に生着させた (Fig. 3B)。ベスキチンを用いることによって、細胞シートを容易に移植部位に運搬することが可能であった。細胞シートが皮弁に接着したのを確認した後、ベスキチンを取り除き、挙上下皮弁を縫着した。

3.2 移植した細胞シートの組織学的評価

移植して1か月後の組織切片をFig. 4に示す。ここで非移植群は、細胞シートを移植せずに縫合したものである。細胞の核はDAPIにより青色に、細胞シートはPKHにより赤色で示されているが、真皮下部にPKHの発現が認められることから、細胞シートが1ヶ月後においても移植部位に留まっており、本手法によって作製・回収した細胞シートの生体への高い生着性が示された。

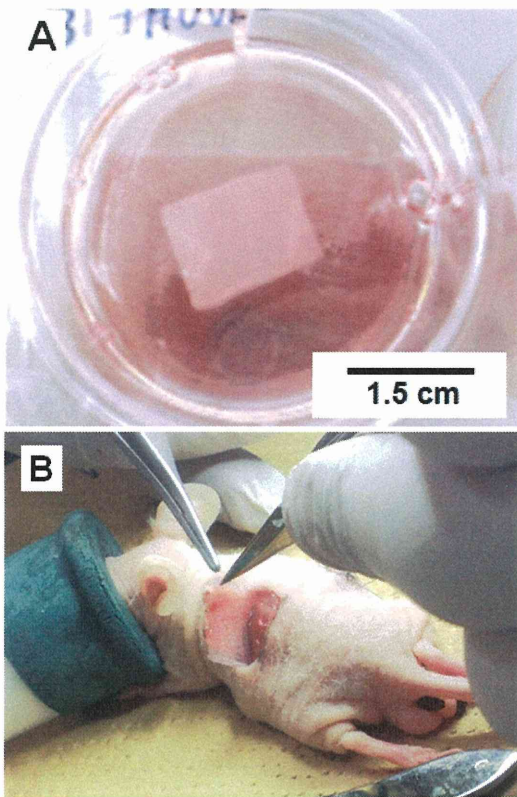


Fig. 3 (A) ベスキチン上に展開した移植片
(B) ノードマウス皮下へ移植の様子

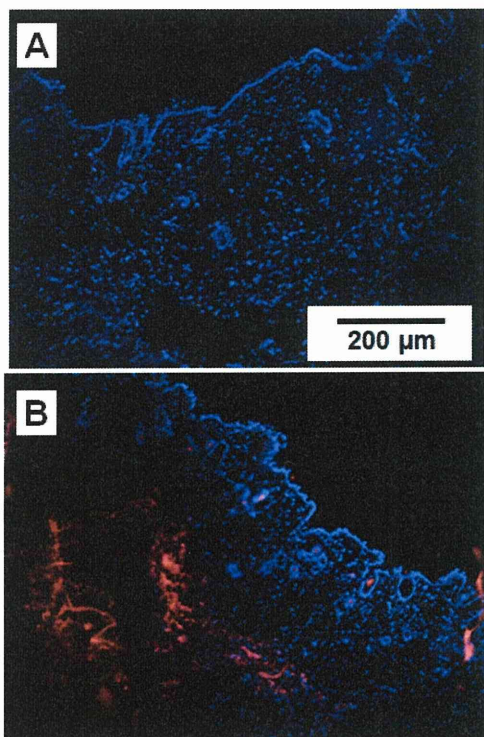


Fig. 4 移植1ヶ月後の組織切片断面
(DAPI/PKH)
(A) 非移植群 (B) 移植群

さらに、移植して2ヶ月後に切り出した組織切片をFig. 5に示す。まず、HE染色の結果、2ヶ月後においても細胞シートが移植部位に存在し、1ヶ月後と同様に肉様膜と真皮の間に生着している様子が観察された(Fig. 5Bの点線枠は移植箇所を示す)。また、免疫不全モデルを用いた実験とはいえ、今回の異種間移植において、2ヶ月という経過観察期間で明らかな腫瘍化や、極端な細胞浸潤は認められなかった。

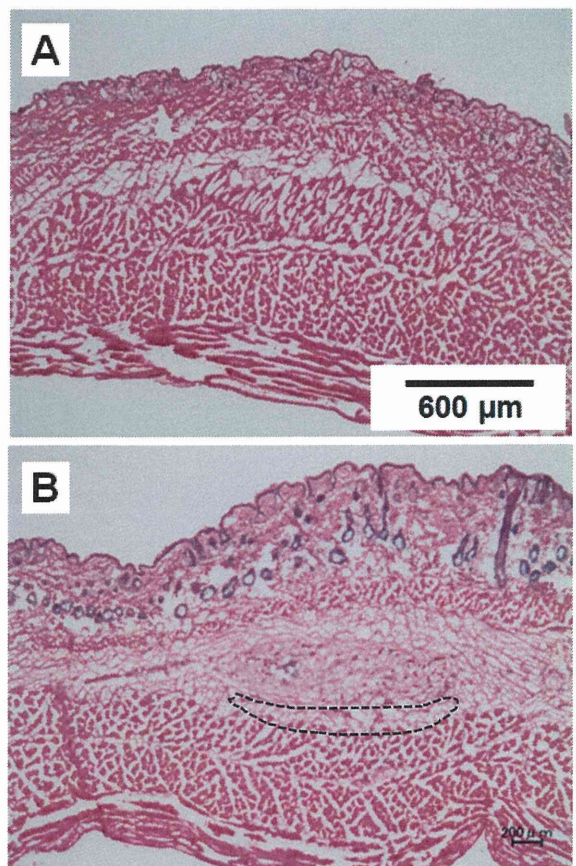


Fig. 5 移植2ヶ月後の組織切片断面
(HE染色)

(A) 非移植群 (B) 移植群

次に、移植した細胞シートの機能発現を見るために、抗コラーゲン抗体を用いて免疫染色を行った。細胞の核は青色、細胞シートは赤色、コラーゲンは緑色に染色されている(Fig. 6)。細胞シートの内部および周

辺に、コラーゲンの産生が認められた。すなわち、移植して2ヶ月後においても、細胞シートは移植部位に生着し続け、コラーゲン等の機能発現を有することから、移植による高い治療効果が期待できる。

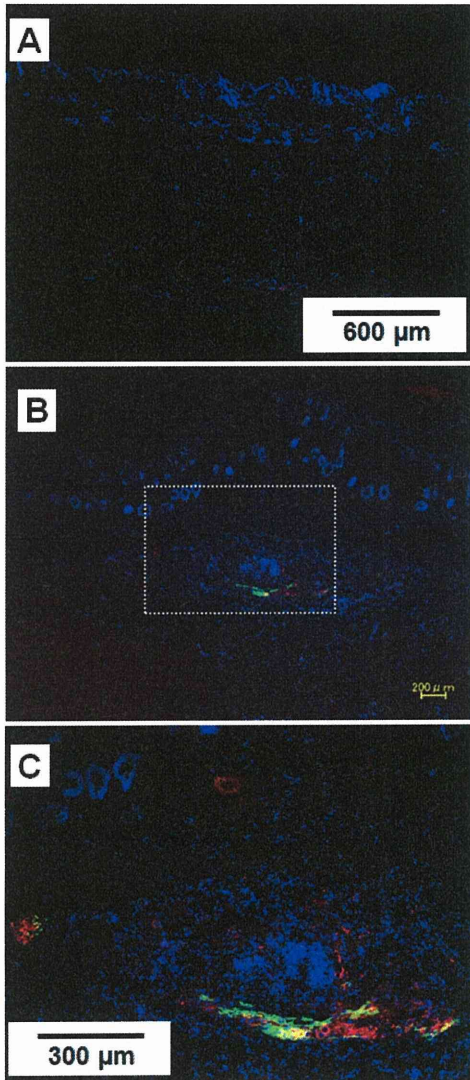


Fig. 6 移植2ヶ月後の組織切片断面 (DAPI/PKH/Anti-collagen)
(A) 非移植群 (B,C) 移植群 (x40, x100)

4. 共培養シートの作製・回収および積層化

4.1 共培養シートの作製と内皮細胞の形態観察

多孔質メンブレン上で線維芽細胞と血

管内皮細胞を3:1の割合で播種し、共培養を行った。結果、3日後に内皮細胞の細かな網目構造が細胞シート内に形成され始め、1週間後にはよりはっきりと目視できる網目構造が確認できた(Fig. 7)。すなわち、細胞シート内に血管様構造を付与し、また培養と共に細胞シート内の血管網が時々刻々と変化していく様子が捉えられた。

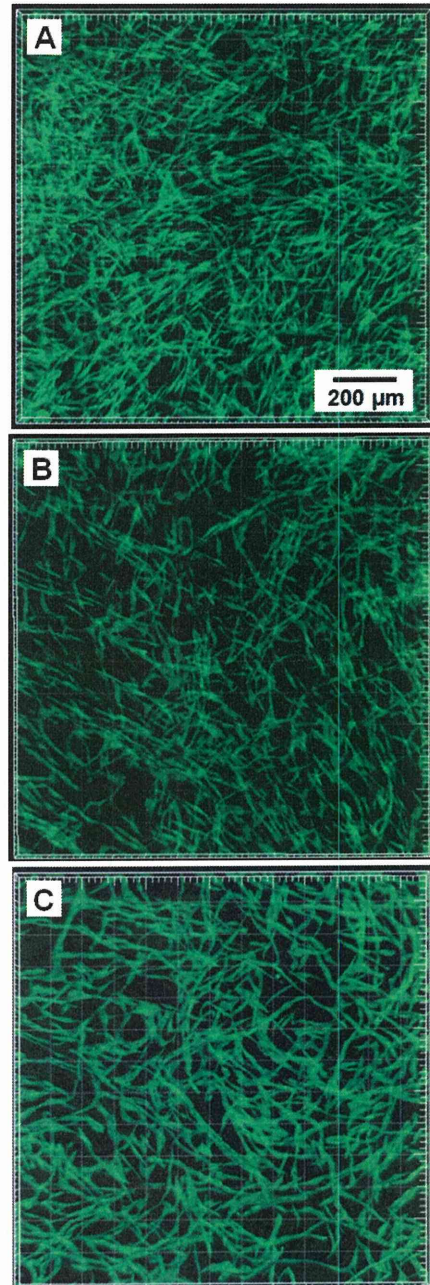


Fig. 7 共培養シート内の内皮細胞 (GFP)
(A) 培養3日目 (B) 5日目 (C) 7日目

細胞シート内に形成した血管様構造を定量的に評価するために、3次元画像解析ソフトウェア (Imaris) を用いて内皮細胞の形態を立体構築した (Fig. 8)。この立体データを基に、血管様構造の平均直径、体積、分岐数を算出した (Fig. 9-11)。その結果、平均直径と体積は培養3日目から5日目にかけて減少するが、それから7日目にかけて増加すること、一方で分岐数は培養するにつれて減少し、3日目から5日目にかけて半減していることが分かった。これらから、細胞シート内の血管内皮細胞は、まずシート内全体に血管様網を張り巡らせたのち、徐々に形態を変化させ、適切な立体配置や空間密度を獲得していくことが示唆された。

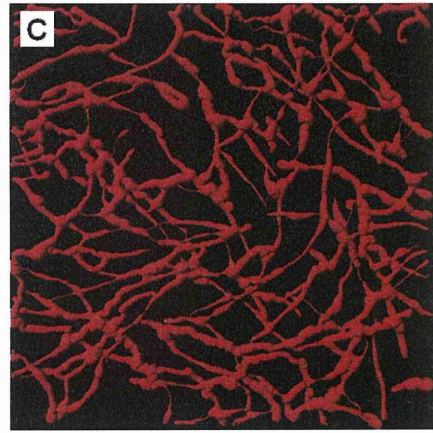
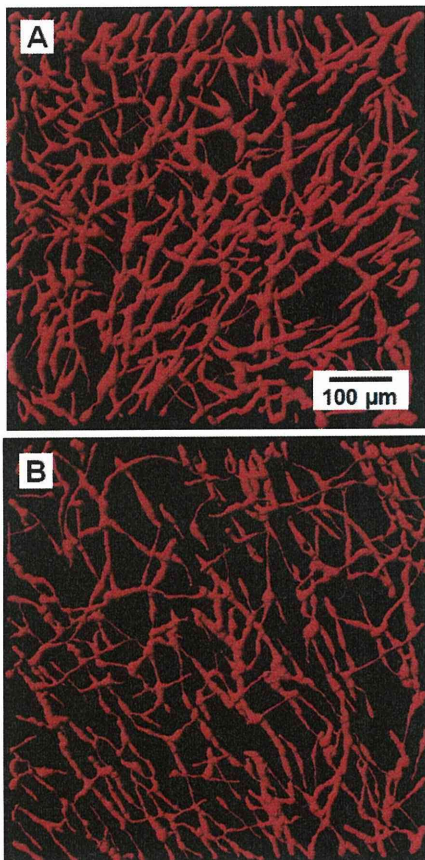


Fig. 8 3D構築後の内皮細胞ネットワーク (A) 培養3日目 (B) 5日目 (C) 7日目

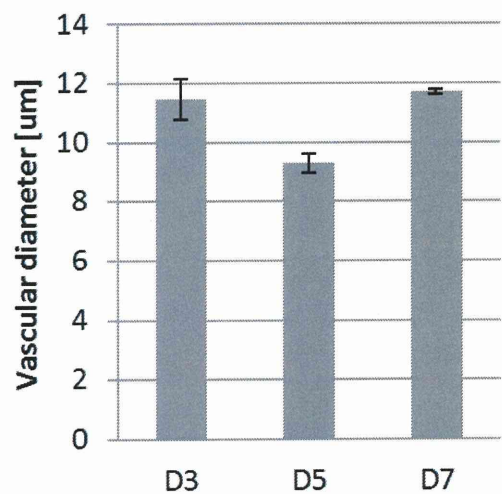


Fig. 9 毛細血管様構造の平均直径 (n=3)

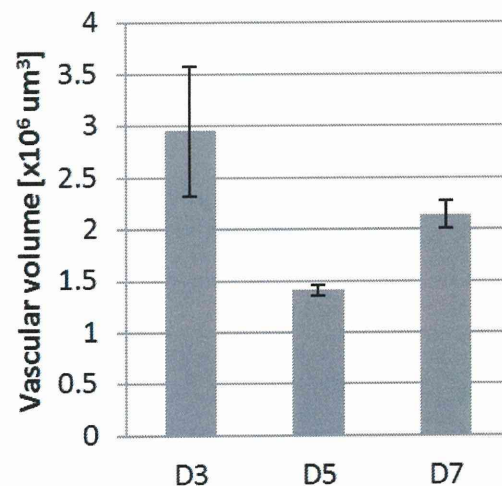


Fig. 10 毛細血管様構造の体積 (n=3)

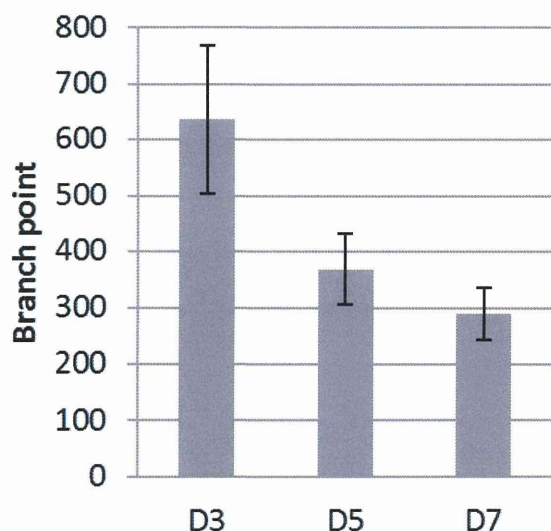


Fig. 11 毛細血管様構造の分岐の数 (n=3)

4.2 共培養シートの回収と積層化

多孔質メンブレン上で線維芽細胞と血管内皮細胞を2週間共培養した後、 -1.0 V (vs Ag/AgCl)の電位を10分間印加して回収し、3枚積層化した (Fig. 12A)。HE染色の結果、積層化細胞シートの厚みは約 $200\text{ }\mu\text{m}$ であり、純粋に線維芽細胞シートを3枚積層化したものよりも約1.5倍厚みのある組織が形成された。これは、血管内皮細胞の管腔形成によって酸素供給や代謝産物の拡散が促進されたことが考えられる。

また、フィブロネクチンと平滑筋アクチンの2重蛍光免疫染色を行うことで、線維芽細胞シート内に血管内皮細胞が存在していることが確認できた (Fig. 12B,D)。DAPIによる核染色の結果をFig. 12Cに示すが、細胞シートの内部に渡ってきちんと細胞が存在し、高い細胞密度の細胞組織が作製できていることが分かった。

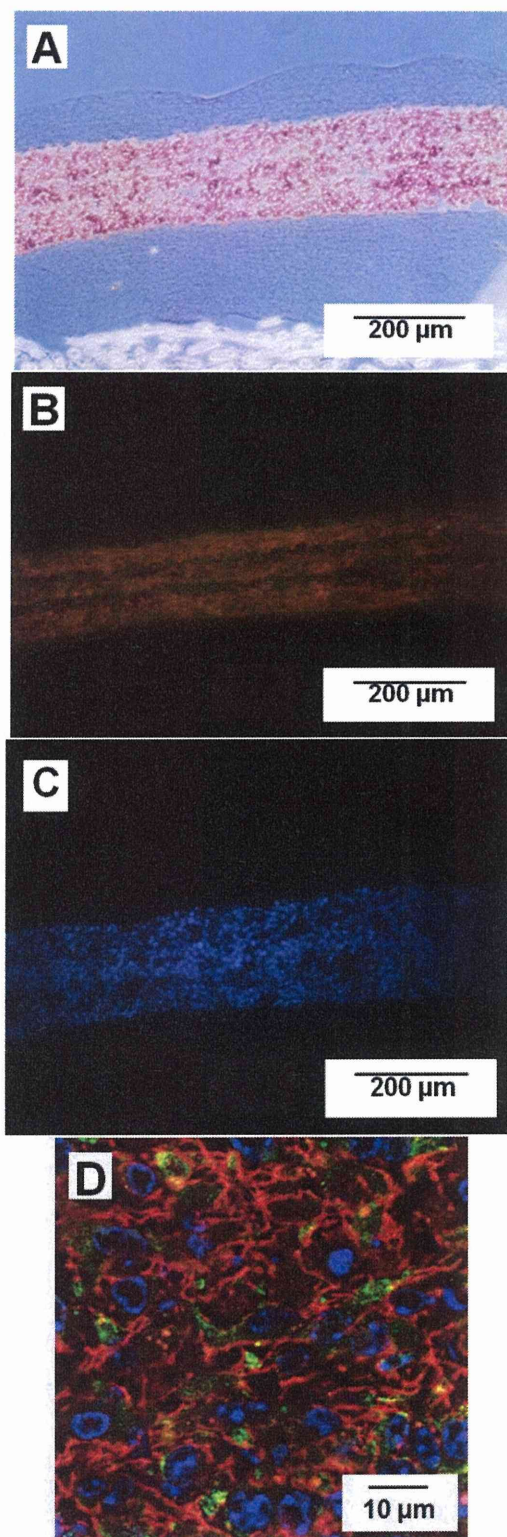


Fig. 12 積層化共培養シートの断面
(A) HE染色 (B) フィブロネクチン/平滑筋アクチン 2重染色 (C) DAPI (D) フィブロネクチン/平滑筋アクチン/ DAPI 3重染色

D. 結論

メンブレン上で形成させた細胞シートを電気化学的に脱離し、ヌードマウスへ移植して、2ヶ月以上生着していること、明らかな腫瘍化や、極端な細胞浸潤は認められないことを示した。また、細胞シート内に内皮細胞を導入して共培養したところ、細胞シート内に血管ネットワーク構造が形成されることを示した。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Inoue, K. Ebisawa, T. Itaya, R. Sugito, A. Yamawaki-Ogata, Y. Sumita, R. Wadagaki, Y. Narita, H. Agata, H. Kagami, M. Ueda, Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendo/ligamentogenesis related markers in human PDL-derived cells, *Oral Disease* (IF=2.386), 18(2), pp. 206-212 (2012)

2. 学会発表

国際学会

1. K. Ebisawa, A. Ogata-Yamawaki, M. Ito, H. Sato, K. Toriyama, S. Yagi, M. Ono, M. Kanbe, T. Uchibori, K. Ohno, M. Ito, Y. Kamei, Effect of molecular hydrogen on survival of rat random pattern skin flap, The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Society, 2012.9.4, Yokohama

2. H. Sato, K. Ebisawa, K. Toriyama, S. Yagi, T. Morishita, M. Ono, M. Kanbe, T. Uchibori, Y. Kamei, Skin derived precursor cells promote diabetic wound healing, The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Society, 2012.9.5, Yokohama

3. K. Ebisawa, Y. Kamei, Our method of PRP injection for facial rejuvenation. The 2nd International Congress on the Use of Growth Factors, Cell Therapy

and Platelet Rich Plasma in Dermatology, Milano, 2013.1.18-19

国内学会

1. 蛭沢克己, 内堀貴文, 伊藤美佳子, 八木俊路朗, 鳥山和宏, 大野欽司, 伊藤雅史, 亀井譲: 分子状水素がランダムパターン皮弁に与える影響に関する検討 第4回日本創傷外科学会、博多、2012.7.26

2. 佐藤秀吉, 蛭沢克己, 鳥山和宏, 八木俊路朗, 高成啓介, 亀井譲: 糖尿病マウスにおける、皮膚由来前駆細胞を用いた創傷治癒促進能の検討 第12回日本再生医療学会、横浜、2013.3.23

3. 蛭沢克己, 福田淳二, 望月直人, 亀井譲: 電気感応性培養皿を用いた細胞シートに関する検討 第21回日本形成外科学会基礎学術集会、福島、2012.10.5

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

2液混合型ゼラチンハイドロゲルの作製
研究分担者 伊藤 大知 東京大医学部

研究要旨

カルボキシメチルセルロースとゼラチンを原料とし、これらの二液を混合するのみで10秒程度でゲル化する化学修飾ハイドロゲルを開発した。このハイドロゲルは、培養環境下でほとんど膨潤せず適度な機械的強度の維持が可能であった。また、ゲル内に細胞の包埋が可能であり、血管内皮細胞がゲル内で血管ネットワークを形成することが示された。細胞シートを電気化学的細胞脱離によりゲル側へ転写することも可能であったことから、このハイドロゲルを利用することで、細胞シートの積層化およびその後の移植操作が可能となる。

A. 研究目的

細胞シートを積層化し移植する際には、これらの操作を容易にするために、機械的に細胞シートを補助するものが必要である。そこで、生体材料を用いたハイドロゲルを利用し、移植部位に確実に固定する工夫を行った。生体の細胞外マトリックスは主にコラーゲン、グリコサミノグリカン、糖タンパクからなる。前年度は、ヒアルロン酸を主成分とするハイドロゲルを作製したが、時間とともに膨潤するという欠点があった。そこで今年度は、医療用ゲル材料として多用されているカルボキシメチルセルロース (CMC)と、細胞外マトリックスの骨格を形成し細胞の接着因子を持つコラーゲンの部分変性体であるゼラチン (Gelatin)をベースとし、ハイドロゲルを作製した。

具体的には、CMCに過ヨウ素酸ナトリウムを用いた開環反応によりアルデヒド基 (CHO)を導入し、ゼラチンにはEDC (1-エチ

ル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) 試薬を用いることによって、脱水縮合反応でヒドラジド基 (ADH)を修飾した。これにより、CMC-CHO、Gelatin-ADHの二つのハイドロゲル原料を作製し、二つのゲル原料の配合を変更することによって、強度などの性質を容易に変更できる化学修飾ハイドロゲルを開発した。

B. 研究方法

1. ハイドロゲルの合成と評価

アルデヒドとヒドラジドを用いたハイドロゲルの原料となるCMC-CHOの合成を行った。カルボキシメチルセルロースを原料に用いて、過ヨウ素酸ナトリウムを用いた開環反応によって、HA-CHOを作製した。評価として、¹HNMRで解析を行った。

1.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- ・ カルボキシメチルセルロース