

ナノファイバー基材を用いた極限微生物の培養技術の探索

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-01-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤田, 聡, 末, 信一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/7077

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「学内共同研究等」

ナノファイバーを用いたバイオハイブリッド材料の創製と 幹細胞の微小環境制御

研究代表者： 藤田 聡 (工学研究科・准教授)

共同研究者： 末 信一郎 (工学研究科・教授)

概 要
本研究では、造血幹細胞の培養の足場に適したナノファイバー基材を作成することを目的に、ナノファイバー上での間葉系幹細胞の分化制御をおこなった。本研究では、生体組織がナノメートルサイズの繊維構造が配向した構造から成る細胞外マトリクスで構成されていることから、配向性を有したナノファイバーに着目した。また、細胞としては、造血支持能を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた。本研究では、エレクトロスピンング法を用いて、配向性等の幾何構造の異なるナノファイバー基材を作製し、この上での細胞挙動への影響を検討した。その結果、配向性の違いによって増殖・分化が異なることがわかった。これにより、造血幹細胞の培養足場に適したバイオハイブリッド材料の設計にむけて、有効な知見が得られた、造血幹細胞の分化制御する技術につながるものと期待できる。
関連キーワード
エレクトロスピンング, ナノファイバー, 配向性, 間葉系幹細胞, 造血幹細胞

研究の背景および目的

造血幹細胞は、白血病などの難治性血液疾患の治療や次世代の再生医療に有効な細胞ソースとして期待されている。造血幹細胞は骨髄や臍帯血から採取されるが、ドナー不足や一度に少量しか採取されないという課題がある。この問題を根本的に解決するために、造血幹細胞の効率的な増幅培養手法が強く望まれている。しかしながら、その未分化能を維持したまま増幅することは、今なお実現していない。

造血幹細胞は、生体では骨髄中に局在し、その周辺環境は細胞外マトリクスと呼ばれる構造から構成されている。細胞外マトリクスは、コラーゲンなどのタンパク質や、グルコサミノグルカンなどの多糖類から成るナノサイズの繊維状の構造を有する。これらの細胞外マトリクス中には、間葉系細胞 (MSC) が存在し、さまざまなサイトカインや成長因子などの生理活性物質を分泌している。したがって、骨髄中のこうした構造を模倣することで、造血幹細胞の効率よい増幅が期待される。

ハイドロゲルや多孔体などの3次元環境を利用した培養環境についてはこれまでも報告されてい

る。一方で、支持細胞との共培養系も血液細胞の培養ではよく知られた手法である。しかしながら、両者を統合し、支持細胞との共培養系を3次元培養系に拡張して造血幹細胞の増幅に応用しようという試みは、その有効性がこれまでほとんど示されてこなかった。その理由は、細胞の配向や液性因子の担持という観点からの根拠に立脚した材料設計が行われなかったからと考えられる。

そこで本研究では、合理的な設計根拠をもとにナノファイバー上でMSCをハイブリッドさせ、造血幹細胞の増殖を制御する因子を担持させる。これにより従来達成され得なかった、造血幹細胞の効率的な増幅を可能とする培養基材の構築が期待される。臍帯血由来造血幹細胞は、難治性の血液疾患の移植治療に用いられているが、細胞数の不足から移植が適用されないケースも多い。本課題で創製する基材で培養することで、こうした患者の救命にもつなげられると期待される。

今回、この目的に適したナノファイバー基材を開発すべく、配向性の異なるナノファイバー基材上でMSCの増殖および分化を評価した。

研究の内容および成果

<ナノファイバー基材の作製>エレクトロスピンング法を用いて、12.5%ポリウレタン溶液 (95%THF/5%DMF) からナノファイバーを基板上に作製した。配向性を有するファイバーはコレクタ回転速度1500rpmで3分間、無配向のナノファイバーはコレクタを回転させないで30秒間紡糸することで作製した。コレクタを回転させること

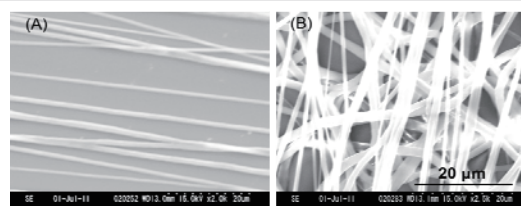


図1 (A)配向性, (B)無配向ナノファイバーのSEM

で配向性のあるファイバーを作製できた (図1)。<ナノファイバー基材でのMSCの接着・増殖>作製したナノファイバーに酸素プラズマ処理を施したのち、MSCを播種し、37°C/5% CO₂インキュベーター内で培養した (培地: DMEM/10% FBS)。播種後24h, 48hにF-アクチンおよび細胞核を染色した (図2)。その蛍光画像より細胞数及び細胞の伸展面積・方向を定量した。また、細胞数の増加から倍加時間を算出した。その結果、MSCは配向性を有するファイバー上では、細胞もファイバー同様に一方向に揃って配向していたのに対し、ランダムなファイバー上では細胞にも方向性はみられなかった。また細胞の面積は倍加時間と相関がなかったのに対し、ファイバーの配向性は細胞の増殖と相関がみられた。細胞の向きが一定方向に揃い、伸展することで細胞の増殖速度が向上したものと推測される。

<ナノファイバー基材上でのMSCの分化>ナノファイバー基材に酸素プラズマ処理を施したのち、MSCを播種し、その6時間後に、脂肪細胞誘導培地と骨芽細胞誘導培地に培地交換し、分化誘導を開始した。分化7日後に脂肪細胞はOil Red-O染色で、骨芽細胞はALP染色で細胞の分化を観察した (図3)。分化1, 3日後にRT-PCRでそれぞれの細胞の遺伝子発現を調べた。骨芽細胞への分化は、配向性を有するナノファイバーおよびランダムなナノファイバー上では、差はみられなかった。一方、脂肪細胞への分化は、ランダムなナノファイバー上では分化培地にかかわらず、分化が抑制された。RT-PCRで

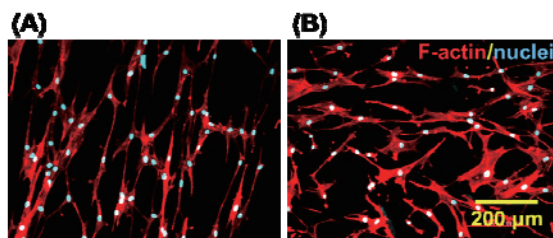


図2 (A)配向性, (B)無配向ナノファイバー上で培養したMSCの蛍光顕微鏡像 (赤: アクチン, 青: 核)。

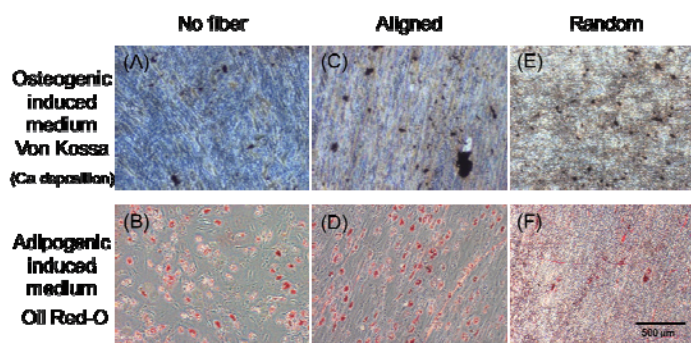


図3 配向性・無配向ナノファイバー上で分化培養したMSC。上段: 骨芽細胞への分化, 下段: 脂肪細胞への分化。

も同様の分化マーカーの発現パターンがみられた。<考察と展望>これまでに細胞の伸張が抑制されると脂肪細胞への分化が促進されるという研究結果が報告されている。細胞の伸展面積や細胞骨格の発現をそうした報告例と比較して、詳しく評価する必要がある。本法によりナノファイバー基材を用いて間葉系幹細胞制御をおこない、造血幹細胞の培養に向けた3次元培養系の開発をおこなう。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

ナノファイバーの配向性を利用した細胞の伸展及び増殖の制御, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 高分子学会北陸支部発表会, 金沢, 2011.11.
幾何的特性の異なるナノファイバー上での細胞挙動の解析, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2011.11.
配向性を有したナノファイバー上での細胞増殖, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 福井, 2011.12.
ナノファイバーの配向性に基づいた間葉系幹細胞の分化方向の制御, 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, 日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 福井, 2011.12.
Cell proliferation on aligned nanofibers, H.Yoshimura, S.Suye, S.Fujita, Taiwan-Japan Workshop on Biomedical & Biomaterials, Taichung, 2012.1
Control of the commitment of mesenchymal

stem cells on nanofiber scaffold, H.Shimizu, S.Suye, S.Fujita, Taiwan-Japan Workshop on Biomedical & Biomaterials, Taichung, 2012.1.
培養基材の幾何学的性質が細胞挙動へ与える影響の解析, 吉村英晃, 末信一朗, 藤田聡, 日本農芸化学会2012年度大会, 京都, 2012.3.
間葉系幹細胞の分化制御を可能とするナノファイバーの幾何構造の影響の検討, 清水遥絵, 末信一朗, 藤田聡, 第61回高分子学会年次大会, 横浜, 2012.5
Control of differentiation of human mesenchymal stem cells by altering the geometry of nanofibers. S.Fujita, H.Shimizu, S.Suye. *J. Nanotechnol.* (in press)
「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
日本学術振興会・科学研究活動スタート支援・H23-24「ナノファイバーを用いたバイオハイブリッド材料の創製と幹細胞の微小環境制御」代表・採択 (H23年度 1690千円)