

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書

研究期間（ 2年目/ 3年間）

研究者 又は 研究代表者	氏名	(ふりがな) さくらい としひこ 櫻井 敏彦
	所属研究機関 部局・職	鳥取大学大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻・准教授 電話番号: 0857-31-5633 電子メール: sakurai@bio.tottori-u.ac.jp
研究課題名	海産廃棄物由来細胞外マトリックスの機能化～細胞分化を制御する3次元スキャフォールドの開発～	
研究結果	<p>[本年度の研究結果（研究方法、実験結果、分析結果等）について、当初の研究計画に沿って端的に記すこと。詳細なデータ等については、別に添付も可。]</p> <p><b>【当初の研究計画の端的な達成内容】</b></p> <p><b>II 細胞種類の選定・評価方法の策定</b></p> <p>1) 細胞の選定・準備 →ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞ならびにラット副腎髄質褐色細胞種由来細胞 (PC-12)を選定し、細胞培養実験の準備を行った。</p> <p>2) 2次元培養基材を用いた細胞機能評価 →従来の細胞培養用プラスチックシャーレと、市販品のコラーゲンコートした培養シャーレを使用する事とした。</p> <p>3) 市販3次元培養基材を用いた細胞機能評価 →市販品の3次元培養基材は選定したが、活性評価方法が確立できなかったため、検討できなかった。</p> <p><b>III 新規3次元スキャフォールドでの細胞機能評価</b></p> <p>1) 新規3次元スキャフォールドでの細胞接着性、伸展性、増殖性およびその他の細胞機能の評価</p> <p>a) 神経細胞を用いた細胞接着性・増殖性および3次元ネットワークの構築 →ラット副腎髄質褐色細胞種由来細胞 (PC-12)を用いた、細胞接着性・増殖性および3次元ネットワーク（神経樹状突起の形態観察、アセチルコリンエステラーゼ活性の評価）の構築を行った。</p> <p>b) 肝細胞・軟骨細胞の3次元培養における細胞機能評価。 →上述については、3次元スキャフォールド上での細胞増殖性が極端に低かったため検討できなかった。そもそもプロテオグリカンを基材に複合化させることで細胞機能を低下させている可能性も考えられ、再現性を評価していく必要がある。</p> <p><b>【実験方法】</b></p> <p>1) AC-CSPGs複合体の作製 水和ゲル状複合体：ACを20 mM緩衝液中で線維化後、AC量に対して所定量のCSPGs (0 当量 (eq.), 1/6 eq., 1 eq.) 溶液を加えた。次いで所定濃度の架橋剤1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) を加えて水和ゾルを作製した。これを24 h静置し、水和ゲルを作製した。 キセロゲル状複合体：先の条件と同様に水和ゾルを作製した。EDC添加直後に3000 rpmで遠心した後、得られた構造体をエタノールで洗浄後、減圧乾燥して高密度なキセロゲル構造体を作製した。全ての操作は、4℃条件下で行った。作製した構造体は2 % グルタルアルデヒドで固定化後、Pt-Pdスパッタで膜厚 10 ~ 20 nmとなるようコーティングをしてSEM観察に用いた (加速電圧15 kV)。</p> <p>2) 細胞機能評価 細胞機能評価には、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞ならびにラット副腎髄質褐色細胞種由来細胞 (PC-12) を用いた。HeLa細胞は10 % ウシ胎児血清 (FBS)を含むD-MEM, PC-12細胞は10 % 馬血</p>	

2) 細胞機能評価 (続)

清(HS), 5% FBS含有RPMI 1640を用い, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C条件下で培養した。

増殖性評価: 作製したAC-CSPGs複合体を各培地で1日以上膨潤させた後, HeLa細胞 (1x10<sup>4</sup> cell/tube) ならびにPC-12細胞(2x10<sup>4</sup> cell/tube) を播種し, 所定時間インキュベートした。各サンプルにWST-8 を加えた後2時間培養し, 450 nmにおける吸光度を測定した。分化誘導効率評価: AC-CSPGs複合体を培地で膨潤させた後, PC-12細胞 (1.5x10<sup>4</sup> cell/tube)を播種し,24 h 前培養した。RPMI-1640無血清培地に置換した後に神経成長因子 (mNGF 2.5S) が50 ng/mlとなるように添加し分化誘導した。培養後, 細胞数とアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性をそれぞれPrestoBlue試薬ならびにDTNB試薬を用いて定量した。

【実験結果】

**AC-CSPGs複合体の内部構造:** 細胞外培養基材としての展開を念頭に, type-I, II, IV ACとCSPGsの複合体を作製した。その結果, CSPGsを含まないtype-I ACの場合はコラーゲン線維が3次元的なネットワークを形成するのに対して, CSPGsの添加に伴いこれらの線維状ネットワーク間に平面膜構造が形成された。Type-IV ACの場合, CSPGsを添加しない場合はtype-I ACと同様にコラーゲン線維からなるネットワークが形成された。また, 1/6 eqのCSPGs添加では明確な構造体を形成しなかったものの, 1 eqのCSPGsではtype-I ACの場合と比較して比較的剛直な樹木状のネットワークが形成され, 5 eq.ではこの構造に平面膜状の構造が形成されることがわかった。作製した水和ゲルはtype-IVが全般的にもろく, 細胞培養基材としての利用は困難と判断し, 以降type-I AC-CSPGs複合体を用いて細胞機能の評価した。

研究結果

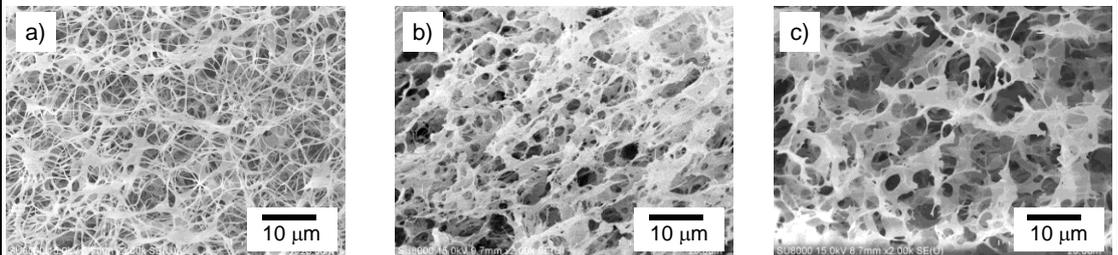


Fig.1 SEM images of type-I AC-CSPGs complex with a) 0 eq., b) 1/6 eq., and c) 1 eq. CSPGs. [Type-I AC] = 1.0 mg/ml, [EDC] = 100 mM.

細胞増殖性: Type-I AC-CSPGs複合化水和ゲルおよび高密度キセロゲルを用いたHeLa細胞の増殖性評価の結果 (Fig. 1), 水和ゲルでは細胞増殖性は見られなかった。これは, CSPGsの硫酸基のアニオン性が細胞の接着性を阻害したこと, さらには細胞増殖のための足場として基材自体の強度が低いことが原因と推察された。このため, 遠心により密度を高めた高密度キセロゲルを作製し, 細胞増殖性を評価した結果, 水和ゲルと比較して顕著な増殖性が確認された。また, PGの添加量が増加 (0 eq., 1/6e

q., 1 eq.) するに伴い, わずかに増殖性が低下することが示された。同様の傾向はPC-12細胞でも観察された。以上の結果から, 細胞増殖性にはscaffoldの硬さが重要で, 高密度キセロゲル状に作製したtype-I AC-CSPGs構造体が細胞培養基材として利用できることが示された。

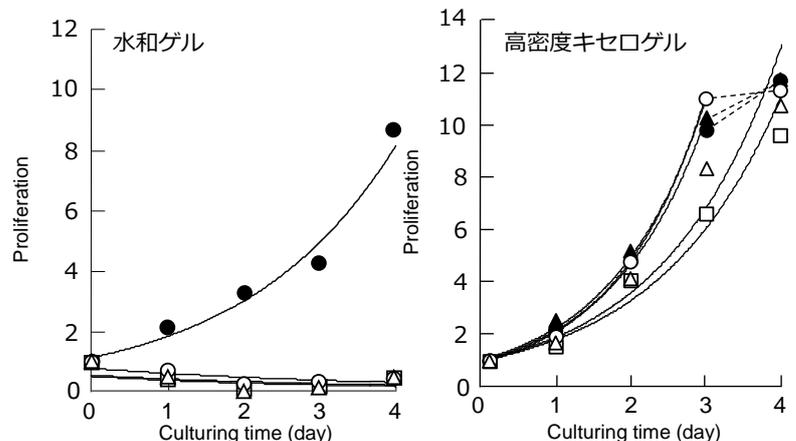


Fig. 1 Type-I AC-CSPGs複合化構造体を用いたHeLa細胞の増殖性. ((○): 0 eq., (△): 1/6 eq., (□): 1 eq., CSPGs)

※詳細なデータについては別に添付。

研究成果	<p>[本年度の研究成果 (知見・技術) について、具体的に記すこと。詳細なデータ等については、別に添付も可。]</p>	
	<p><b>【概要】</b>          本年度の研究成果について、作製した3次元スキャフォールド上における神経細胞のアセチルコリンエステラーゼ活性を評価した結果、神経細胞の分化誘導を劇的に向上させる事が示された。特に、1/6 eq.のPGを含む基材でアセチルコリンエステラーゼ活性の向上が見られた。</p> <p><b>【詳細】</b>          分化誘導効率：PC-12細胞はmNGFにより分化誘導され、神経線維を伸長し交感神経節ニューロン様性質を誘起する。分化に伴いAChE活性が上昇するため、神経分化マーカーとなりうる。NGFを添加してから1, 3日後のAChE活性ならびに細胞数を測定し、scaffold中のPG濃度に対する単位細胞あたりのAChE活性を算出した。高密度な水和ゲル状AC-CSPGs複合体を用いた分化誘導効率について、1/6 eq.では0 eq.の場合と比較して顕著に細胞増殖性が低下し、1日後ではAChE活性が低下したものの、3日後では約30%向上することが示された。また、1 eq.では時間と共に細胞増殖性を阻害し、AChE活性が上昇していくことが示された。一方で、高密度キセロゲル状構造体では、1/6 eq.のPGを含む基材で顕著に増殖性が抑制され、また分化誘導後3日目において、0eq.と比較すると細胞あたりのAChE活性が急激に上昇することがわかった。生体内構造と同様の配分率において顕著なAChE活性の上昇が観察されたことは非常に興味深い。</p> <p>以上の結果から、最終的なAChE活性は1 eq.において最も高くなることが示されたが、生体内組成と同様のAC含率である1/6 eq.において顕著な増殖性の低下と効率的なAChE活性の向上が見られた。今後はこの細胞内メカニズムを解明していく必要がある。</p>	<p>Fig.2 AChE activity and cell viability of PC-12 cell on each 3D-scaffold stimulated by mNGF 2.5S.</p>
<p>次年度研究計画</p>	<p>[次年度の研究計画について簡潔に記すこと]</p> <p>IV 新規3次元スキャフォールドでの間葉系幹細胞の分化誘導</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 間葉系幹細胞の細胞接着性・増殖性の評価.</li> <li>2) 3次元スキャフォールドを用いた間葉系幹細胞の分化誘導能評価             <ol style="list-style-type: none"> <li>a) 脂肪細胞への分化誘導効率の評価.</li> <li>b) 軟骨細胞への分化誘導効率の評価.</li> <li>c) 骨細胞への分化誘導効率の評価.</li> </ol> </li> </ol>	
<p>報告責任者</p>	<p>所属・職氏名</p>	<p>研究・国際協力部研究協力課・課員・朝野弘昭          0857-31-5494          ken-jyosei@adm.tottori-u.ac.jp</p>

- 注1) 表題には、環境部門、地域部門、北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。
- 2) 「研究期間 ( 年目/ 年間) 」及び「次年度研究計画」は、環境部門のみ記載すること。
- 3) 研究者の知的財産権などに関する内容等で、非公開としたい部分は、罫線で囲うなど明確にし、その理由を記すこと。
- 4) 研究実績のサマリーを併せて提出すること。

海産廃棄物由来細胞外マトリックスの機能化～細胞分化を制御する3次元スキャフォールドの開発～

鳥取大学大学院工学研究科 化学・生物応用専攻  
准教授 櫻井 敏彦

【緒言】

多細胞生物の発生過程において、一般的に細胞の自己増殖と分化は相反する関係にある。生体外培養の際、従来の2次元のな基材ではこれらの機能を両立させることは困難で、増殖性、分化効率や分化後の細胞機能の低下を引き起こし、場合によっては細胞死を誘導することが指摘されている。このため、生体内環境を模倣することを目標に、細胞外マトリックス (ECM) の中でも特にアテロコラーゲン (AC) を主成分とした3次元的な培養基材 (scaffold) が数多く作製され、その効果について報告されてきた。一方で、ECMの成分であるプロテオグリカン (PG) は様々な刺激因子と結合 (co-receptor) し細胞機能を調節するだけでなく、上皮細胞成長因子と同様に増殖・分化作用を有することも報告<sup>2)</sup>され、細胞機能へのPGの関与について重要性が提唱されている。このように優れた機能が期待できる反面、多様性に富むPGの機能特定は困難で、加えてコストパフォーマンスの低さから汎用的に使用されていないのが実情である。

本研究グループでは、PGの生理機能に着目した新たな培養基材の開発を念頭に、これまでに海産廃棄物からのECM類の高純度抽出法を確立してきた。本研究では、このPGを用いてACの再線維化構造を基本骨格としたAC-CSPGs複合構造体の構築と内部構造を評価した。さらに、得られた構造体をscaffoldとして用い、がん細胞ならびに褐色細胞腫の神経細胞への分化効率を評価した。

【結果概要】

AC-CSPGs複合体 (3次元スキャフォールド) の作製方法の確立とその内部構造を評価することを目的として、type-I, II, IV ACとCSPGsの複合体を作製した。その結果、CSPGsを含まないtype-I ACの場合はコラーゲン線維が3次元的なネットワークを形成するのに対して、CSPGsの添加に伴いこれらの線維状ネットワーク間に平面膜構造が形成された。Type-IV ACの場合、CSPGsを添加しない場合はtype-I ACと同様にコラーゲン線維からなるネットワークが形成された。また、1/6 eqのCSPGs添加では明確な構造体を形成しなかったものの、1 eqのCSPGsではtype-I ACの場合と比較して比較的剛直な樹木状のネットワークが形成され、5 eq.ではこの構造に平面膜状の構造が形成されることがわかった。作製した水和ゲルはtype-IVが全般的にもろく、細胞培養基材としての利用は困難と判断し、以降type-I AC-CSPGs複合体を用いて細胞機能を評価した。

先に得られたAC-CSPGs複合体 (3次元スキャフォールド) を細胞培養基材として利用した際の細胞機能を評価した。PC-12細胞はmNGFにより分化誘導され、神経線維を伸長し交感神経節ニューロン様性質を誘起する。分化に伴いAChE活性が上昇するため、神経分化マーカーとなりうる。NGFを添加してから1, 3日後のAChE活性ならびに細胞数を測定し、scaffold中のPG濃度に対する単位細胞あたりのAChE活性を算出した。この結果、高密度な水和ゲル状AC-CSPGs複合体を用いた分化誘導効率について、1/6 eq.では0 eq.の場合と比較して顕著に細胞増殖性が低下し、1日後ではAChE活性が低下したものの、3日後では約30 %向上することが示された。また、1 eq.では時間と共に細胞増殖性を阻害し、AChE活性が上昇していくことが示された。一方で、高密度キセロゲル状構造体では、1/6 eq.のPGを含む基材で顕著に増殖性が抑制され、また分化誘導後3日目において、0eq.と比較すると細胞あたりのAChE活性が急激に上昇することがわかった。生体内構造と同様の配分率において顕著なAChE活性の上昇が観察されたことは非常に興味深い。

以上の結果から、最終的なAChE活性は1 eq.において最も高くなることが示されたが、生体内組成と同様のAC含率である1/6 eq.において顕著な増殖性の低下と効率的なAChE活性の向上が見られた。今後はこの細胞内メカニズムを解明していく必要がある。