

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（環境創造部門）

研究期間（ 3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>【当初の研究計画の端的な達成内容】</p> <p>III 3次元スキャフォールドでの細胞機能評価</p> <p>1) 3次元スキャフォールドでの細胞接着性, 伸展性, 増殖性等の細胞機能評価.</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. →肝細胞(HepaRG細胞)と軟骨細胞(HC(Normal)細胞)のAC-CSPGs複合体(3次元スキャフォールド)上での細胞接着性と増殖性をCellTiter-Glo 3D Cell Viability Assayにより評価した。 (結果) いずれの細胞においても基材に対して高い接着性(約90%)と増殖性を示した。</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> <p>1) 間葉系幹細胞の細胞ラインの確立. →骨髄由来不死化間葉系幹細胞UE6E7T-3細胞を選定し, 細胞培養ラインを確立した。</p> <p>2) 間葉系幹細胞の細胞接着性・増殖性評価. →骨髄由来不死化間葉系幹細胞UE6E7T-3細胞を用いて3次元スキャフォールドへの細胞接着性と増殖性をCellTiter-Glo 3D Cell Viability Assayにより評価した。 (結果) 接着性については高い値(約95%)をしめしたものの, 増殖性は従来の2次元培養基材と比較しておよそ20%程度低下した。</p> <p>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</p> <p>a) 脂肪細胞への分化誘導効率の評価. →UE6E7T-3細胞(JCRB1136)をAC-CSPGs複合体で培養後, ヒト間葉系幹細胞脂肪細胞分化培地(Cambrex社, insulin, dexamethasone, indomethacin, IBMXを含む)を用いて誘導培養した。培養後, 4%パラホルムアルデヒド固定し, Oil Red Oにより染色した。 (結果) 中性脂肪(赤染粒子)が蓄積されていることを顕微鏡観察により確認した。</p> <p>b,c) 軟骨・骨細胞への分化誘導効率の評価. →UE6E7T-3細胞(JCRB1136)をAC-CSPGs複合体で培養後, ヒト間葉系幹細胞軟骨分化培地(Funakoshi社, MSC go ゼノフリー軟骨分化培地 XF™)、ヒト間葉系幹細胞骨分化培地(Funakoshi社, MSC go ゼノフリー骨分化培地 XF™)を用いて誘導培養した。培養後, toluidin Blue(軟骨細胞)および2% ARS(骨細胞)で染色した。 (結果) 顕微鏡観察より, 軟骨・骨細胞への分化が誘導されたことが示された。</p>	

<b>研究成果</b>	<p>初年度の成果では、海産廃棄物（鮭鼻軟骨）からの細胞外マトリクス（アテロコラーゲン（AC）およびコンドロイチン硫酸型プロテオグリカン（CSPGs）の抽出を行い、これらを用いて生体内環境を高度に模倣した3次元スキヤフォールドの作成方法を確立した。</p> <p>2年目の成果では、先に得られたAC-CSPGs複合体（3次元スキヤフォールド）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結果、ラット副腎髄質褐色細胞種由来細胞（PC-12）の神経成長因子（mNGF 2.5S）による分化誘導において、神経分化マーカーとなるアセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性がPG含率に依存して増加する傾向が示された。</p> <p>3年目の成果では、先のAC-CSPGs複合体（3次元スキヤフォールド）を細胞培養基材として、骨髄由来不死化間葉系幹細胞UE6E7T-3細胞の分化誘導効率について検討した。脂肪細胞への分化誘導では、Oil Red O 染色による中性脂肪が確認されただけでなく、軟骨・骨細胞への分化誘導も可能であることが示された。一方で、今回用いたAC-CSPGs複合体（3次元スキヤフォールド）からの細胞剥離は困難で、脂肪細胞への分化指標となるGPDH活性を含む脂肪、軟骨、骨細胞への分化誘導効率を詳細に求めることが困難であった。</p> <p>これらの成果は、海産廃棄物由来細胞外マトリクスを安価に抽出精製し、有機化学的な手法により再構築することで機能性培養基材としての利用が可能であることが示された。間葉系幹細胞への分化誘導効率の具体的な数値を算出するに至らなかったが、評価系を変えて検討し、従来の培養基材との差を比較することで優位性を示す必要がある。</p>	
<b>次年度研究計画</b>	<p>〔次年度の研究計画について簡潔に記すこと〕 本年度で終了</p>	
<b>報告責任者</b>	<b>所属・職 氏名</b>	<p>鳥取大学 研究推進部 研究推進課 研究助成係 高田 志保 電話番号 0857-31-5494 電子メール ken-jyosei@ml.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次元的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、神経細胞ならびにヒト由来間葉系幹細胞の分化効率への影響について検討した。

**【経過概要】** 間葉系幹細胞として骨髄由来不死化間葉系幹細胞UE6E7T-3細胞を選定し、細胞培養ラインを確立した。UE6E7T-3細胞の3次元スキャフォールドへの細胞接着性と増殖性をCellTiter-Glo 3D Cell Viability Assayにより評価した結果、接着性については高い値 (約95%) を示したものの、増殖性は従来の2次元培養基材と比較しておよそ20%程度低下した。次に、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を目的として、ヒト間葉系幹細胞脂肪細胞分化培地 (Cambrex社、insulin, dexamethasone, indomethacin, IBMXを含む) による脂肪細胞への分化誘導を試みた。UE6E7T-3細胞 (JCRB1136)をAC-CSPGs複合体で培養後、ヒト間葉系幹細胞脂肪細胞分化培地を用いて誘導培養した。Oil Red Oにより染色した結果、中性脂肪が蓄積されていることを顕微鏡観察により確認した。同様に、ヒト間葉系幹細胞軟骨分化培地 (Funakoshi社、MSC go ゼノフリー軟骨分化培地 XF<sup>TM</sup>)、ヒト間葉系幹細胞骨分化培地 (Funakoshi社、MSC go ゼノフリー骨分化培地 XF<sup>TM</sup>)を用いて軟骨・骨細胞への分化誘導を検討した。培養後、toluidin Blue (軟骨細胞) および2% ARS (骨細胞) で染色した結果、顕微鏡観察より、軟骨・骨細胞への分化が誘導されたことが示された。

**【結果概要】** 初年度の成果では、海産廃棄物 (鮭鼻軟骨) からの細胞外マトリックス (アテロコラーゲン (AC) およびコンドロイチン硫酸型プロテオグリカン (CSPGs)の抽出を行い、これらを用いて生体内環境を高度に模倣した3次元スキャフォールドの作成方法を確立した。

2年目の成果では、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結果、ラット副腎髄質褐色細胞種由来細胞 (PC-12)の神経成長因子 (mNGF 2.5S)による分化誘導において、神経分化マーカーとなるアセチルコリンエステラーゼ (AChE)活性がPG含率に依存して増加する傾向が示された。

3年目の成果では、先の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、骨髄由来不死化間葉系幹細胞UE6E7T-3細胞の分化誘導効率について検討した。脂肪細胞への分化誘導では、Oil Red O 染色による中性脂肪が確認されただけでなく、軟骨・骨細胞への分化誘導も可能であることが示された。一方で、今回用いたAC-CSPGs複合体 (3次元スキャフォールド) からの細胞剥離は困難で、脂肪細胞への分化指標となるGPDH活性を含む脂肪、軟骨、骨細胞への分化誘導効率を詳細に求めることが困難であった。

**【総括】** 以上の成果は、海産廃棄物由来細胞外マトリックスを安価に抽出精製し、有機化学的な手法により再構築することで機能性培養基材としての利用が可能であることが示された。間葉系幹細胞への分化誘導効率の具体的な数値を算出するに至らなかったが、評価系を変えて検討し、従来の培養基材との差を比較することで優位性を示す必要がある。