

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：革新的先端研究開発支援事業
2. 研究開発課題名：幹細胞の品質保持培養のためのメカノバイオマテリアルの開発
3. 研究開発代表者： 木戸秋 悟（先導物質化学研究所）
4. 研究開発の成果

本研究は、再生医療等製品の原材料としてのヒト間葉系幹細胞（hMSC）の品質評価系の確立を目指して、独自の弾性マイクロパターンニングゲルを用いたメカノシグナル振動入力培養基材による幹細胞分化フラストレーション現象に基づき、分化フラストレート hMSC の幹細胞性の総合的評価を行うとともに、その未分化維持のメカノバイオオロジーメカニズムについて細胞の側からの詳細な機能解析を行う。そしてそのデータの蓄積を踏まえ、幹細胞の未分化性や分化プロペンシティ等を含む細胞特性について遺伝子発現解析等を用いた簡便な評価法の開発を目指す。初年度の 4 ヶ月は、以下の 3 課題について検討を進めた。（1）分化フラストレート幹細胞の大量調製技術の基盤となる弾性パターンニングゲルの大面積化。（2）分化フラストレート hMSC の遺伝子発現の網羅的評価のためのコントロール実験としての、異なる硬さの均一弾性率ゲル上で培養した hMSC についての DNA マイクロアレイ解析。（3）hMSC の未分化マーカー遺伝子の候補探索の研究対象サンプル収集のため、骨分化に対するプロペンシティの違う hMSC 株の選定、およびいくつかの遺伝子発現との関連性についての検討。

（1）弾性パターンニングゲルの大面積化：従来確立していた縮小投影式光リソグラフィ装置の改良を行い、縮小投影により一回の光照射で作製される弾性パターンニングゲルを一枚の基材表面上で自動的に隣接配置させる技術を確認した。弾性パターンニングを施す光架橋性ゼラチンゲル以外の基材領域に細胞が接着・移動することを排除するため、ゲル配置領域以外にポリエチレングリコール（PEG）を光化学固定し細胞非接着領域とした。PEG 層の光固定条件の最適化および未反応 PEG の洗浄除去条件の最適化、PEG 領域と StG 領域の正確な隣接のための配置調整、複数 StG ゲルの逐次的作製に伴うゾルへの酸素溶解度上昇の排除のための光照射系への窒素雰囲気導入、などの課題を各々確立することで、ガラス基材上に均一な弾性率を有する複数の弾性パターンニングゲルを並べることに成功し（図 1）、分化フラストレート MSC の幹細胞性の徹底的评价のために必要な細胞数確保への基盤を整備した。

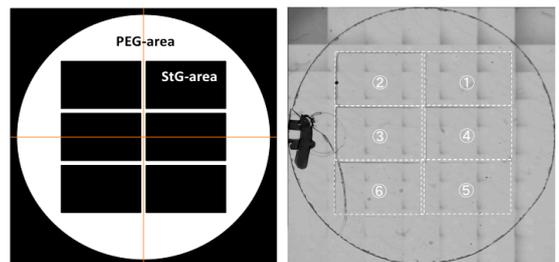


図 1. 光架橋ゼラチンゲルの大面積化。左）細胞非接着領域（PEG-area）とパターンニングゲル領域（StG-area）の配置設計図。右）逐次的に隣接配置させた StG ゲルの位相差顕微鏡像。直径 18mm のガラス基材上に作製されている。

（2）均一弾性率ゲル上での培養した hMSC の網羅的遺伝子発現解析：光架橋性ゼラチンの軟条件（1-3 kPa）、硬条件（70-100 kPa）、及び通常の組織培養用プラスチックシャーレ上でそれぞれ hMSC を 7 日間培養し、mRNA 発現を網羅的に測定し、得られたマイクロアレイデータからパスウェイ解析を行った。培養力場の違いにより hMSC の遺伝子発現に様々な影響を与えている事がわかった。通常のプラスチックシャーレ上で培養した hMSC と比較して、軟ゲル上での培養により、細胞の増殖や分化の制御、細胞の遊走の促進などの特徴的な変化が認められた上に、骨分化や神経分化に関わる遺伝子発現の上昇も見られ、潜在的な多分化能の保持の可能性も示唆された。一方、硬ゲル上での培養では、軟ゲル上と同様な変化もいくつか見られたものの、細胞の遊走の促進に関わる変化は認められない等、弾性率の違いによる特徴も見出された。来年度より開始する弾性パターンニングゲル上での MSC の網羅的遺伝子発現解析のコントロールデータを確立した。

（3）分化プロペンシティの異なる hMSC 株の選定：Lonza 社より購入した骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）13 株（lot）に対しそれぞれ骨分化誘導を行い、アリザリンレッド染色によるカルシウム沈着の測定によって骨分化度を測定した。その結果、骨分化能が確認された hMSC を 3 株、骨分化誘導されなかった hMSC を 10 株見出した。さらに、骨分化に関わる因子（RUNX2, COL1, ALP, OPN, OCN）の遺伝子発現についてリアルタイム PCR による定量的解析を行ったところ、それぞれの発現量が骨分化のプロペンシティと相関しない場合がいくつか見受けられ、MSC の幹細胞性に関わる骨分化能評価のためには、より再現性、信頼性の高いマーカーの選定が必要であることがわかった。来年度以降は、分化誘導法による違いも考慮に入れつつ骨分化誘導を行い、分化プロペンシティが分化誘導法に依存する株と依存しない株を見出す。そして、それぞれの遺伝子発現の違いを検討し、より強く骨分化のキーとなるマーカー遺伝子とその発現レベルを探る。この際、弾性パターンニングゲル培養による分化フラストレート MSC を対照細胞として解析していく。