

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Development of Mechanobio-Materials for Quality Assurance Culture of Stem Cells

研究開発担当者 (日本語) 九州大学先導物質化学研究所・教授・木戸秋 悟
所属 役職 氏名： (英語) Satoru Kidoaki, Professor, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 間葉系幹細胞の幹細胞性の総合的評価および簡易評価系の確立
開発課題名： (英語) Comprehensive evaluation of stem cell characteristics of mesenchymal stem cells and establishment of simplified evaluation system

研究開発分担者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長 澤田留美
所属 役職 氏名： (英語) Rumi Sawada, Chief, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

II. 成果の概要 (総括研究報告)

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)は再生医療等の臨床応用に最も近い細胞加工品資源として注目される幹細胞の一つであるが、採取方法や個体差の影響、および培養中の状態変化等に起因した細胞ロット間のばらつきが大きく、その品質を保証する評価基準と培養技術の確立が強く求められている。培養中のMSCの品質変化の一因として、培養環境の力学的環境の経験履歴の記憶の関与が近年報告され、MSCの品質保持培養における培養力学場の定義が課題となっている。この課題に対し本研究課題では、細胞培養ゲルに対して微視的に弾性率の分布を刻みこみ、MSCがその上を自発的に遊走する過程で力学場のパターンから受けるメカノシグナルの入力を振動させるアプローチにより、MSCに未分化状態を保持させる培養力学場の設計を行っている。すなわち、硬・軟領域の周期的弾性場で間葉系幹細胞を培養すると、各領域間の非定住運動の過程

で硬・軟領域それぞれにおいて対応する系統へと分化誘導される効果が抑制され未分化性が維持され得る（分化フラストレーション現象）。今年度は、(1) MSC の分化フラストレーション誘導の主動因と考えられる非一様弾性場からのメカノシグナルの振動的入力の実証、(2) MSC の運動並びに分化の方向を制御する基材ゲル弾性率の閾値条件の決定、(3) マイクロアレイによる分化フラストレート MSC の網羅的遺伝子解析、(4) 骨分化プロペンシティの異なる MSC の選定と骨分化能マーカーの探索、を中心に研究を進めた。

(1) 非一様弾性場からのメカノシグナルの振動的入力の実証（木戸秋グループ：九州大学先導研）

硬軟ストライプパターンニングゲル上でヒト MSC（以下、hMSC）が運動する系において、ゲルの局所変形応答を有限要素法により数値的に求め、細胞がゲル表面に加えている牽引力の分布を推定した。大きな牽引力が働いている領域に着目し、各時間における平均的牽引力と牽引力が働く場所の平均的基材硬さの相関を解析したところ、一様弾性場のゲルと異なり弾性パターンニングされた非一様弾性場のゲル上では、牽引力の顕著な揺らぎが確認された。hMSC が弾性パターンニングゲル上を非定住運動することで、メカノシグナルの入力が大きく揺動していることを実証できた。

(2) hMSC の運動並びに分化の方向を制御する基材ゲル弾性率の閾値条件の決定（木戸秋グループ）

分化フラストレーションの誘導においては、硬領域と軟領域の間での非定住運動を確保しつつ、硬軟各領域に一定期間定住する際に起こる弾性率依存的系統決定のシグナル入力をスイッチングさせることが必要である。この状況を誘導するためには、硬軟領域の境界域での弾性勾配の適切な設定（一定の閾値以上で硬領域への偏在が起こるため）と、硬軟各領域の弾性率の絶対値が細胞内のメカノトランスデューサー因子の活動に与える影響を正確に踏まえることが不可欠である。この課題に対して、基材ゲルの硬軟境界の弾性勾配強度と弾性率絶対値を系統的に設計することで、hMSC の硬領域指向性運動を駆動する弾性勾配の閾値と、YAP/TAZ および Runx2 の核内移行を誘導する弾性率の閾値をそれぞれ決定した。

(3) 分化フラストレート hMSC の網羅的遺伝子解析（澤田・木戸秋グループ）

マイクロアレイ解析の実施において必要となる mRNA 量を準備するためには、パターンニングゲル上で培養された十分数の細胞を確保する必要がある。パターンニングの精度を正確に維持しつつ面積を拡大した弾性パターンニングゲルの作製条件を確立した上で、ゲルの軟条件（<10kPa; S）、硬条件（70 - 100kPa; H）及び硬軟パターンニングゲル(PG)上でそれぞれ hMSC を 7 日間培養した後、mRNA 発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に測定したところ、S 上での hMSC の培養により細胞の遊走、増殖や分化、生存や恒常性維持等の上昇、一方 H 上では細胞の生存や神経系等の機能の上昇に関わる遺伝子発現の有意な変化が見られ、弾性率の違いによる hMSC の培養力学場応答性の特徴が示された。PG 上では細胞の増殖・分化や遊走の促進に加え脳神経系に関わる遺伝子の発現上昇及び誘導が特徴的に認められた。PG による細胞の遊走の上昇が遺伝子発現の変化からも検証され、細胞の分化能についても上昇する事が示唆された。今後さらに詳細に PG 上で培養された hMSC の幹細胞特性について検証する予定である。

(4) 骨分化プロペンシティの異なる hMSC 株の選定と骨分化能マーカーの探索（澤田グループ：国立衛研）

分化フラストレート MSC の幹細胞性の検証にあたり、この培養を適用する MSC 株の性状を定義することが不可欠である。MSC の定義である骨・軟骨・脂肪の三方向分化能のうち、株による分化能の差が最も大きく多分化能の保持を検討する上でキーとなる骨分化について、プロペンシティの異なる hMSC 株の選定を行った。hMSC 10 株について骨分化誘導を行い、骨分化の効率の異なる 3 株についてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なったところ、骨分化を示さない hMSC 株で有意に発現が高く、骨分化を示した株ではほとんど発現していない遺伝子を見出した。この遺伝子が骨分化能を予測できるマーカー遺伝子候補の一つであることが示唆された。今後、マーカー遺伝子としての妥当性について確認していく。

Mesenchymal stem cell (MSC) is one of the most potent stem cells, and is a strong cell-resource closest to the clinical application for regenerative medicine. However, standardization and quality assurance of the MSC are essential issues because the quality of MSC is easily varied depending on collection method, individual differences, and changes in stemness during culture. Therefore, to establish the evaluation criteria and culture techniques for assuring the quality of MSC has been strongly required.

As an important factor to cause quality change of MSC during culture, involvement of memory of MSC on mechanical conditions of culture environment has recently been reported. Precise definition of mechanics of the culture substrate that can preserve quality of MSC is a problem. For this problem, we try to establish the design of micro-mechanical field of cell culture hydrogel that can maintain undifferentiated state of MSC. The main strategy is to regulate the mechanical signals input to the cells from local mechanical field during spontaneously migration of MSCs, i.e., when MSCs are cultured in a

periodically-designed elastic field such as alternating patterns of stiff and soft regions, a kind of vibrating mechanical signal input to MSCs from each of stiff and soft region are generated especially in the normadic mode of movement between those two regions. We have preliminarily observed before that the MSCs after the normadic movement keep the undifferentiated state due to inhibition of fixation of mechanical memory (we call this phenomenon as “frustrated differentiation”).

In this project, we aim to fully prove the phenomenon and concept of the frustrated differentiation, and to apply the culture methodology for finding standardized MSCs because the MSC culture in normadic mode of movement on heterogeneous mechanical field always initialize mechanical memory from culture substrate. This year, the following four research issues were investigated: (1) demonstration of oscillatory input of mechano signal, (2) Determination of threshold conditions of gel elastic modulus to control motility and differentiation of hMSC, (3) comprehensive gene analysis of MSC in mode of frustrated differentiation, (4) selection of hMSCs with different propensity for osteoinduction and search for bone differentiation markers.

(1) Demonstration of oscillatory input of mechano signal (Kidoaki Group):

For the microelastically striped-patterned gels with alternating stiff and soft regions on which hMSCs were cultured with normadically moving around different regions of elasticity, local deformation of the gel surface is numerically measured by the finite element method, and the spatio-temporal dynamics of the traction forces of hMSCs were estimated. Analyzing the correlation between the averaged traction force at each time and the averaged stiffness of each region where the traction forces were generated, a remarkable fluctuation of the traction forces was confirmed on the microelastically striped-patterned heterogeneous gels unlike on the elastically-homogeneous gels. It has been successfully demonstrated that the normadic movement of the hMSC on the elastically-patterned gels could induce largely fluctuating oscillatory input of mechanical signal to the MSCs.

(2) Determination of threshold conditions of gel elastic modulus to control motility and differentiation of hMSC (Kidoaki Group):

For the induction of frustrated differentiation, it is necessary to switch the strength of mechanical signals input to MSC from the different regions of elasticity during normadic movement between them. To satisfy this requirement, it is essential to appropriately set the elasticity gradient strength in the elasticity boundary in order to avoid cell accumulation into stiff region above a certain threshold of gradient strength (i.e., suppression of durotaxis), and essential to precisely know the absolute values of the elastic modulus of the gel which affect the activity and behaviors of mechano-transducer molecules. To address this problem, by systematically designing the elastic gradient strength and the absolute value of elastic modulus of the gels, the threshold of the elastic gradient that drives durotaxis of hMSC and the threshold value to induce nuclear localization of YAP / TAZ and Runx 2 were successfully determined.

(3) Comprehensive gene analysis of hMSC in mode of frustrated differentiation (Sawada-Kidoaki Group):

To prepare enough amount of mRNA for microarray analysis, it is necessary to get a sufficient number of cells that experienced normadic culture on the elastically-patterned gels. After establishing the conditions for preparing the gels with an enlarged area and accurate patterns of elasticity distribution, hMSCs were cultured for 7 days on the soft gels (<10 kPa; S), hard gels (70-100 kPa; H), and patterned gel (PG) of photocrosslinkable gelatin, then mRNA expression was exhaustively measured by the DNA microarray. On S gels, upregulation of expression of gene relating to cell migration, proliferation and differentiation, survival and homeostatic maintenance was detected. On the other hand, significant changes in gene expression relating to survival of cells and elevation of functions such as the nervous system were observed on H gels, indicating characteristics of hMSC responsiveness to matrix stiffness. On PG gels, in addition to promoting proliferation / differentiation and migration of cells, the expression of genes relating to the cranial nervous system was elevated and induced characteristically. It was suggested that the increase in migration of cells on PG was also verified from the change in gene expression, and the differentiation potential of the cells also increased. We will further verify the stemness of hMSC cultured on PG in more details next year.

(4) Selection of hMSCs strains with different propensity for osteoinduction and search for bone differentiation markers. (Sawada Group):

To verify the stemness of the MSC in frustrated differentiation, it is indispensable to define the properties of the MSC strain to be applied for the normadic culture on the elastically-patterned gels. Selection of hMSC strains with different propensity for osteoinduction was done. Osteogenic

differentiation was induced for 10 strains of hMSC and comprehensive gene expression analysis using microarray was performed for 3 strains with different efficiency of osteogenic differentiation. As the result, we found a gene whose expression was significantly higher in the hMSC strain without osteogenic differentiation ability and little expression in the strain having the ability. It was suggested that the gene is one of marker candidates that can predict osteogenic differentiation potential of hMSC.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌4件、国際誌5件）

1. Kuboki T, Kidoaki S, Fabrication of elasticity-tunable gelatinous gel for mesenchymal stem cell culture, *Methods Mol. Biol.* 2016, 1416, 425-441.
2. 木戸秋 悟, “細胞操作メカノバイオマテリアル” バイオマテリアル -生体材料- 2016, 34, 112-119.
3. 木戸秋 悟, “メカノバイオマテリアル” 医学のあゆみ, 医歯薬出版 (2016) 257, 1119-1123.
4. Kono K, Hiruma H, Kobayashi S, Sato Y, Tanaka M, Sawada R, Niimi S. In vitro endothelialization test of biomaterials using immortalized endothelial cells. *PLoS ONE* 2016, 11(6): e0158289.
5. 木戸秋 悟 “基材硬さと細胞の関係” 『細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・開発の留意点』（第9章第3節）、情報機構, 2016（分担執筆）。
6. Shimada N, Saito M, Shukuri S, Kuroyanagi S, Kuboki T, Kidoaki S, T. Nagai, A. Maruyama, Reversible monolayer/spheroid cell culture switching by UCST-type thermoresponsive ureido polymers, *ACS Applied Mater. Interf.* 2016, 8, 31524-31529.
7. 木戸秋 悟, “細胞操作メカノバイオマテリアルの設計と幹細胞操作材料への応用” *Clinical Calcium*, 医薬ジャーナル社 2016, 26, 123-128.
8. Hasebe-Takada N, Kono K, Yasuda S, Sawada R, Matsuyama A, Sato Y. Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. *Regenerative Therapy* 2016, 5, 49-54.
9. Kurimura T, Takenaka Y, Kidoaki S, Ichikawa M, Fabrication of Gold Microwires by Drying Gold Nanorods Suspensions, *Adv. Mater. Interf.* 2017, 1601125.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Traction force microscopy of mesenchymal stem cells in mode of frustrated differentiation, ポスター, Kidoaki S, Hamano K, Kuboki T. 10th World Biomaterials Congress, 2016/05/18, 国外
2. Association of line-1s expression with apobec3b genotypes in human mesenchymal stem cells. ポスター, Kono K, Sawada R, Sato Y. International Society for Stem Cell Research 2016, 2016/6/23, 国外.

3. Surface elasticity tunable gelatinous gel for manipulation of stem cell fate determination and directional cell migration, 口頭, Kuboki T, Kidoaki S. 6th International Polymer Conference of Thailand, 2016/06/30, 国外
4. Live imaging of paxillin in durotactic migrating cells on the microelastically patterned hydrogels, 口頭, Kuboki T, Matsuda T, Nagai T, Ebata H, Kidoaki S, KJF-ICOMEF 2016, 2016/09/05, 国内
5. 細胞培養リソグラフィーハイドロゲルの開発と設計, 口頭, 佐々木 沙織, 江端 宏之, 大園 拓哉, 木戸秋 悟, 第 65 回高分子討論会, 2016/09/14, 国内
6. 非一様弾性基材上で培養された幹細胞におけるメカノシグナル動的入力特性の解析, 口頭, 江端 宏之, 濱野 浩佑, 木戸秋 悟, 第 65 回高分子討論会, 2016/09/14, 国内
7. 力学的強度の制御を可能とする光架橋性コラーゲンゲルの開発, ポスター, 藤澤 貴宏, 木戸秋 悟, 第 65 回高分子討論会, 2016/09/15, 国内
8. Mechanotransduction and redox signaling in stem cells, ポスター, Kuboki T, Kidoaki S, Kantawong F, Mechanobiology of Disease, 2016/09/29, 国外
9. iPS 細胞の分散培養最適化のためのラミニン固定化弾性率可変ハイドロゲル基材の設計, ポスター, 水本 健太, 木戸秋 悟.日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/21. 国内
10. がん細胞の浸潤能診断のための弾性率可変マイクロファイバーゲルマトリックスの設計, ポスター, 仲村 悠, 木戸秋 悟, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内
11. 多糖類ナノファイバー分散培地を用いた間葉系幹細胞の品質保持休眠培養, ポスター, 厩谷 翠, 辻 ゆきえ, 林寿人, 岩間武久, 堀川雅人, 木戸秋 悟, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内
12. ヒト間葉系幹細胞の培養力学場応答性に関する網羅的遺伝子発現解析, ポスター, 澤田 留美, 河野 健, 田中 和沙, 佐藤 陽治, 森山 幸祐, 江端 宏之, 佐々木 沙織, Kuboki T, 木戸秋 悟.日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内
13. 分散培養 iPS 細胞の増殖応答性に対するハイドロゲル表面へのラミニン修飾状態の本質的効果, ポスター, 水本 健太, 木戸秋 悟, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016/11/25, 国内
14. 力学的強度の制御を可能とする光架橋性コラーゲンゲルの開発, ポスター, 藤澤 貴宏, 木戸秋 悟, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016/11/25, 国内
15. Analysis of dynamics of mechano-signal input for stem cells cultured on the micro-elastically patterned hydrogels, 口頭, Ebata H, Hamano K, Kidoaki S. International polymer conference 2016, 2016/12/15, 国内
16. 細胞行動を操作するハイドロゲル微視的力学場設計, 口頭, 木戸秋 悟, アクティブマター研究会 2017, 2017/01/21, 国内
17. ゲル表面を這う細胞の変形と運動のダイナミクス, 口頭, 江端 宏之, 山本 安希, 木戸秋 悟, アクティブマター研究会 2017, 2017/01/20, 国内
18. Characterization of the frustrated differentiation of mesenchymal stem cells induced by normadic migration between stiff and soft region of gel matrix, ポスター, Kidoaki S, Ebata H, Sawada R, Moriyama K, Kuboki T, Kono K, Tanaka K, Sasaki S, Biophysical Society 61th Annual Meeting, 2017/02/14, 国外

19. 細胞を操るナノ・マイクロファイバーシステム, 口頭, 木戸秋 悟, 第 67 回医用高分子研究会, 2017/03/06, 国内
20. 間葉系幹細胞の運動及び分化ベクトルを操作する基材弾性率閾値条件の決定, 口頭, 森山 幸祐, Kuboki T, 木戸秋 悟, 化学工学会 第 82 年会, 2017/03/07, 国内
21. Designing Wrinkled Hydrogels for Cell Manipulation, Sasaki S, Ebata H, Ohzono T, Kidoaki S, Gel Symposium 2017, 2017/03/07, 国内
22. 多糖類ナノファイバー分散培地を用いた間葉系幹細胞の品質保持休眠培養, 口頭, 木戸秋 悟, 帛谷 翠, 辻 ゆきえ, 林寿人, 岩間武久, 堀川雅人, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/03/08, 国内
23. ラミネン固定化弾性率可変ハイドロゲル基材を用いた iPS 細胞のフィーダーフリー分散培養, ポスター, 水本 健太, 木戸秋 悟, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/03/09, 国内
24. ヒト間葉系幹細胞の分化フラストレート培養における網羅的遺伝子発現解析, ポスター, 澤田留美, 森山 幸祐, 河野 健, 田中 和沙, 佐藤 陽治, 江端 宏之, 佐々木 沙織, Thasaneeya Kuboki, 木戸秋 悟. 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/03/08, 国内
25. 幹細胞分化フラストレーションの検証経過について, 口頭, 木戸秋 悟, 第 2 回メカノバイオロジー学会, 2017/03/14, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

補助事業課題名： (日本語) 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
(英語)

補助事業担当者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長 澤田留美
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Health Sciences, Division of Cell-Based Therapeutic
Products, Chief, Rumi Sawada

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 間葉系幹細胞の幹細胞性の総合的評価および簡易評価系の確立
分担課題名： (英語) Comprehensive evaluation of stem cell characteristics of mesenchymal stem cells and
establishment of simplified evaluation system

補助事業分担者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長 澤田留美
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Health Sciences, Division of Cell-Based Therapeutic
Products, Chief, Rumi Sawada

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 九州大学・先導物質化学研究所・木戸秋悟 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Kono K, Hiruma H, Kobayashi S, Sato Y, Tanaka M, Sawada R, Niimi S. In vitro endothelialization test of biomaterials using immortalized endothelial cells. 2016, PLoS ONE 11(6): e0158289.
2. Hasebe-Takada N, Kono K, Yasuda S, Sawada R, Matsuyama A, Sato Y. Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. 2016, Regenerative Therapy 5, 49-54

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Association of line-1s expression with apobec3b genotypes in human mesenchymal stem cells. ポスター, Kono K, Sawada R, Sato Y. International Society for Stem Cell Research 2016, 2016/6/23, 国外.
2. ヒト間葉系幹細胞の培養力学場応答性に関する網羅的遺伝子発現解析, ポスター, 澤田留美, 河野 健, 田中和沙, 佐藤陽治, 森山幸祐, 江端宏之, 佐々木沙織, 久保木タッサニーヤ, 木戸秋悟, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内.
3. Characterization of the frustrated differentiation of mesenchymal stem cells induced by normadic migration. ポスター, Kidoaki S, Ebata H, Sawada R, Moriyama K, Kuboki T, Tsuji Y, Kono K, Tanaka K, Sasaki S. Biophysical Society 61ST Annual Meeting, 2017/2/13, 国外.
4. ヒト間葉系幹細胞の分化フラストレート培養における網羅的遺伝子発現解析, ポスター, 澤田留美, 森山幸祐, 河野 健, 田中和沙, 佐藤陽治, 江端宏之, 佐々木沙織, 久保木タッサニーヤ, 木戸秋悟, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願