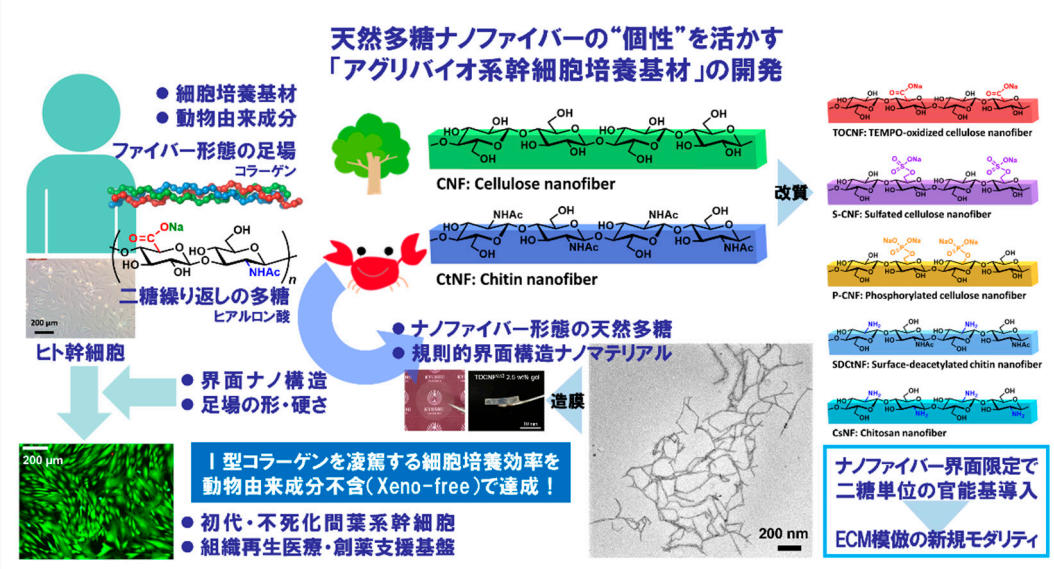
57　構造多糖を生体材料とする幹細胞制御培養基材の開発	北岡　卓也

【目的】豊富で再生可能なバイオマスである森林資源のセルロースや海産物のキチンは、ともに人工合成不可能なβ-1,4 グリコシド結合の伸びきり鎖結晶からなるナノファイバー形状を特徴とする構造多糖であり、結晶構造の精密性を保持したまま、界面物性や化学特性を制御できる。本研究では、天然多糖の個性である「しなやかな硬さを持つナノ繊維形状（物理的特性）」と「制御可能な糖鎖界面（化学的特性）」が、生体内で細胞を取り囲む細胞外マトリックス（Extracellular matrix：ECM）の特徴を備える点に着目し、天然多糖のナノ構造が鍵を握る生体 ECM の機能模倣のコンセプトで、再生医療・創薬支援基盤に有用な幹細胞制御培養基材の開発を試みた。

【方法】バイオイナートなセルロースナノファイバー（Cellulose nanofiber：CNF）やキチンナノファイバー（Chitin nanofiber：CtNF）に対して、表面カルボキシ化・表面硫酸エステル化・表面リン酸化・脱アセチル化などの化学修飾を施した。所定濃度の水分散液をガラス基材や細胞培養用ポリスチレン（Tissue culture polystyrene：TCPS）基材に塗布、あるいは Ca^{2+}イオン架橋によりゲル化し、各種細胞培養基材を作製した。ヒト骨髄由来不死化間葉系幹細胞（Human mesenchymal stem cell：hMSC; UE6E7T-11）や初代 hMSC を播種し、通常培地や血清フリー条件で培養した。生細胞数・生死細胞染色・遺伝子発現挙動解析・各種バイオアッセイを実施し、構造多糖を生体材料とするヒト幹細胞の培養挙動を検討した。

【結果】CNF や CtNF には細胞接着性がないにもかかわらず、適切な表面官能基化によって、線維芽細胞・筋芽細胞・肝細胞・骨芽細胞様細胞・ヒト間葉系幹細胞を培養可能なバイオマテリアルの開発に成功した。特に、無血清培地を用いて初代 hMSC を培養した場合、TCPS 基材や CNF 基材には hMSC は接着せず、細胞同士が凝集したスフェロイド形態を示したのに対して、CNF 表面にカルボキシ基や硫酸基を適量導入（0.5～1.5 mmol/g）することで、細胞接着・増殖性が著しく向上した。hMSC は多分化能を保持しており、軟骨細胞・脂肪細胞・骨芽細胞に分化できた。さらに、表面カルボキシ化 CNF のゲル化により表面弾性率を制御した基材では、hMSC は硬さに応じた遺伝子発現挙動の変化を示し、3～4 kPa の柔らかいゲル基材においては未分化維持に関与する *Nestin* 遺伝子の発現量が有意に上昇した。一方で、CNF 表面にランダムにカルボキシメチル基を導入してもこの効果は得られず、ECM 様の規則的なウロン酸繰り返し構造の重要性が示唆された。構造多糖が細胞機能に直接働きかける新規バイオアダプティブ基材としての医療応用に期待がもたれる。

構造多糖ナノファイバーを用いる幹細胞制御培養基材の開発戦略



57. 構造多糖を生体材料とする幹細胞制御培養基材の開発

北岡　卓也

九州大学 大学院農学研究院 環境農学部門

Key words：セルロースナノファイバー，構造多糖，ヒト幹細胞，ゼノフリー培養，モダリティ開拓

緒　言

再生医療は病気やケガなどで機能を失った組織や臓器を修復・再生する治療であり、健康・長寿社会の実現に向けた国民の期待は大きい。また、創薬支援基盤としても生体外での細胞・組織培養のニーズは大きい。近年、細胞の命運を決定するバイオインターフェースとしての足場材料の重要性が顕著に高まっている。実際、足場材料から細胞に伝わるシグナルが幹細胞の未分化維持や分化誘導に影響を及ぼす事象が次々と発見されており、細胞機能を制御できる足場の素材特性に科学的関心が集まっている。「生体内の細胞周辺環境を生体外でいかに再現・統御し、目的の細胞・組織の機能を引き出せるか？」は、生命科学と生体材料学との融合領域で取り組むべき最重要課題である。なかでも、生体内で細胞を取り囲む細胞外マトリックス（Extracellular matrix：ECM）の特徴を備える天然素材に注目が集まっている。

本研究では、豊富で再生可能なバイオマスである森林資源のセルロースや海産物のキチンが、ともに人工合成不可能なβ-1,4 グリコシド結合の伸びきり鎖結晶からなるナノファイバー形状を特徴とする構造多糖であり、結晶構造の精密性を保持したまま界面物性や化学特性を制御することで、生体 ECM を模倣できる点に着目した。特に、天然構造多糖の「しなやかな硬さを持つナノ繊維形状（物理的特性）」と「制御可能な糖鎖界面（化学的特性）」は唯一無二の個性であり、バイオイナートなセルロースナノファイバー（Cellulose nanofiber：CNF）やキチンナノファイバー（Chitin nanofiber：CtNF）に適切な表面改質を施すことで、線維芽細胞［1，2］・筋芽細胞［1］・肝細胞［1，3，4］・骨芽細胞様細胞［5］、ヒト間葉系幹細胞を培養可能なバイオマテリアルの開発に成功した。さらに、無血清培地を用いて、初代ヒト腸骨由来間葉系幹細胞（Human mesenchymal stem cell：hMSC）を培養した場合、細胞培養用ポリスチレン（Tissue culture polystyrene：TCPS）基材や CNF 基材には hMSC は接着せず、細胞同士が凝集したスフェロイド形態を示したのに対して、CNF 表面にカルボキシ基や硫酸基を適量導入（0.5～1.5 mmol/g）することで、細胞接着・増殖性が著しく向上することを発見した。hMSC は多分化能を保持しており、軟骨細胞・脂肪細胞・骨芽細胞に分化できた。また、表面カルボキシ化 CNF のゲル化により表面弾性率を制御した基材では、hMSC は硬さに応じて遺伝子発現挙動が変化し、3～4 kPa の柔らかいゲル基材において未分化維持に関与する *Nestin* 遺伝子の発現量が有意に上昇した。一方、CNF 表面にランダムにカルボキシメチル基を導入してもこの効果は得られず、ECM 様の規則的なウロン酸繰り返し構造の重要性が示唆された。天然構造多糖が細胞機能に直接働きかける新規バイオアダプティブ基材としての医療応用に期待がもたれる。

方　法

1. 多糖ナノファイバーおよび基材の調製

バイオイナートな CNF や CtNF に対して、表面カルボキシ化［1］、表面硫酸エステル化、表面リン酸化［5］、脱アセチル化［2］などの化学修飾を施した。植物由来 CNF はコットンやパルプから調製可能なセルロースのみからなる高純度・高結晶性多糖ナノファイバー（多糖 NF）であり、本来はバイオイナートで細胞非接着性素材である。また、甲殻類由来 ChNF はキチンから調製可能なβ-1,4 グリコシド結合した *N*-アセチルグルコサミンのみからなる天然多糖で生分解性があり、表面脱アセチル化により生理活性を調節可能である。これらに対して、TEMPO 酸化法

（多糖 NF 表面の C6 位の一級ヒドロキシ基をカルボキシ基に変換（カルボキシ基 : 0～1.7 mmol/g）: 二糖繰り返し単位でカルボキシ基を導入することで ECM のヒアルロン酸などのウロン酸構造を模倣）、深共晶溶媒硫酸エステル化法（コンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖を模倣（硫酸基 : 0～3.5 mmol/g）: C2/C6 位導入で幹細胞らしさやセクレトーム分泌にも関わるグリコサミノグリカン（GAG）の機能に関与）、尿素リン酸エステル化法（バイオミネラリゼーションの足場として機能（リン酸基 : 0～2.5 mmol/g）: C2/C6 位導入により分化誘導培地不使用で骨芽細胞様細胞の骨分化誘導に成功）を施した。さらに、マーセル化処理（結晶形・結晶化度を変えて表面ナノ物性を改変 : 表面弾性 50～150 MPa）、湿式対向衝突処理（約 200 MPa の高圧水流の対向衝突でナノ解繊 : 平均繊維長 100～800 nm）Z 多糖 NF 塗布処理（ガラス基材や TCPS 基材上に多糖 NF 水分散液を塗布 : 平均膜厚 1.5～2.5 μm）、イオン架橋処理（酸性官能基を介した Ca^{2+}のイオン架橋でゲル物性を制御 : 弾性率 3～60 kPa）を実施し、多糖 NF の形状や界面規則性を保持したまま、ECM 模倣細胞培養基材を調製した。

2. 細胞培養およびバイオアッセイ

ヒト骨髄由来不死化 hMSC（UE6E7T-11、JCRB Cell Bank）および初代ヒト腸骨骨髄由来 hMSCs（MSC-R37/MSC-R50、RIKEN Cell Bank）を、DMEM 培地（FBS : 2.5～10%）または無血清培地（MSH 培地, 島津ダイアグノスティクス）で培養した。多糖 NF 基材は、TEMPO 酸化 CNF（TOCNF）および表面硫酸化 CNF（S-CNF）を用いて、塗布基材および Ca^{2+}架橋ゲル基材を調製した。滅菌した多糖 NF 基材を 24-well プレートに設置し、各細胞を 12,000 cells/well で播種した。コントロール基材として、TCPS 基材と表面未修飾 CNF 基材およびラット尾由来 I 型コラーゲン（COL 1）を使用した。37℃、5% CO_2条件下で 24～72 h 培養後、細胞数測定、生死細胞染色による蛍光観察、RT-qPCR による遺伝子発現挙動解析を実施した。常法により軟骨細胞・脂肪細胞・骨芽細胞に分化させ、アルシアンブルー・オイルレッド O・アリザリンレッド S による染色で確認した。統計処理は、一元配置分散分析 one-way ANOVA および多重比較法 Tukey–Kramer 検定を実施した。なお、TOCNF 単独や表面脱アセチル化 CtNF との組み合わせによるマウス線維芽細胞 NIH/3T3 培養［1, 2］やマウス筋芽細胞 C2C12 培養［1］、多糖 NF ゲル基材や多孔質基材によるヒト肝がん細胞 HepG2 培養［1, 3, 4］、表面リン酸化 CNF（P-CNF）によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 培養［5］の研究成果ついては既報を参照されたい。

結果および考察

1. 多糖 NF および多糖 NF 基材のキャラクタリゼーション

構造多糖 NF は、生体 ECM 様の細長い繊維（線維）形態の結晶性多糖であり、表面を規則的に官能基導入できる特徴を持つ。図 1 に、使用した 4 種類の CNF の AFM 像と TEM 像を示す。hMSC の制御培養には、TOCNF0.17（カルボキシ基 : 1.45 mmol/g ; 繊維長 0.17±0.09 μm）、TOCNF0.53（1.47 mmol/g ; 0.53±0.22 μm）、S-CNF0.64（硫酸基 : 0.64 mmol/g; 0.61±0.24 μm）、S-CNF2.58（2.58 mmol/g; 0.19±0.06 μm）を用いた。表面修飾 CNF は高いアスペクト比を持つナノファイバーであり、平均幅は 1.8～2.8 nm であった。X 線結晶構造解析より、セルロース I 型の結晶構造と高い結晶化度（59～71%）を確認したが、S-CNF2.58 の結晶化度は 49%と低く、CNF 内部への過剰な官能基導入が示唆された（データ未掲載）。ガラス基材への塗布処理により、平均膜厚 1.5～2.5 μm のきわめて平滑な多糖 NF 系細胞培養基材が得られた。

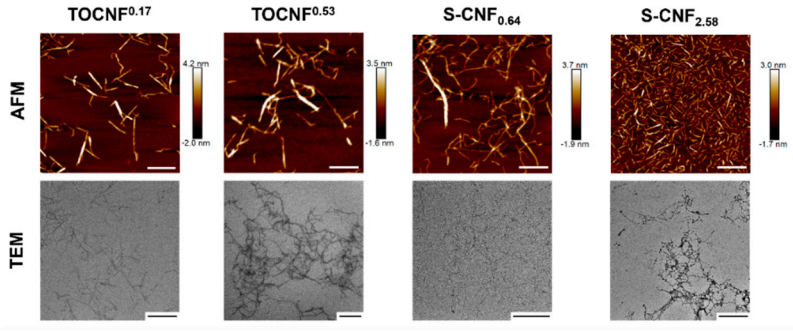


図 1. 構造多糖 NF の原子間力顕微鏡像（AFM 像）および透過型電子顕微鏡像（TEM 像）
AFM 像のスケールバー：300 nm、TEM 像のスケールバー：500 nm。

2. 多糖 NF 基材上での不死化・初代ヒト間葉系幹細胞のゼノフリー培養

表面カルボキシ化 CNF（TOCNF0.53, TOCNF0.17）および表面硫酸化 CNF（S-CNF0.64, S-CNF2.58）の 4 種類を組み合わせて、通常の DMEM 培地（FBS：10%）で培養したところ、不死化 hMSC（UE6E7T-11）の良好な接着と増殖が確認された。そこで、これらの組み合わせについて低血清条件（FBS：2.5%）で詳細に検討した。表面修飾 CNF の官能基含量は、線維芽細胞［1］や骨芽細胞様細胞［5］の増殖挙動と密接な関係があることが判明しているが、hMSC については検討されていない。再生医療への応用を志向して、培地中の接着タンパク質や成長因子の濃度レベルが低い条件下で検討したところ、硫酸基量の少ない S-CNF0.64 が硫酸基量の多い S-CNF2.58 と比較して細胞増殖を著しく促進した（図 2）。細胞接着促進効果の高い TOCNF0.53 と S-CNF0.64 との組み合わせは、通常の TCPS での細胞培養と比較しても同程度であった。対照的に S-CNF2.58 足場は TOCNF0.53 と組み合わせても、hMSC の成長を促進できなかった。S-CNF2.58 の短い繊維長と低い結晶化度の影響が考えられ、hMSC の成長に最適な繊維形態や官能基量の存在が示唆された。一方、未修飾 CNF 基材には有意な細胞接着が見られず、スフェロイドの形成と死細胞が多数観察された（データ未掲載）。生体不活性な CNF を適切な表面官能基導入により、生体適合性を付与する本手法の有用性が改めて示された。

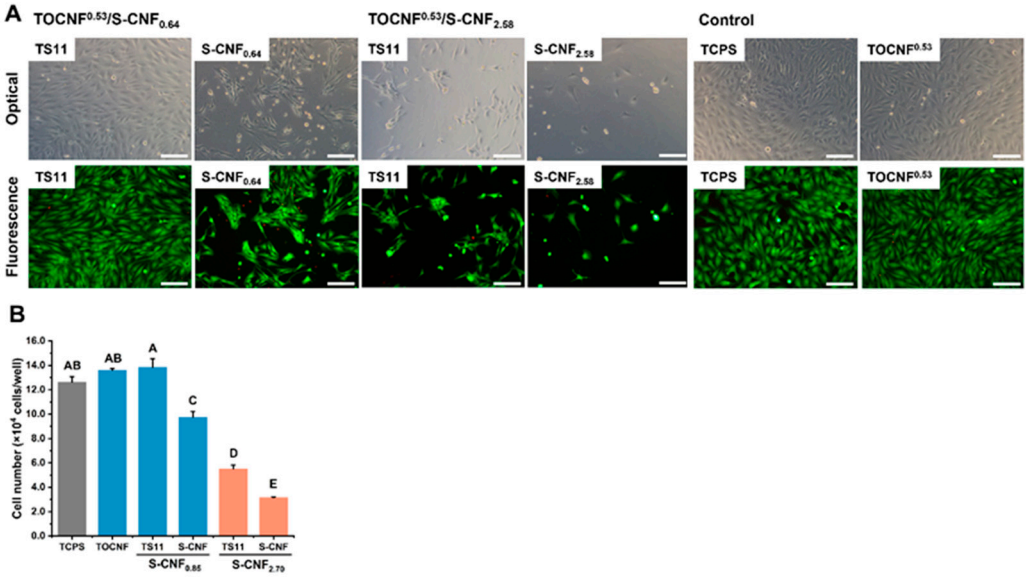


図 2. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 UE6E7T-11 の光学像・蛍光像および生細胞数
A) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 UE6E7T-11 の光学像・蛍光像。生細胞：緑、死細胞：赤。スケールバー：200 μm。
B) 2.5% FBS 含有培地、72 h 培養での生細胞数。Tukey-Kramer 多重比較検定：Mean ±SD、n=3、p<0.05。

幹細胞治療の臨床応用で使用する初代培養 hMSCs は、遺伝子改変した不死化 hMSCs とは培養挙動が大きく異なることが多い。従って、ゼノフリー（Xeno-free：xenogeneic component free）培養研究では、初代 hMSCs と不死化 hMSCs との違いを検討する必要がある。本研究ではコラーゲンなどの動物由来成分を一切使用せず、完全無血清条件下で植物由来表面修飾 CNF 足場上で初代 hMSCs を培養した。その結果、ヒト腸骨由来初代 hMSC は、ラット尾由来の I 型コラーゲン基質を用いた従来型の培養基材と同程度に、表面修飾 CNF 足場に接着・増殖した（図 3）。一方、未修飾 CNF 足場にはまったく接着しなかった。さらに重要なことに、不死化細胞とは異なり細胞培養用 TCPS にも接着できず、細胞が凝集してスフェロイドを形成した。不死化 hMSC は TCPS 基材での培養に馴化しているが、初代 hMSC では接着不良を起こすことが知られている。よって、単純に培地中の接着因子を吸着可能な疎水的表面を提供するだけでは、無血清条件下で hMSC を培養することはできない。そもそも多糖 NF 基材は TCPS よりも親水的な表面を有しており、細胞接着メカニズムの違いを示唆している。無血清条件下でも細胞接着可能な COL 1 基材では、RGD モチーフ（Arg-Gly-Asp：アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）の関与が示唆されるが、当然のことながら表面修飾 CNF には RGD 配列はなく、効果的な細胞接着には高分子ではなく結晶性のナノファイバー構造が必要であることから、表面修飾 CNF のユニークなナノ構造が完全ゼノフリー培養系を実現するための鍵であると推察される。もう一つ重要な点は、CNF の表面化学が細胞の挙動に及ぼす影響である。多糖 NF 基材上で培養したヒト不死化 hMSC（UE6E7T-11）に対し、軟骨細胞・骨芽細胞・脂肪細胞への 3 系統への分化誘導を実施したところ、それぞれの細胞へ分化した（図 3）。生体内に豊富に存在する硫酸化 GAG は、硫酸基を持つウロン酸とアミノ糖の二糖繰り返しからなる。従って、ウロン酸類似体の TOCNF や GAG 模倣体の S-CNF の有する二糖繰り返し構造が、無血清培地における細胞の挙動に大きな影響を与えると推察される。動物由来成分を一切含まない植物由来の表面修飾 CNF を、無血清条件下での初代ヒト幹細胞の培養に用いる本研究の戦略は、初代ヒト幹細胞の医療応用に有用であると期待される。

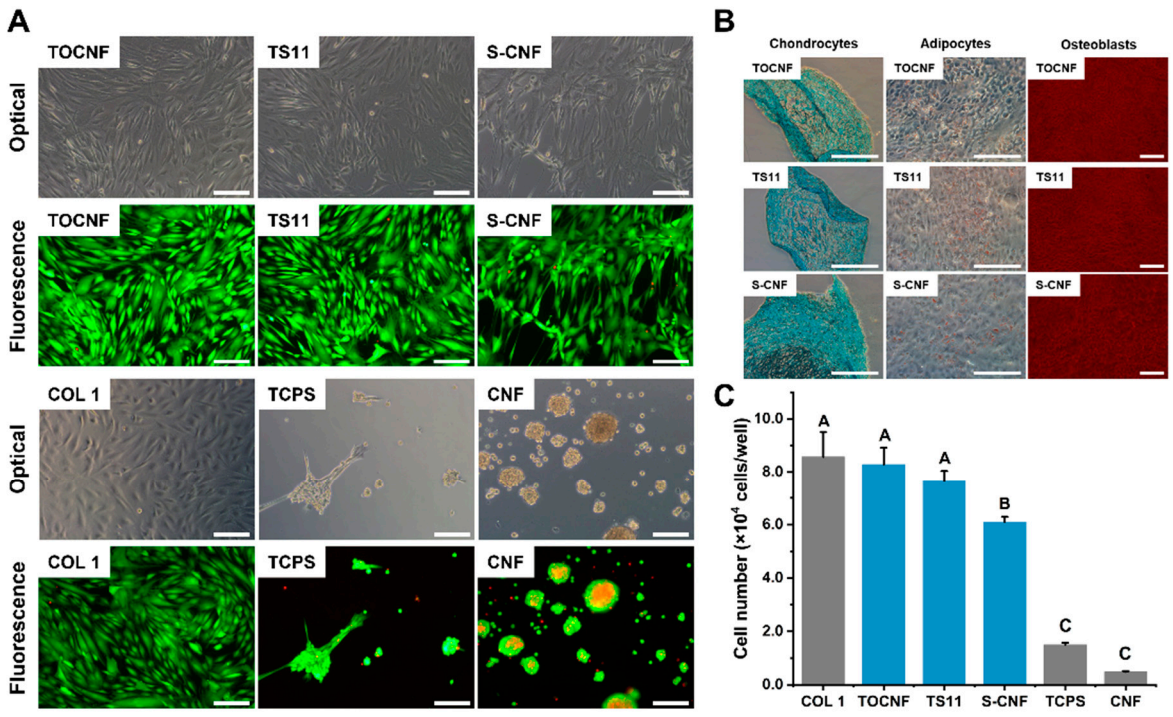


図 3. ヒト初代 hMSC の光学像・蛍光像および UE6E7T-11 の分化誘導、生細胞数

A) ヒト初代 hMSC の光学像・蛍光像。生細胞：緑、死細胞：赤。スケールバー：200 μm。

B) UE6E7T-11 の分化誘導後の光学像・蛍光像。スケールバー：200 μm。

C) 無血清培地、72 h 培養での生細胞数。Tukey-Kramer 多重比較検定：Mean±SD、n=3、p<0.05。

3. 硬さの異なる多糖 NF ゲル基材上でのヒト間葉系幹細胞の培養挙動

近年、細胞培養基材の開発において、細胞と基材との界面で生じる力学的な刺激・作用が細胞や組織の活動に与える影響に注目が集まっており、メカノバイオロジーという研究領域が脚光を浴びている。表面改質多糖 NF はイオン架橋により容易にゲル化することができ、硬さを制御することも可能である。そこで、長さの異なる表面カルボキシ化 CNF（TOCNF0.53、TOCNF0.17）を用いて硬さの異なるゲルを調製し、hMSC 培養を試みた。作製したゲルは全て無色透明であり、培地に置換した後にスパーテルで持ち上げても崩壊しない十分な硬さを有していた。ゲルの硬さをクリープメーターで測定したところ、圧縮弾性率は繊維長と固形分濃度に依存していた（図 4）。同じ繊維長のゲルを比較すると、繊維の固形分濃度が高いほど弾性率も高くなり、同じ固形分濃度で異なる繊維長のゲルを比較すると、繊維長が長い TOCNF0.53 ゲルの方が高い弾性率を示した。各ゲルの弾性率は、TOCNF0.53 ゲルでは 3～50 kPa、TOCNF0.17 ゲルでは 3～45 kPa の値を示し、骨髄内の血管性ニッチの弾性率（3～4 kPa）から骨内膜ニッチの弾性率（35～40 kPa）までを満たす、生体 ECM の硬さを十分に模倣できる弾性率となった。hMSC をゲル上で 72 h 培養したところ、死細胞はほとんど観察されず、TCPS と同様に接着・伸展・増殖した（図 4）。一方、対照のカルボキシメチル化 CNF（CM-CNF）ゲル基材には細胞が接着できなかった。よって、結晶表面の C6 位にカルボキシ基が規則的に導入されたウロン酸構造の重要性が改めて示唆された。次に、培養 72 h 後の細胞から Total RNA を抽出して、幹細胞の未分化維持に関与している *Nestin* の発現量を定量したところ、3～4 kPa の柔らかいゲル（soft gel）と 23～26 kPa の中程度の硬さのゲル（middle gel）上の細胞では、硬い TCPS と比較して有意に高発現した。一方、45～50 kPa の硬いゲル（stiff gel）上の細胞では TCPS と同等の発現量になった（図 4）。よって、多糖ゲル基材の硬さが幹細胞に何かしらの力学的刺激を与えることで、細胞挙動が左右される可能性が示唆された。天然構造多糖 NF に秘められた ECM 様機能は、新規医療・創薬モダリティとしての構造多糖 NF の有用性を示しており、今後のさらなる研究展開に期待が持たれる。

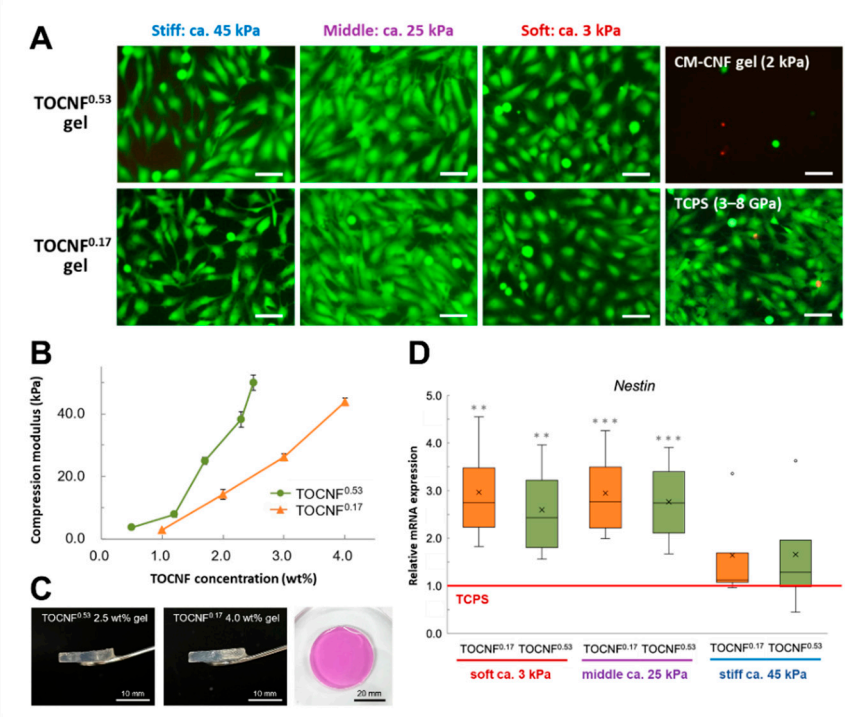


図 4. 硬さの異なる多糖ゲル基材上での hMSC 培養挙動

A) 多糖ゲル基材上で 72 h 培養した hMSC の生死染色蛍光像。生細胞：緑、死細胞：赤。スケールバー：100 μm。

B) TOCNF の濃度とゲルの圧縮強度。

C) ゲルの外観（培地交換後は赤く染まっている）。

D) 硬さの異なる多糖ゲル上の hMSC の *Nestin* 発現挙動（one-way ANOVA：Mean±SD；n=4；**p<0.01、***p<0.001 vs TCPS）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院農学研究院生物資源化学研究室助教の畠山真由美博士である。

文　献

1） Hatakeyama M, Kitaoka T. Surface-carboxylated nanocellulose-based bioadaptive scaffolds for cell culture. Cellulose. 2022 Mar;29(5):2869-2883. Epub 2021 Aug 25. PMID: N/A DOI: 10.1007/s10570-021-04154-5

2） Noda T, Hatakeyama M, Kitaoka T. Combination of polysaccharide nanofibers derived from cellulose and chitin promotes the adhesion, migration and proliferation of mouse fibroblast cells. Nanomaterials. 2022 Jan 26;12(3):402. Epub 2022 Jan 26. PMID: 35159746 DOI 10.3390/nano12030402

3） Zhang Z, Li Q, Hatakeyama M, Kitaoka T. Injectable cell-laden hydrogels fabricated with cellulose and chitosan nanofibers for bioprinted liver tissues. Biomedical Materials. 2023 May 26;18(4):045018. Epub 2023 May 26. PMID: 37168003 DOI: 10.1088/1748-605X/acd49a.

4） Li Q, Hatakeyama M, Kitaoka T. Bioadaptive porous 3D scaffolds comprising cellulose and chitosan nanofibers constructed by Pickering emulsion templating. Advanced Functional Materials. 2022 May 25;32(22): 2200249. Epub 2022 Feb 24. PMID: N/A DOI:10.1002/adfm.202200249

5） Liu Q, Li Q, Hatakeyama M, Kitaoka T. Proliferation and differential regulation of osteoblasts cultured on surface-phosphorylated cellulose nanofiber scaffolds. International Journal of Biological Macromolecules. 2023 Dec 31;253(3):126842. Epub 2023 Sep 11. PMID: 37703974 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126842