

## 共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：独立行政法人物質・材料研究機構  
生体材料センター

職名：グループリーダー

氏名：小林 尚俊

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

### 記

1. 研究課題：3次元ナノファイバー足場内における幹細胞分化に関する研究
2. 再生医科学研究所共同研究者：田畑泰彦
3. 研究期間：短期研究課題 ・ 長期研究課題  
(平成22年4月1日～平成23年3月31日)

#### 4. 研究経過及び研究成果：

ナノファイバーの3次元構造体は、既に動物実験レベルで組織再生用足場として優れた機能を有する可能性が示されている。本研究では、ナノファイバー構造体と組織幹細胞との相互作用を詳細に検討することでナノファイバーの組織再生足場としての機能発現のメカニズムを検討することを目的として、ナノファイバーからなる各種モデル構造体の作成を行い、ナノファイバー構造体とMSC細胞との相互作用に関して系統的な検討を行う。その手始めとして今年度は、ポリグリコール酸（PGA）とコラーゲンからなるナノコンポジットファイバーに関して、そのファイバー径と構造が幹細胞の接着と増殖に与える影響について評価した。

培養基板の作製

##### 1. 材 料

ファイバー回収用基板としてφ15mm 円形カバーガラス（Matsunami）を使用した。シランカップリング剤としてチッソ株式会社製サイラエース S810 を用いた。末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコールとして日油株式会社製 SUNBRIGHT

ME-050MA を用いた。ポリグリコール酸 (PGA) は Sigma-Ardrich 社から購入した。I 型コラーゲンとして日本ハム社製ブタ皮コラーゲンを使用した。エレクトロスピンニング用溶媒として 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP、Wako) を用いた。ポリウレタンシールとして 3M 社製 Tegaderm film を用いた。

## 2. ポリエチレングリコール化ガラス基板の作製

UV-O<sub>3</sub> 洗浄処理したカバーガラスを 0.5% シランカップリング剤溶液で 2 分間処理した後、0.005M マレイミド末端ポリエチレングリコール (PEG) 溶液に 30 分間浸漬した。風乾後、超純水で水洗し、実験に供した。

## 3. エレクトロスピンニング

### 3.1 紡糸溶液

PGA/HFIP 溶液 (100 mg/ml) とコラーゲン/HFIP 溶液 (100 mg/ml) を体積比 6 対 4 で混合して紡糸溶液とした。

### 3.2 紡糸

#### 3.2.1 不織布

シリンジポンプ (kd science) を用いて、紡糸溶液を 25G ステンレスニードルから吐出速度 0.2ml/h で吐出した。高電圧印加装置 (日本スタビライザ) をステンレスニードルに接続し、接地したアルミホイル平板をコレクターとした。コレクター上に PEG 化カバーガラスを設置し紡糸することで不織布試料を回収した。印加電圧、紡糸距離および紡糸時間は 15 kV、130 mm、3 時間として不織布試料を作製した。

#### 3.2.2 配向不織布

印加電圧、吐出速度、紡糸距離、紡糸時間をそれぞれ 15 kV、0.2ml/h、130 mm、3 時間とした。ステンレスニードルは 25G を使用した。回転ドラムコレクター (φ100 mm、MECC) に PEG 化カバーガラスを設置し、回転速度 3000 rpm させて配向不織布試料を作製した。

#### 3.2.3 ナノファイバーモノフィラメント

印加電圧、吐出速度、紡糸距離、紡糸時間をそれぞれ 15 kV、0.2ml/h、130 mm、1 秒間とした。ステンレスニードルは 25G を使用した。回転ディスクコレクター (φ200 mm、MECC) に PEG 化カバーガラスを設置し、回転速度 3000 rpm させて配向不織布試料を作製した。

#### 3.2.4 サブマイクロファイバーモノフィラメント

印加電圧、吐出速度、紡糸距離、紡糸時間をそれぞれ 15 kV、0.2ml/h、50 mm、5 秒間とした。ステンレスニードルは 22G を使用した。回転ドラムコレクター (φ100 mm、MECC) に PEG 化カバーガラスを設置し、回転速度 3000 rpm

させて配向不織布試料を作製した。

### 3.3 アニール処理およびポリウレタンシール貼付け

ファイバーを回収した PEG 化カバーガラスを真空オーブンに入れ、110°Cで 24 時間のアニール処理をした。打抜きポンチを用いて Tegaderm film を打抜き、 $\phi 14$  mm の円形ポリウレタンシールを作製した。 $\phi 2$  mm の生検トレパンを用いて円形シール内に等間隔に観察用窓を 7 か所作り、アニール処理したカバーガラスに貼りつけ、細胞培養実験中に PEG 化ガラス表面からのファイバーの剥離、脱落を防止した(図 1)。

### 4. 走査型電子顕微鏡観察

エレクトロスピンニングによって紡糸された繊維の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察像を図 2a-d に示す。また、SEM 像をもとに画像解析ソフトを用いて計測した各繊維径を表 1 に示す。不織布試料は平均直径 118 nm の繊維がランダムに絡み合っ

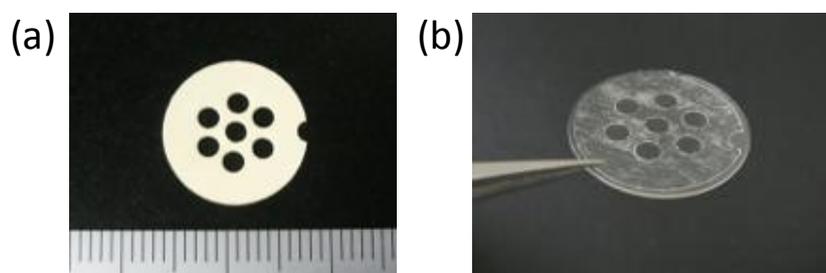


図 1 (a)剥離防止用ポリウレタンシール (b)ポリウレタンシールを張り付けた培養用ガラス基板

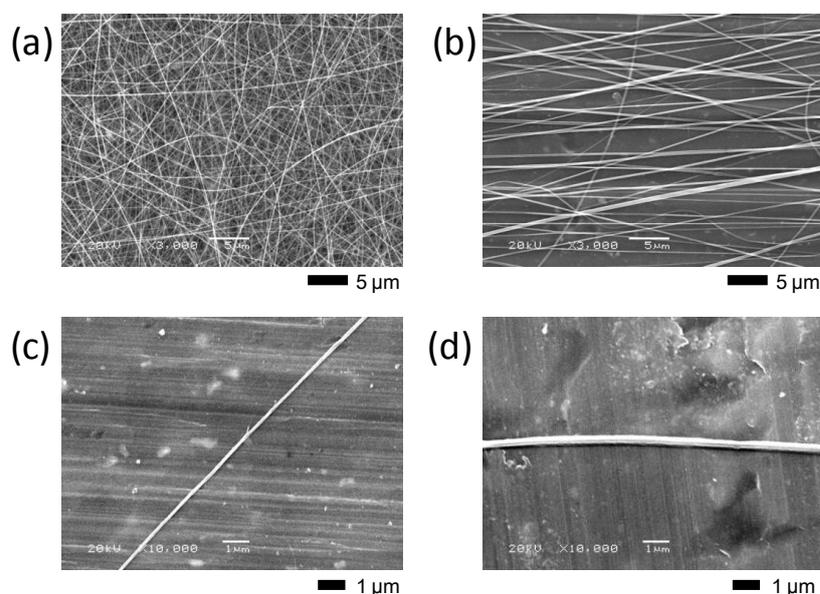


図 2 エレクトロスピンニング法により作製された PGA-コラーゲン繊維の走査型顕微鏡像(a) 不織布 (b) 配向不織布 (c) ナノファイバーモノフィラメント (d) サブマイクロファイバーモノフィラメント

た状態であった。配向不織布試料は平均直径 209 nm の繊維が比較的一方向へ配向しており、その繊維間隔は一つの細胞が複数の繊維へ亘って接着できる程度に狭いものであった。ナノファイバーモノフィラメント試料は平均直径 125 nm の直線状の単繊維が得られていた。サブマイクロファイバーモノフィラメント試料は平均直径 324 nm の直線状の単繊維が得られていた。

表 1 各エレクトロスパンファイバーの平均直径

	Non-woven	Non-woven aligned	Single nanofiber	Single sub-microfiber
Diameter, nm	118	209	125	324

## 5. 細胞培養

幹細胞は理研セルバンクより購入したヒト間葉系幹細胞株 (UBET-6) を使用した。幹細胞の培養には POWEREDBY10 培地(メド城取、東京)を用いた。各サンプル上に作成した直径 2 mm の 7 個の小穴全体に対し、幹細胞 1000 個を含む細胞懸濁液をサンプル上に滴下した。播種後 4 時間経過した後、接着しなかった余剰の細胞を除去するために、サンプルを培地で 1 回洗浄し、その後、必要十分量の培地内でサンプルを 72 時間、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。ナノファイバーモノフィラメントおよびサブマイクロファイバーモノフィラメント上に接着した細胞は、培養終了時である 72 時間後まで、細胞培養チャンバーを付属した位相差顕微鏡にて継時的な細胞の動態も観察した。培養が終了したサンプルは PBS にて 3 回洗浄後、メタノールおよび 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて固定した。

## 6. 染色を用いたファイバー上での細胞挙動同定

メタノール固定したサンプルは、細胞増殖性を観察するために、抗 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)マウスモノクローナル抗体を一次抗体として用い免疫染色を行った。一次抗体は 200 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。二次抗体には AlexaFluor546 goat-anti mouse IgG を 200 倍に希釈したものを室温で 30 分間反応させた。インビトロジェン社の Prolong gold antifade with DAPI を用いて、細胞の核を青色、上記の抗 PCNA 抗体に結合した細胞は赤色に発色させた。

パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて固定したサンプルはファイバー上での細胞のアポトーシスを調査するためにロシュ社の In situ cell death detection kit, Fluorescein を用いて染色した。PCNA 染色と同様に Prolong gold antifade with DAPI を用いて行い、細胞の核を青色、アポトーシスを起こしている細胞の核を緑色に発色させた。

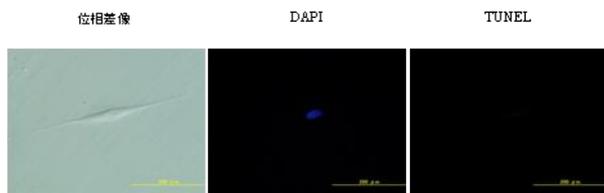
上記の染色を施したサンプルは蛍光顕微鏡を用いて、それぞれのサンプル上での細胞の増殖・アポトーシスの状態を観察した。

## 5. 蛍光顕微鏡観察

ナノファイバーモノフィラメント上に接着した細胞はファイバーに沿って細胞が通常の細胞培養ディッシュ上では認めることのできないほど高度に伸長していた。72時間後の細胞ではナノファイバーモノフィラメント上に接着したほとんどの細胞において PCNA 陽性を認めたが、アポトーシスを生じている細胞は認められなかった。また、連続観察による結果では、継時的に、ファイバーに接着した細胞の片端が破断された後に、再び同部位に接着していく挙動を繰り返しており、72時間までの継時観察内で細胞分裂像は認められなかった。

サブマイクロファイバーモノフィラメント上に接着した細胞でもナノファイバーモノフィラメントに接着した細胞と同様に、細胞はファイバーに沿って高度に伸長していた。また、サブマイクロファイバー上で認められた細胞も多数 PCNA 陽性を呈していたが、その数はナノファイバーに比べて少なかった。サブマイクロファイバー上でもアポトーシスを生じている細胞は認められなかった。連続観察では、継時的に細胞のファイバー接着部の両端が破断し、ファイバー上において細胞は球形の形状をとるが、分裂には至らず再びファイバー上に伸展する行動を繰り返す像が認められた。

不織布に接着した細胞は、それぞれの細胞が紡錘形および卵円形に伸展していた。



サブマイクロファイバーモノフィラメント上に接着した細胞の染色結果

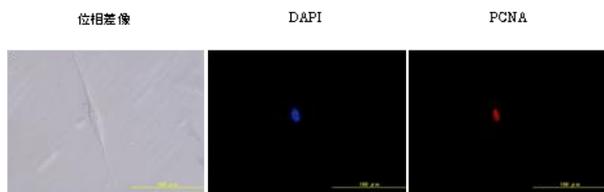
ナノファイバーモノフィラメント



マイクロファイバーモノフィラメント



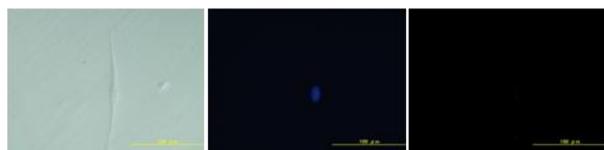
モノフィラメントファイバー上での細胞挙動



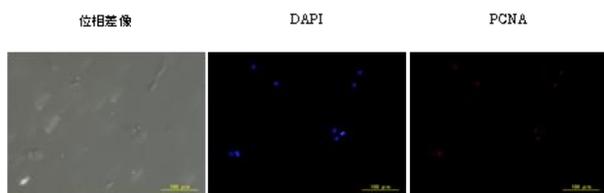
位相差像

DAPI

TUNEL



ナノファイバーモノフィラメント上に接着した細胞の染色結果



不織布上に接着した細胞のPCNA染色結果

PCNA 染色はそれぞれの細胞で陽性から陰性と異なる態度を示した。不織布上でもアポトーシスを生じている細胞はほとんど認められなかった。

配向不織布上に接着した細胞は、多数の線維にまたがり接着し、モノフィラメント上に接着した細胞よりも幅広な紡錘形を呈していた。

配向不織布上でも PCNA 染色態度は不織布と同様に細胞毎に異なる染色態度を示していた。また、アポトーシスを生じている細胞はほとんど認められなかった。

以上の結果をまとめると、今回の結果ではファイバーモノフィラメント上に接着した細胞は不織布状の細胞よりも高率に抗 PCNA 抗体に対して陽性を示し、モノフィラメント上に接着する細胞では、より細いファイバー上で抗 PCNA 抗体に対する陽性率が高かった。また、モノフィラメント上の細胞においても不織布状の細胞においても 72 時間の培養期間内にアポトーシスを生じることにはなかった。

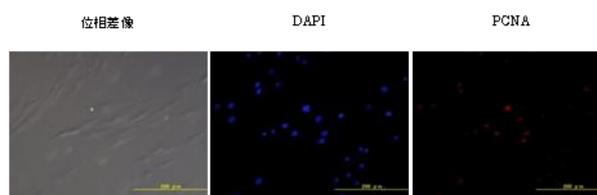
モノフィラメント上の MSC は、サブミクロンからトゥルーナノオーダーのファイバー径上において、分裂準備のような挙動をとるが、本観察時間の範囲内では分裂することなく再びファイバー上へ伸長していた。染色の結果と合わせると、分裂準備に入った後伸長した細胞はアポトーシスを生じることなくそのまま分裂準備期を維持していることが示唆された。

今後は、ナノファイバー高次構造体の構造が間葉系幹細胞の分化にどの程度影響を及ぼすのかという点に関して引き続き研究を展開するために、各種紡糸法を駆使して、生体適合性ナノファイバーを合成するとともに、これまでに構築した 3 次元構造化の技術を用いて生体構造を模倣したナノファイバーベースの幹細胞足場としての 3D 空間を創成する研究に展開する予定である。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

第 60 回高分子討論会で発表予定。



配向不織布状に接着した細胞のPCNA染色結果