

## 異方性を有するナノファイバーによる高密度培養と バイオハイブリッド材料への応用

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

概 要	
	造血幹細胞(HSC)の増幅を目的に、HSCを支持する間葉系幹細胞(MSC)に着目し、エレクトロスピンング法を用いて作製したナノファイバー基材により造血幹細胞のニッチを構築することを試みた。生体内の骨髄造血環境を模倣した高い配向性を有するナノファイバーから成る培養基材上でMSCを培養し、これを積層化し、ここでHSCとMSCを共培養することで三次元培養環境の構築を目指し、HSCの効率的な増幅を検討した。その結果、通常のディッシュでの共培養と比較して、3層に積層したファイバー基材上では約2倍の細胞密度での培養が可能となった。また、CFUアッセイにより、通常のディッシュでの共培養と比較して、積層化ファイバー基材上で共培養を行ったHSCのほうが多分化能を多くの細胞が有していることを見出した。
関連キーワード	ナノファイバー、エレクトロスピンング、造血幹細胞、間葉系幹細胞、三次元培養

### 研究の背景および目的

本課題では、エレクトロスピンング法で作製したナノファイバー上に、間葉系幹細胞を多層に重層したバイオハイブリッド材料を構築することで、間葉系幹細胞の高密度三次元培養を可能とする材料を開発する。ナノファイバー基材に細胞外マトリクス類似の幾何学的異方性をもたせることで、細胞分化を促進させる効果をもたらされると期待される。この材料が実現されれば、従来型のハイドロゲル等では構築するのが困難だった配向性を有し、厚みのある組織（骨髄様組織、血管組織、真皮組織等）を、効率よく作製することができる。これにより、安全、安価、高効率な幹細胞の培養技術が確立し、有用物産生に向けた培養システムの実現につながり、幹細胞を用いた再生医療に大きく貢献すると期待される。本稿では、とくに造血幹細胞(HSC)に着目し、実施した結果について報告する。

白血病などの難治性の血液疾患では、HSC移植が普及しつつある。HSC移植とは、患者の血液細胞をドナー由来のものに置き換える治療法である。HSCは血液細胞への多分化能を有しており、骨髄や臍帯血中に存在する。骨髄由来HSCはこれまでHSC移植で広く使用されてきたが、骨髄由来のHSCは患者に適合するドナーが少なく、マッ

グの面で課題がある。また、ドナーからの採取にリスクがある点も課題である。そこで、近年、臍帯血由来のHSCが注目されている。臍帯血由来HSC移植では白血球抗原型を骨髄移植の場合ほど厳密に合わさずとも拒絶反応が起きにくいことが知られており、移植に用いるメリットは大きい。しかし、一度に採取される臍帯血の量は限られており、得られる臍帯血由来HSCの数が少ない点が課題である。そのため、臍帯血由来HSCを未成熟のまま効率よく増幅培養技術が求められている。これまでもin vitroでのHSCの培養法としては、間葉系幹細胞(MSC)を支持細胞とする共培養系が報告されているが、平面上での培養のため、培養効率は低い。

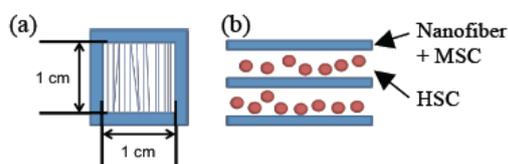
そこで本研究では、ナノファイバー基材を用いて作製したハイブリッド材料で、HSCの高効率培養を試みた。まず、HSCを支持するMSCに着目し、ナノファイバーを使ってMSC分化方向を人工材料の幾何学により制御し、造血幹細胞のニッチを構築することを試みた。次に、生体内の骨髄造血環境を模倣したナノファイバーから成る培養基材を、エレクトロスピンング法を用いて作製し、積層化することで、HSCとMSCを高密度で培養し、HSCの効率的な増幅を検討した。

### 研究の内容および成果

【実験方法】<ナノファイバー基材の作製>エレクトロスピンング法を用いて12.5%ポリウレタン溶液からナノファイバーをアクリル基板上に作製した。作製したナノファイバー基材の配向性はコ

レクタ回転速度を変えることで制御した。  
<細胞培養>ナノファイバー基材に酸素プラズマ処理を施したのち、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を播種し、1週間培養した。これを3枚積層

し、各層間にヒト臍帯血由来 CD34+細胞を播種し共培養を行った(Fig. 1)。共培養開始から1週間後に細胞をすべて回収し、HSCの増殖と分化をフローサイトメトリーで、HSCの多分化能をコロニーアッセイにより評価した。

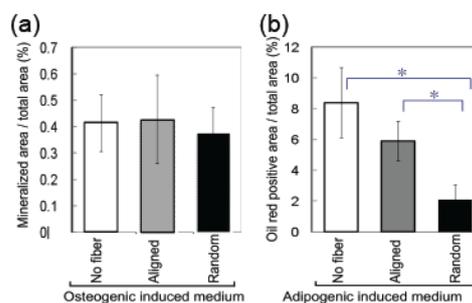


**Fig.1** Schematic illustration of nanofiber scaffolds. (a) a single layer of nanofiber scaffold. (b) Side view of coculture by using layered nanofiber scaffolds.

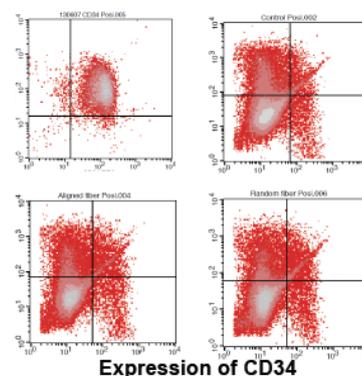
### 【結果および考察】

ポリウレタンを用いて高い配向性を有するナノファイバー足場材料を作成できた。三次元環境でのHSCとMSCの共培養の結果について示す。Controlとしてこれまでの共培養方法であるdish上にMSCを同様に培養し、その後、HSCを播種し共培養を行った。増殖した細胞のFACS解析結果をFig. 3に示す。通常のディッシュでの共培養での細胞密度に比して、3層に積層した配向ファイバー上では、2倍以上の高密度で培養できた。今回の実験では積層数が3枚であり、MSCに挟まれたHSCの培養場所は2か所あった。したがって、各層間では平面培養以上の効率で培養されたことを示す。得られた細胞集団は未分化なHSCであるCD34+ CD38-細胞分画を豊富に含んでいることから、ファイバーを用いることで造血幹細胞を効率的かつ高密度に増幅できたとと言える。コロニーアッセイより平面培養上よりファイバー基材上で共培養を行ったHSCのほうが多分化能を多くの細胞が増幅されたことが分かった。

現在臨床で行われているHSC移植には少なくと



**Fig.2** Quantitative analysis of (a) the mineralization after 14d-osteinduction and (b) the oil deposition after 14d-adipoinduction on aligned (gray) or random (filled) nanofibers or without fibers (open). (Mean  $\pm$  SD; n=5; \*, p<0.05)



**Fig.3** FACS analysis of expanded HSC. Pre-culture (a). HSC cocultured with MSC for 1 week on dish (b), aligned fiber scaffold (c), random fiber scaffold (d).

も  $1.7 \times 10^7$  cells/kg の CD34+細胞が必要であると言われている。この細胞数を効率よく増幅するため、さらに、ファイバー基材を多くの枚数で積層化させ、効率化をすすめる必要がある。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

J.C.Chang, S.Fujita, H.Tonami, K.Kato, H.Iwata, S.H.Hsu: Cell orientation and regulation of cell-cell communication in human mesenchymal stem cells on different patterns of electrospun fibers, *Biomed. Mat.*, 8, 055002, 2013.

藤田 聡: 細胞を操る~再生医療を目指したテクノロジー, *技術士*, 565, 50-51, 2014.

藤田 聡: 再生医療に向けた材料設計-ナノファイバーの細胞生物学-, *WEB Journal*, 141, 6-9, 2013.

### 「学会発表」

藤田 聡: ナノファイバーの幾何構造にもとづいた幹細胞の分化制御, 日本動物細胞工学会 2013年度大会, 2013.7.(招待)

S.Fujita: From 2D to 3D - Nanofibers as a model of extracellular matrix, Taiwan-Japan Joint

Workshop on Biomedicine & Biomaterials for Short-Term Visit Program, 2013.8. (invited)

清水 遥絵, 末 信一郎, 藤田 聡: 造血幹細胞の高密度共培養のための積層化ナノファイバースキャフォールドの構築, 第 62 回高分子討論会, 2013.9.

清水 遥絵, 末 信一郎, 藤田 聡: 多層化ナノファイバーシート上での造血幹細胞の高密度培養, 第 2 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会, 2013.12.

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

文科省・科研費・若手(B)・H25-26・分子配向を利用したバイオメテック・ファイバーの創成と組織構築への応用・代表・採択・416万円