

## 液々界面に生じるしなやかなタンパク質ナノ薄膜が幹細胞を神経に導く

～変形・流動する足場が分化を促進 高価な試薬不要で再生医療の低価格化に期待～

配布日時：2019年12月10日14時

国立研究開発法人 物質・材料研究機構

### 概要

1. NIMS は、水とパーフルオロカーボンという二種類の混じりあわない液体の間に形成されるタンパク質のナノ薄膜の上で、高価な試薬を用いずに、幹細胞を神経細胞に分化させることに成功しました。再生医療などで必要な幹細胞の分化誘導を、安価に実現する技術として期待されます。

2. iPS 細胞などの幹細胞は、再生医療や組織工学の分野で中心的な役割を果たしていますが、その際、これらを望みの細胞へと効率的に分化誘導する技術が不可欠です。これまでは、サイトカインなどの高価な分化誘導因子を用いることが一般的でしたが、コストの観点などで課題が残されていました。そのため、これらの試薬を用いずに、培養基質の硬さや凹凸を工夫するだけで幹細胞の分化をコントロールする試みも進められていますが、分化効率が悪く、新たな技術の開発が求められていました。

3. 今回、研究チームは、細胞培養液（水溶液）とパーフルオロカーボン（油の一種）という混じりあわない二種類の液体の界面を幹細胞の培養・分化誘導の場とする技術の開発に成功しました。この液体同士の界面では、培養液中に含まれるタンパク質と別途添加したフィブロネクチン（タンパク質）よりなるナノ薄膜が形成され、その上で培養した間葉系幹細胞は、分化誘導因子を加えなくても、自ら進んで神経細胞へと分化しました。通常の細胞培養には、プラスチックなどの固体材料が用いられるため、そもそも液体の上で細胞を培養すること自体が斬新な発想ですが、実際に流動的な液体だからこそ、タンパク質薄膜にしなやかな特徴が備わり、それらが幹細胞の働きかける力に応じて変形・集積化して、効率的な神経細胞への分化を促していることを突き止めました。



図：しなやかな液々界面が実現する間葉系幹細胞の神経分化誘導

4. 今後、この成果を発展させて、液体の種類やフィブロネクチン以外の添加物などを検討することでさまざまな種類の細胞に分化誘導できるようにすることをめざします。それらが、再生医療に有用な細胞材料の新しい供給方法となることが期待されます。

5. 本研究は、国際ナノアーキテクニクス研究拠点の Xiaofang Jia 博士研究員、中西 淳 グループリーダー、有賀 克彦 主任研究者（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授 兼務）らからなる研究チームによって行われました。本研究成果は、Advanced Materials 誌にて現地時間 2019 年 12 月 9 日 12 時（日本時間 9 日 20 時）にオンライン掲載されます。

## 研究の背景

近年、細胞のさまざまな機能が、物理的な「力」の作用によって調節されていることが明らかになり、それらを取り扱うメカノバイオロジーという新しい学問分野が注目を集めています。例えば幹細胞は、培養基質の弾性率（硬さ）や表面トポグラフィ（凹凸）によってその分化系統を変化させることが知られていますが、この際、細胞は基質に対してある種の引張り試験を行っており、わずかな力学的特徴の違いを巧妙に読み取り、それを基に自身の運命を変化させています。したがって、細胞に対し、適切な力学刺激を与えられる材料を設計・開発すれば、iPS細胞などの万能な幹細胞を、効率的に望みの細胞へと分化させる技術として、再生医療に大いに貢献できることとなります。ただ、実際の生体内においては、細胞は基質の力学特性を感受しているだけでなく、細胞自身に都合が良いように、細胞外の基質を変化（リモデリング）させています。しかもこのように、力学刺激が時間とともに変化する「動的な」特徴こそが幹細胞の運命決定の本質であることも分かってきています。このような観点から、基質の化学・力学的特徴が時間とともに変化する動的な材料の開発が近年さかんに進められています。ただそれらの多くは、電位や光などの外部刺激に応じて二状態（接着／非接着、軟らかい／硬いなど）の間を行き来させる原理に基づいたもので、細胞の付与する力学刺激に対して順応性を持ち（Adaptive）、かつ化学・力学的特徴が連続的に変化する、実際の生体内の細胞外基質が備えている特徴とは大きく異なるものでした。

一方で、我々の研究チームでは、メカノバイオロジー的に究極に軟らかく、しかも順応性のある材料という観点から、液体を培養足場に用いることに注目して研究を進めてきました。その中で、水と混じりあわないパーフルオロカーボンという疎水性液体（ある種の油）の上において、何ら特別な処理をしなくても、細胞が接着・伸展できることを最近見出しました（図1）。この際、これらの液体の界面には、培養液に由来するタンパク質の単分子レベルのナノ薄膜が形成されており、それが細胞の印加する牽引力に耐える力学強度を獲得し、新奇な培養基質としての可能性を有することを見出しています。

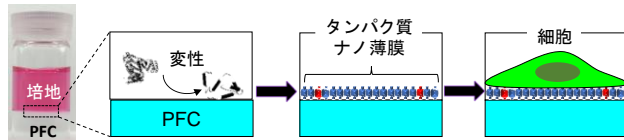


図1. 水-パーフルオロカーボン（PFC）よりなる液々界面細胞培養系と界面でのタンパク質ナノ薄膜の自己組織化

## 研究内容と成果

本研究では、幹細胞の一種であるヒト間葉系幹細胞（hMSC）を対象に、我々NIMSの研究チームが先に見出した液々界面に形成されるタンパク質のナノ薄膜の培養・分化誘導の場としての可能性を探りました。主要な研究成果は以下の3つにまとめられます。

### ① 特定のパーフルオロカーボンはhMSCの自発的な神経細胞分化を誘導する。

最初に perfluorooctane (PFO)、perfluorodecaline (PFD)、perfluorotributylamine (PFTBA) というFDAに認可されている3種類のパーフルオロカーボンを対象に、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）の培養および分化挙動を調べたところ、PFOの上に細胞を播種した細胞のみが、2週間伸展・接着した形状を保ち、かつ、初期の神経分化を示す遺伝子（*TUBB3*）の発現が確認されました。さらに、液体の表面をフィブロネクチンでコーティングすると、より成熟した神経分化マーカー（*MAP2*）の発現までもが観察されるようになりました。この際、細胞が発する牽引力を弱める試薬（Y27632）を添加すると、この遺伝子の発現は大幅に低くなり、細胞とタンパク質薄膜との間には力学的な相互作用が働いていることが分かりました（図2）。その一方で、比較した3種類のパーフルオロカーボンの上に形成されるタンパク質ナノ薄膜の力学特性を調べると、PFOのみが特別な値を示すわけではなく、何か別の要因が神経分化誘導に関わっていることが見えてきました。いずれにせよ、ここで使用している培養溶液には、hMSCの分化を促す液性因子が加えられていないため、水（培養溶液）とPFO間の液々界面という特殊な場が、神経分化に

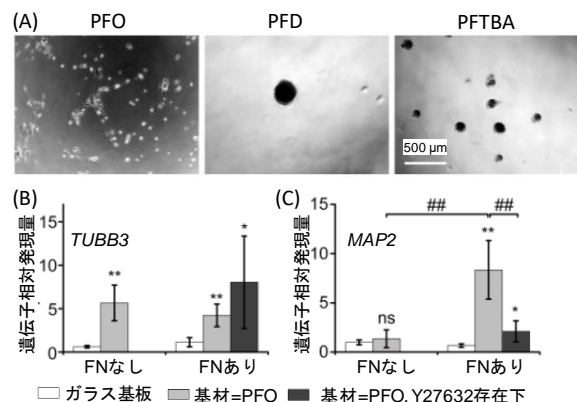


図2. (A) 3種類のパーフルオロカーボンの上でヒト間葉系幹細胞（hMSC）を2週間培養した結果。(B, C) 各種条件での神経分化遺伝子の発現評価。

関わっていることは間違いありません。

### ② 液々界面における hMSC の神経分化における特徴的な力覚機構

つぎに、hMSC がタンパク質ナノ薄膜とどのような力学的な相互作用を行って神経細胞へと分化されているのかについて調査しました。フィブロネクチンでコーティングした PFO 表面に付着した hMSC は、伸展した接着形状を取っており、その内部には楕円型に伸長した接着斑や、そこを起点とした F-actin のストレスファイバーが形成されていました (図3)。また、下流のシグナル伝達に関わるタンパク質リン酸化酵素 (FAK) の活性化体の接着斑への集積や、YAP の核内移行なども確認できました。一般に、軟らかいゲルなどの基材の上で培養した hMSC は神経細胞に分化しやすいことが知られています。しかしながら、その際には、hMSC は伸展形状を取らず、しかもストレスファイバーは生じず、YAP も細胞質に留まることが知られています。これを踏まえると、PFO の上に培養した hMSC は、その基質を単に軟らかいと捉えている訳ではなく、何かしら新しいメカノセンシング機構が関わっていることが示唆されます。

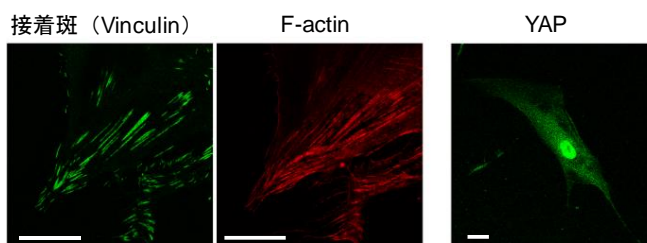


図3. 水-PFO界面に接着したhMSCの接着斑(Vinculin), 細胞骨格(F-actin), メカノトランスデューサー(YAP)の細胞内分布。

### ③ しなやかな液々界面が細胞とタンパク質薄膜の力学的対話を可能にする

最後に、hMSC との相互作用によってタンパク質薄膜側でおこる変化を調べました。界面に形成されるフィブロネクチンを観察したところ、播種4時間後には、細胞の辺縁部に、フィブロネクチンが束状に濃縮される様子が観察されました (図4)。これは細胞の牽引力に応じて、タンパク質ナノ薄膜内でフィブロネクチンが寄せ集められたものと考えられます。一般に、牽引力を受けたフィブロネクチンは構造変化し、隠れていた分子間相互作用部位を露出して、自己集積化 (多量体化) することが知られています。これと対応するように、その後も観察を続けると、24時間後にはしわ状の構造体へと成長し、さらに3日後には、小さな線維を含む階層的な構造体へと変貌を遂げていく様子が確認できました。これに対し、通常ガラス基板にフィブロネクチンをコーティングした場合には、このような構造が形成されません。したがって、このようなフィブロネクチンの成熟は液々界面に特徴的な現象と言えます。また、このフィブロネクチンの線維化を抑える薬剤 (FUD ペプチド) を添加すると、細胞側の接着斑の伸展が阻害されました。以上を踏まえると、hMSC と液々界面の間に形成されるタンパク質薄膜の間には双方向に調節しあう力学的対話が成立しており、それは、流動的な液々界面のしなやかな性質によって可能となっていることが明らかになりました。

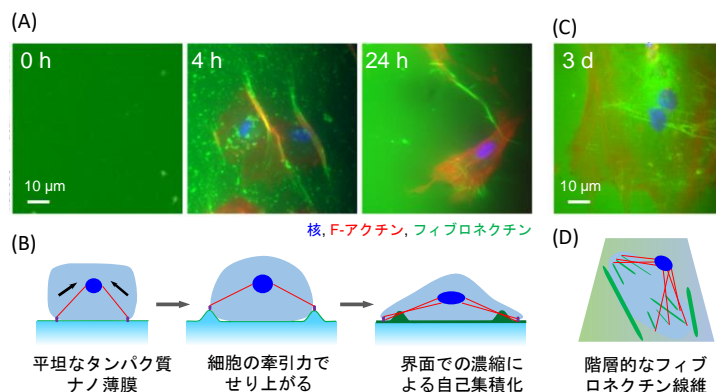


図4. 細胞との相互作用によるタンパク質ナノ薄膜の変化。(A) hMSC 播種1日内の免疫染色像と(B)その解釈。(C) 3日後の成熟したフィブロネクチン線維と(D)その概念図。

## 今後の展開

通常、幹細胞分化誘導には高価なサイトカインなどの液性因子が使用されますが、今回開発した技術では、液体材料の流動的な側面を利用することで、基質からの力学刺激のみで間葉系幹細胞へと導くことができるようになりました。これは、幹細胞を用いる再生医療技術において重要な、効率的かつ安価な分化誘導技術として大きな可能性を秘めています。今後、神経のみでなく、さまざまな種類の細胞へと分化誘導できる技術を探し求めていくことで、材料を基軸とする再生医療技術としてのさらなる飛躍が期待されます。

## 掲載論文

題目：Adaptive Liquid Interfacially Assembled Protein Nanosheets for Guiding Mesenchymal Stem Cell Fate

著者：X. Jia,\* K. Minami, K. Uto, A. C. Chang, J. P. Hill, J. Nakanishi, K. Ariga\*

雑誌：Advanced Materials

掲載日時：現地時間 2019 年 12 月 9 日 12 時（日本時間 9 日 20 時）

## 用語解説

### (1) メカノバイオロジー

- ・生命現象や病態における物理的な「力」の作用を取り扱う新しい学問分野。従来の分子の作用に注目する分子生物学を補完するものと位置付けられる。

### (2) 界面

- ・気体、液体、固体など、相として分離する物質の境界のこと。水と油の様に混じりあわない液体同士も界面が生じる。

### (3) パーフルオロカーボン

- ・フロン類に属する化学物質で、炭化水素内の水素 (H) 全部がフッ素 (F) に置換された分子。液体状態のものは、水や一般的な有機溶媒とも混合せず、また水よりも比重が高い。

### (4) 間葉系幹細胞

- ・間葉系に属する骨や筋肉、脂肪などさまざまな細胞へと分化する能力のある幹細胞で、再生医療への応用が進められている。

### (5) フィブロネクチン

- ・細胞外マトリクスを構成するタンパク質の一つで、細胞膜上のインテグリンと相互作用する。細胞接着・移動・創傷治癒などに関わるとともに、細胞と細胞外マトリクスとの間の力学的な相互作用を媒介するタンパク質として、メカノバイオロジー研究においても重要な位置を占めている。

### (6) F-アクチン

- ・細胞骨格を構成するタンパク質の一種のアクチンが糸状の重合体を形成したもの。これらが、他のタンパク質と複合化して束になることで、細胞骨格として細胞に張力を与える役割を果たす。

### (7) YAP

- ・力学刺激に応じて細胞質-核の間を行き来するタンパク質であり、遺伝子発現を調節する転写共役因子の役割を果たす。

## 本件に関するお問い合わせ先

(研究内容に関すること)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点

メカノバイオロジーグループ グループリーダー

中西 淳 (なかにし じゅん)

E-mail: NAKANISHI.Jun@nims.go.jp

TEL: 029-860-4569, FAX: 029-860-4706

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクニクス研究拠点

MANA 主任研究者/超分子グループ グループリーダー

国立大学法人 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 物質系専攻 教授

有賀 克彦 (ありが かつひこ)

E-mail: ARIGA.Katsuhiko@nims.go.jp

TEL: 029-860-4597, FAX: 029-860-4832

(報道・広報に関すること)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構 経営企画部門 広報室

〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1  
E-mail: [pressrelease@ml.nims.go.jp](mailto:pressrelease@ml.nims.go.jp)  
TEL: 029-859-2026, FAX: 029-859-2017