

光増感色素固定化ガラス基板を用いた組織幹細胞の 運命制御技術の開発

大阪府立大学 大学院理学系研究科 森 英樹

Investigation of Technology to Regulate the Fate of Tissue Stem Cells Using Photosensitizer-
Immobilized Glass Substrates

Hideki Mori

Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

光増感色素 hematoporphyrin IX を固定化したガラス基板上に細胞を接着させ、光増感反応によって発生する活性酸素の刺激を与えながら細胞を培養する装置を作製した。ラット間葉系幹細胞やマウス神経幹細胞をその培養装置上で接着培養した後、下面から LED 光源によって白色光を照射し、細胞が接着している下側から活性酸素を発生させた。定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析によって其々の組織幹細胞の分化傾向を調べた結果、活性酸素による刺激を受けた間葉系幹細胞は脂肪細胞への分化傾向を示した。分化誘導培地を用いて接着培養したマウス神経幹細胞は、活性酸素による刺激を受けてグリア細胞への分化がやや高まる傾向が見られた。

We developed a cell culture device that attaches cells to a glass substrate immobilized with the photosensitizer, hematoporphyrin IX, and stimulates them with reactive oxygen species generated by the photosensitization reaction. After rat mesenchymal stem cells and mouse neural stem cells were attached to the device, white light was irradiated by an LED light source to generate reactive oxygen species from the underside of the attached cells. Gene expression analysis by RT-qPCR showed that mesenchymal stem cells stimulated by ROS tended to differentiate into adipocytes. Mouse neural stem cells stimulated by ROS in the medium for differentiation induction showed an increased tendency to differentiate into glial cells.

1. はじめに

中枢神経系にあるニューロンやグリア細胞へ分化できる神経幹細胞や骨・軟骨・脂肪細胞などへ分化できる間葉系幹細胞は、その多分化能と増殖能力からそれぞれ中枢神経疾患や骨疾患の移植治療を目指した再生医療のための細胞として臨床応用され始めている。これらの細胞を治療に用いるには、必要な量まで細胞を増やし、適切なタイミングで目的の細胞へ分化誘導、選別するといった数か月間の培養工程が必要となる。現在、多くの場合、細胞培養工程は人による手作業で行われるが、最近では生産性を高めるために細胞増殖・分化を担う培養工程を自動化する技術の必要性も高まっている。

近年、幹細胞が接着する周辺環境の硬さなど物理的な刺激によって分化傾向が変化することが報告^{1,2)}されている。電氣的に制御しやすい物理・化学的刺激は、自動化も見据え

た新たな幹細胞の分化誘導培養法の原理に繋がると考えられる。本研究では、光照射によって制御できる光増感反応によって発生する活性酸素(ROS)が細胞を刺激することに着目した。一般に ROS の刺激は細胞を傷害し、細胞死を誘導すること知られており、光線力学療法のようなガン治療にも応用されてきた³⁾。しかし最近、極めて弱い ROS 刺激が細胞内情報伝達系を通じて幹細胞の分化傾向を変化させることが報告されている^{4,5)}。つまり、いつどこにどれくらいの量の ROS が発生するかによって細胞の応答が変化することを意味している。ROS 刺激の量やパターンと幹細胞の生死や分化の関係を解明できれば、幹細胞の培養技術開発に有用な情報となる。本研究では、光増感剤固定化スライドガラスを下面にもつ培養容器を作製し、その培養容器内で培養した組織幹細胞に底面からの光照射で光増感反応による ROS を発生させ、その ROS 刺激に対して組織幹細胞の生死や分化傾向がどのような変化するのかについて解析した。

2. 実験方法

2.1 ROS発生細胞培養容器の作製

既にアミノ基が修飾された MAS コートスライドガラスの表面に、カルボジイミド架橋剤(EDC)と *N*-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を用いた反応によりヘマトポルフィリン IX (HP)を固定した。HP を固定したスライドガラスの吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。ポルフィリンに特徴的な Soret 帯と Q 帯の吸収を確認した。反応に用いた HP 溶液の濃度に応じてガラス表面に固定された HP 密度は変化した。HP 修飾スライドガラスにプラスチック製枠と蓋を取り付け、ROS 発生細胞培養容器とし、滅菌したものを細胞培養に用いた。ROS を発生させるために、ROS 発生細胞培養容器の下面から白色 LED 照射装置によって放射照度 $500 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光を、1 分間の発光と 3 分間の消灯を 1 サイクルとし、実験条件に応じて適当回数照射した。ROS の発生量は *p*-ニトロソジメチルアニリン(RNO)法による RNO の 440 nm 吸光度の変化量から測定した(Fig. 2)。

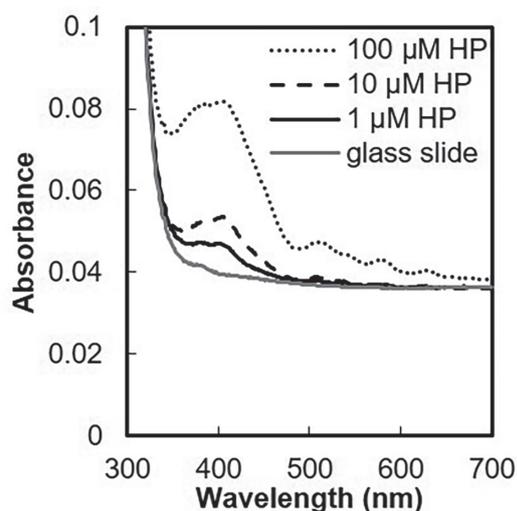


Fig. 1 UV-visible absorption spectra of glass slides immobilized with HP.

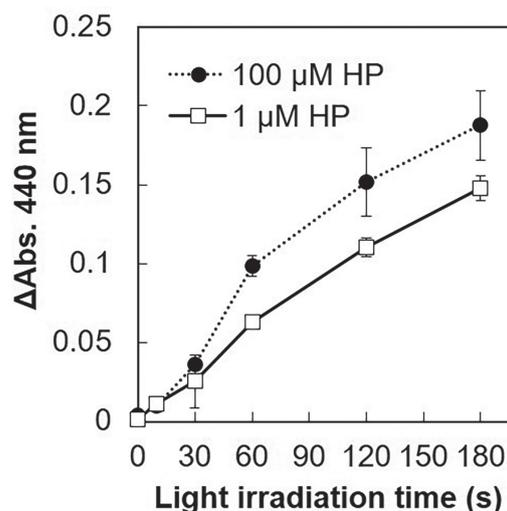


Fig. 2 Changes with time in the amount of ROS ($^1\text{O}_2$) generated from HP-immobilized glass slides by light irradiation.

2.2 間葉系幹細胞と神経幹細胞の培養とROS刺激による分化傾向への影響評価

間葉系幹細胞は7週齢のF344ラット骨髄から採取した細胞を10% FBS含有MEM培地で培養したものをを用いた。実験には、100 μ MのHPと反応させた高HP固定ガラス底培養容器と1 μ MのHPと反応させた低HP固定ガラス底培養容器を用いた。各容器に細胞を播種し、24時間後に光照射処理を施した。1サイクルの光照射処理から1時間後にpropidium iodide (PI)とcalcein-AMによって細胞の生死判別を行った。また、細胞死があまり生じなかった低HP固定ガラス底培養容器を用いた条件で、光照射処理を1サイクル、5サイクルまたは25サイクル実施した後、1時間後に細胞から総RNAを抽出し、定量的RT-PCR法により分化マーカー遺伝子(*Runx2*, *Col2a1*, *Cebpa*)の発現解析を行った。

神経幹細胞は胎齢14日目のICRマウス大脳から採取した神経幹細胞をB27 supplement、EGF、b-FGFを含むDMEM/F12培地で培養したものをを用いた。実験には、B27 supplementと1% FBSを含むDMEM/F12培地(分化誘導培地)に懸濁した神経幹細胞を低HP固定ガラス底培養容器に播種した。37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%下で3時間インキュベーションした後、光照射処理を2サイクル、5サイクルまたは10サイクル実施した。さらに、1週間培養した後に細胞から総RNAを抽出し、定量的RT-PCR法により分化マーカー遺伝子(*Gfap*, *S100b*, *Tubb3*)の発現解析を行った。

3. 結果と考察

3.1 間葉系幹細胞の分化傾向の変化

間葉系幹細胞は高HP固定ガラス底培養容器、低HP固定ガラス底培養容器の両方ともに接着し、培養することができた。1分間の光照射によって、1時間後には高HP固定ガラス底培養容器では9割以上の細胞の細胞死が見られたのに対し、低HP固定ガラス底培養容器では9割以上の細胞が生存していた(Table1)。高HP固定ガラス底培養容器では発生したROS量が多く細胞傷害を生じたと考えられる。この後の幹細胞の分化傾向の解析実験には低HP固定化基板を用いた。

Table 1. Percentage of viable mesenchymal stem cells 1 hour after light irradiation

Hematoporphyrin (HP) conc.	ROS-generating cell culture vessel prepared with HP solution of each concentration	
	100 μ M	1 μ M
Percentage of Living cells	2.0 \pm 0.9%	98.2 \pm 0.5%

間葉系幹細胞は骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への多分化能をもっており、いずれの細胞種への分化傾向を示したかを調べるために、*Runx2*(骨細胞)、*Col2a1*(軟骨細胞)、*Cebpa*(脂肪細胞)を分化マーカーとして用いた。光照射処理によるROS刺激を与えた後の間葉系幹細胞における其々の遺伝子の相対発現量をFig. 3に示した。*Runx2*の発現はばらつきが大きく、光照射1サイクル、5サイクル、25サイクルと対照群の間に大きな違いは見られなかった。一方、*Col2a1*の発現は光照射した細胞では対照群の半分程度に低下した。*Cebpa*の発現は光照射した細胞では対照群比べて高く、最もROSが発生する25サイクルが最も高かった。この結果からラット骨髄由来間葉系幹細胞は、低HP固定ガラス底培養容器の光照射によって生じたROS刺激により脂肪細胞への分化傾向が高まったと考えら

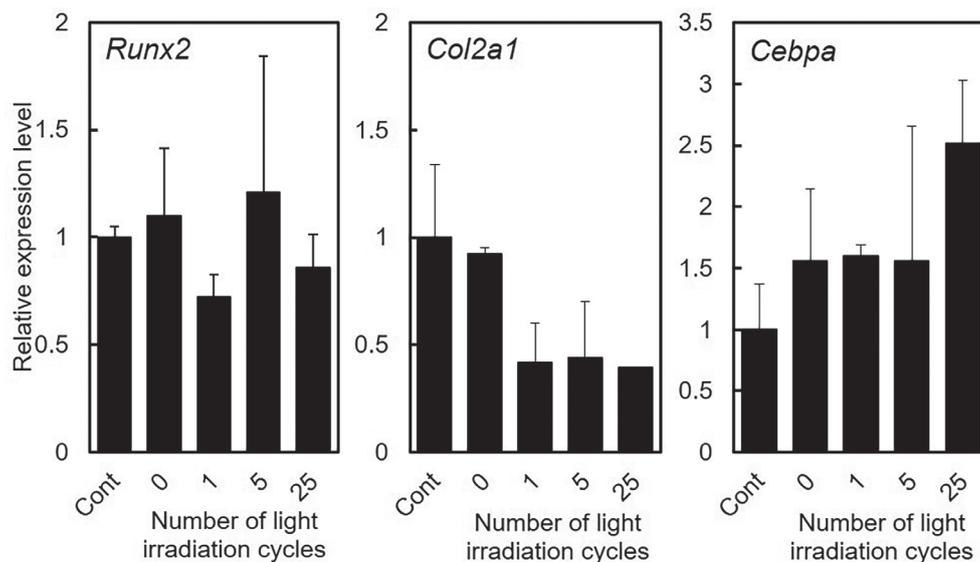


Fig. 3 Expression of differentiation-related genes in ROS-stimulated mesenchymal stem cells. Control (Cont) refers to the condition of glass slides without HP modification.

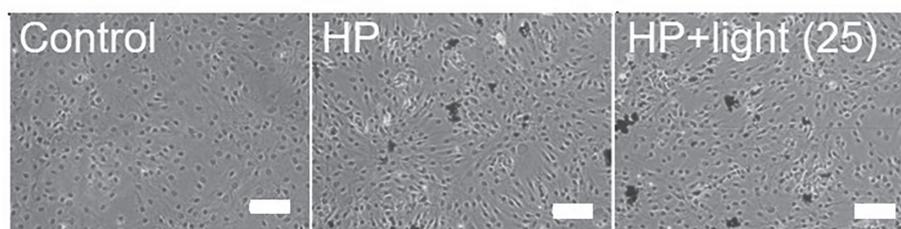


Fig. 4 Microscopic images of alizarin red stained mesenchymal stem cells cultured for 2 weeks after light irradiation. Scale bars = 100 μm.

れる。光照射処理後、更に2週間培養した細胞では、脂肪細胞を示すオイルレッドOで染色される細胞も確認できた(Fig. 4)。

3.2 神経幹細胞の分化傾向の変化

神経幹細胞は中枢神経系を構成するニューロンやグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)への多分化能をもっており、どちらの細胞種への分化傾向を示したかを調べるために、*Gfap*(グリア細胞)、*S100b*(グリア細胞)、*Tubb3*(ニューロン)を分化マーカーとして用いた。光照射処理によるROS刺激を与えた後の神経幹細胞における其々の遺伝子の相対発現量をFig. 5に示した。マウス胎仔脳由来神経幹細胞はラット骨髄由来間葉系幹細胞に比べROSへの感受性が高く、25サイクルの光照射では細胞死が見られたので、最大サイクル数は10回で実施した。5サイクルの光照射でグリア細胞への分化を示す*Gfap*の発現がやや増加する傾向が見られ、10サイクルの光照射ではニューロンへの分化を示す*Tubb3*の発現が減少する傾向が見られたが、全体的に発現量のばらつきが大きく有意差は得られなかった。幹細胞の分化率に明確な差を生じさせるためには、光照射のタイミングを大きく遅らせる等の詳細な更なる条件検討が必要である。

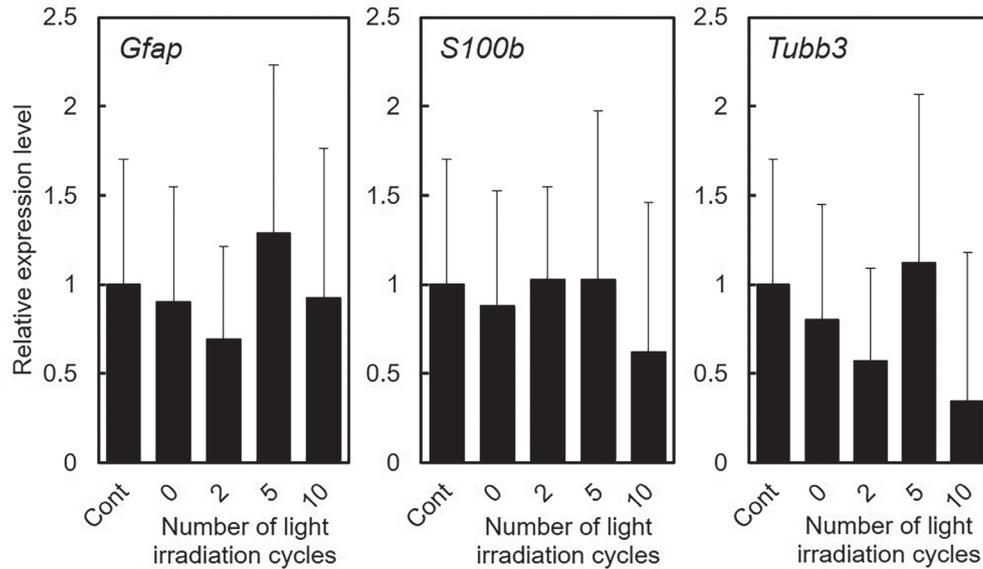


Fig. 5 Expression of differentiation-related genes in ROS-stimulated neural stem cells. Control (Cont) refers to the condition of glass slides without HP modification.

4. 結論

光増感色素を細胞培養容器底面のガラス表面に固定し、光照射によって ROS を発生させ、細胞に刺激を与える装置を作製した。細胞培養容器ガラス底面から細胞へ ROS 刺激を与えることによって、ラット骨髄由来間葉系幹細胞やマウス胎仔脳由来神経幹細胞の分化傾向に変化を生じさせることができた。ROS 発生量が多い条件は細胞死を誘導した。細胞死を生じない程度の ROS 刺激によって、間葉系幹細胞では脂肪細胞への分化傾向が見られた。神経幹細胞では ROS 刺激によって僅かなグリア細胞への分化傾向の増加が見られた。

5. 謝辞

本研究は、平成 30 年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて実施したものである。同助成会に心より感謝致します。

6. 参考文献

- 1) A. J. Engler, *et al.* Cell, 126, 677 (2006).
- 2) H. Mori, *et al.* Neurosci. Lett., 555, 1 (2013).
- 3) C. Ewelt, *et al.* J. Photochem. Photobiol. B, 148, 302 (2015).
- 4) T. Kushibiki, *et al.* Sci. Rep., 5, 13114 (2015).
- 5) P. Garg, *et al.* Orthop. Surg., 9, 13 (2017).