

称号及び氏名 博士（理学） 尾崎 由季

学位授与の日付 平成 27 年 3 月 31 日

論文名 可溶化ケラチンの細胞培養基材への利用に関する研究
Studies on Extracted Keratin as a Scaffold for Cell Culture

論文審査委員 主査 原 正之
副査 森 展子
副査 八木 孝司

学位論文要旨

Introduction

組織工学(tissue engineering)は再生医療関連の研究分野であり、細胞、細胞増殖(分化)因子、足場材料という「三要素」を適切に組み合わせ、生きた組織や臓器を人工的に作り出す技術体系である。足場材料(scaffold)に適した様々な生体材料(biomaterials)が探索されており、私は獣毛由来ケラチンを選択して詳しく研究を行った。ケラチンはシステイン(Cys)を多く含む線維性蛋白質で、分子内と分子間に多くのジスルフィド(-S-S-)架橋を持つ。これを-SH基に還元しケラチンを可溶化すると、再酸化・再架橋により任意の形状に加工できる。既知の方法でケラチンを可溶化後、そのサブユニットを分離精製し、2次元薄膜状の細胞培養基材を作製して、細胞の増殖や分化への影響を調べた(Chapter 1)。続いて界面活性剤を用いないケラチン多孔質ハイドロゲルの新規調製方法を開発し、ゲルの細胞培養基材としての基本的な性質の解析と(Chapter 2)、骨形成足場材料への利用を検討した(Chapter 3)。

Chapter 1 ブタ毛ケラチンの分離精製と固定化培養基材の評価

獣毛組織を界面活性剤と還元剤存在下で可溶化した抽出物(以下粗抽出液)は、主成分である type I、type II サブユニット(40~60 kDa)に加え、様々な蛋白質を含む混合物である。多くの先行研究は、この夾雑な粗抽出液を用いており、個々のサブユニットが細胞に与える作用は未知であった。今回は研究例の少ないブタ毛からケラチンを抽出し、主成分の type I と type II の各サブユニットを分離精製後に培養皿上に固定化・薄膜化し、サブユニット毎の PC12 細胞の増殖と分化への影響を初めて調べた。

【実験】

ブタ(*Sus scrofa*)の体毛(90 mg/mL)を 8 M 尿素、0.26 M ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1.66 M 2-mercaptoethanol を含む抽出液に浸漬して 60°C で 18 時間抽出し、不溶成分を濾過後、純水に 3 日間透析して粗抽出液を得た。10%(w/v)polyacrylamide gel(150 mm x 140 mm x 5 mm)を用いて、粗抽出液を調製用の電気泳動(SDS-PAGE)にかけ、蛋白質バンドの切り出し回収によりケラチンの type I(48 kDa)と type II(63 kDa)サブユニットを分離精製した。粗抽出液、精製サブユニット溶液を 10, 25, 100 µg/well ずつ 96well 培養皿へ入れ、70°C で 3 時間の加温乾燥で固定化し、ケラチン被覆培養皿を得た。培養皿表面を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察し、また表面の疎水性を評価する為に水の接触角を測定した。この培養皿に神経細胞モデル株の PC12 細胞を培養し、5 日後までの生細胞数測定(WST assay)を行った。同様に 1.25 µg/mm²のケラチンを固定化した 35 mm 培養皿上の PC12 細胞に、200 ng/mL の神経成長因子(NGF)を添加して神経細胞様に分化させ、神経突起伸長や細胞面積測定を含む形態の観察・測定を行った。

【結果および考察】

粗抽出ケラチンから上記の調製用 SDS-PAGE にて分離精製した 2 種のサブユニット溶液(0.6±0.2 mg/mL)が得られた。SEM 像から、培養皿表面はいずれの試料を固定化した薄膜も極めて平滑かつ均一であった。接触角測定の結果、type I 固定化時には、表面が僅かに疎水性になった。未処理(control)および、粗抽出液、type I、type II をそれぞれ固定化した培養皿上ではいずれも、PC12 細胞は正常に接着し、増殖した。NGF を添加し神経細胞への分化誘導を行うと、type I、type II の基材上では細胞面積、神経突起長がやや低下し、この阻害効果は type II でより顕著であった。つまり、固定化された両種の精製サブユニットは PC12 細胞の増殖には影響を与えないが、細胞分化、特に神経突起伸長を阻害することが示された。精製した 2 つのサブユニット間で、細胞に対する作用の違いが初めて示された。この性質の違いは、ケラチンの基材が細胞に与える影響を理解する手掛かりになると考えられる。

Chapter 2 新規抽出法による羊毛ケラチン由来ハイドロゲルの調製と評価

蛋白質変性剤、-S-S-結合の還元剤、界面活性剤等を用いて不溶性のケラチンを可溶化する様々な抽出方法が既に提案されている。界面活性剤は抽出効率を高めるが添加後の完全な除去が難しく、細胞培養基材中に微量残存して細胞傷害を起し易い。また、従来法による 3 次元多孔質基材の調製には凍結乾燥や物理的圧縮などの煩雑な手順や装置が必要である。私は上記の欠点を補い、界面活性剤を用いず容易に 3 次元の多孔質ケラチンハイドロゲルを調製する新規な方法を開発した。なお、材料の入手し易さと動物種による抽出効率の違いを考慮して、以後の実験ではブタ毛に替わり羊毛(wool)を原料とした。

【実験】

ヒツジ(*Ovis aries*)の体毛(100 mg/mL)を 8 M guanidine 塩酸塩と 1.66 M 2-mercaptoethanol を含む溶解液に 60°C で 18 時間浸漬し、不溶成分を濾過して粗抽出液を得た。この溶液を純水

に透析すると guanidine の濃度が下がり、ケラチンが自己凝集してスポンジ状の多孔質ハイドロゲルを生じた。円筒形の容器底面に透析膜を取り付けた装置を自作して、形成後にゲルをくり抜く方法で円板状のゲル試料を再現性良く調製し、さらにオートクレーブ処理 (121°C, 15 min)により力学的な補強を兼ねて滅菌した。レオメータ(Physica MCR301, Anton Paar)を用いた動的粘弾性測定と、オートグラフ(AGS-50ND, Shimadzu)を用いた引っ張り試験を行い、ゲルの力学的性質を評価した。また、神経細胞モデル株の PC12 細胞、骨芽細胞モデル株の HOS 細胞、マウス胚性線維芽細胞(MEF)の 3 種類の細胞をゲル上に播種し培養して、7 日後に Calcein-AM/PI 染色により細胞の生存を蛍光顕微鏡下で観察した。また培養 1, 4, 7, 10, 14 日後の生細胞数測定(WST assay)を行い、細胞培養基材としての利用可能性を検討した。

【結果と考察】

上記の多孔質ハイドロゲルは、微粒子が繋がった様なスポンジ状の構造を持ち表面積が大きい。また力学的には変形に対する柔軟性と、高い引っ張り強度(切れ難さ)を併せ持つ事が、その著しい特徴である。培地中に入れると速やかに膨潤して、以後は一定の容積を保持するので、培養基材として使い易い。動的粘弾性測定と引っ張り試験の結果、ゲルの貯蔵弾性率(G')は 4 kPa、ヤング率は 100 kPa 程度であった。ゲル上に播種・培養した前記 3 種類の細胞はゲル上での正常な生存と増殖が Calcein-AM/PI による Live/Dead 染色、および WST assay から明らかになった。ゲルは不透明なので光学顕微鏡観察には適さないが、細胞のゲル表面への接着を走査型電子顕微鏡(SEM)観察により確認した。

上記の新規な方法により、界面活性剤を用いないケラチンの高収率な抽出と多孔質ハイドロゲルの調製が可能となった。従来法と異なる点は、①複雑な手順を必要とせず、②調製に用いる薬剤は除去可能で細胞毒性を示さず、③任意の形状への加工が可能であり、④調製したゲルが柔軟性と高い引っ張り強度を併せ持つことが特徴である。ケラチン由来足場材料は生体適合性を持ち、硬組織(例えば骨や軟骨)等の組織構築への利用が期待できる。

Chapter 3 羊毛ケラチンハイドロゲルの骨形成用足場材料への利用

細胞外マトリクス(ECM, extracellular matrix)を構成する多くの蛋白質は生体内で吸収性があり、生体材料に用いられる。特にコラーゲンゲルは任意形状に加工が容易な培養基材だが力学的強度が低い。化学的・物理的に架橋すれば補強できるが柔軟性が失われ易い。Chapter 2 で示した羊毛ケラチンの多孔質ハイドロゲルは、より高い力学的強度と柔軟性を併せ持つことから、骨形成用の足場材料として利用を試みた。

【実験】

Chapter 2 の方法で羊毛ケラチンの多孔質ハイドロゲルを作製した。比較対象として細胞培養用培養皿、I 型コラーゲンゲル(未処理、化学架橋し補強したもの)を準備した。骨形成を *in vitro* で模倣する骨芽細胞モデルとして、骨芽細胞に分化する初代培養系としてラット大腿骨由来間葉系幹細胞(rMSC)、骨芽細胞モデル株のヒト骨肉腫由来 HOS 細胞、の 2 種を

使用した。細胞接着性の評価として、血清を除いた培地中に懸濁した上記の細胞を播種し、8時間後にゲルに接着した細胞の形態と生存 (Calcein-AM/PI 染色) を確認した。次に DNA 定量により、播種 28 日後までの細胞数変化を計測した。さらに 0.3 mg/mL naphthol-AS リン酸と 0.6 mg/mL Fast Blue 塩を含む ALP 染色液を用いた細胞の alkaline phosphatase (ALP) 活性の評価、*p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) を用いた ALP 活性の定量的測定、Alizarin Red S 染色液によるリン酸カルシウム沈着の評価を行った。

【結果と考察】

rMSC と HOS 細胞は、血清を含まない培地中でケラチン多孔質ハイドロゲル上に接着し、生存することが播種 8 時間後の Calcein-AM/PI による Live/Dead 染色により示され、ゲル自身に細胞接着に係る因子が存在することが示唆された。DNA 定量によって細胞増殖を測定すると、他の基材上とほぼ同様の増殖を示した。細胞はゲルの孔内に入り込み、その表面に接着、増殖していると考えられる。ALP 染色を行いゲル上の細胞を観察すると、骨芽細胞マーカーである ALP の活性を持つ細胞は、他の基材を用いた場合と同様、分化誘導後 2 週間以降から増加した。陽性細胞数はコラーゲンゲル上よりも多く、培養皿上と同程度であった。ALP 活性を定量的に測定すると、rMSC では分化誘導の有無で明瞭に活性が異なるが、骨芽細胞モデル株の HOS 細胞は元来 ALP 活性を持つ為に大きな違いは観察されなかった。ゲル上に接着した細胞は分化誘導後 2 週間以降からリン酸カルシウムを分泌し、Alizarin Red S 染色によりその沈着を可視化できた。以上の結果より、ケラチン多孔質ハイドロゲルはその高い力学的強度から、骨形成用の足場材料として適しており、その利用が期待できると考えた。

Conclusion

本研究では、ブタ毛より精製したケラチンの type I と type II サブユニットを固定化した基材表面が、PC12 細胞の増殖には互いに大きな差異を示さないが、後者が神経突起の伸長阻害効果を持つことを見出した。この性質の違いは、ケラチンの細胞への影響を理解するのに役立つ知見である。またグアニジンを用いて羊毛よりケラチンを抽出し、多孔質ハイドロゲルを調製する新規で簡便な方法を開発した。この多孔質ゲルは柔軟性と高い力学的強度を併せ持ち、骨形成用の組織構築の足場材料に有用であることが示された。

Publication

- 1) Purification of porcine hair keratin subunits and their immobilization for use as cell culture substrates; Ozaki, Y., Takagi, Y., Saito, Y., Mori, H., and Hara, M; Bioscience, Biotechnology and Biochemistry; 77, 1894-1900 (2013).
- 2) Porous hydrogel of wool keratin prepared by a novel method: an extraction with guanidine/2-mercaptoethanol solution followed by a dialysis; Ozaki, Y., Takagi, Y., Mori, H., and Hara, M; Materials Science and Engineering C, 42, 146-154 (2014).

学位論文審査結果の要旨

本学位論文は、Chapter 1（ブタ毛ケラチン蛋白質の分離精製と固定化培養基材の評価）、Chapter 2（新規抽出法による羊毛ケラチン蛋白由来ハイドロゲルの調製と評価）、Chapter 3（羊毛ケラチンハイドロゲルの骨形成用足場材料への利用）の3章から構成されている。ケラチンはシステイン(Cys)を多く含む不溶性の線維性蛋白質で、分子内と分子間に多くのジスルフィド(-S-S-)架橋を持ち化学的・物理的に安定だが、これを-SH基に還元すると可溶化でき、再酸化・再架橋により薄膜などに加工できることを、研究の背景として初めに説明した。Chapter 1では、ケラチンの各サブユニットを精製して培養皿表面へと固定化し、個々の成分が細胞の増殖や分化に与える影響を観察したことについて発表した。ブタ毛から精製したケラチンのtype I、IIサブユニットを固定化した基材表面は、PC12細胞の増殖には大きな影響を与えないが、type IIサブユニットがtype Iサブユニットよりも神経突起の伸長阻害効果を示すことを見出したことを報告した。

次にChapter 2では、容易に3次元の多孔質ケラチンハイドロゲルを調製する新規な方法を開発したことについて発表した。その化学組成（SDS-PAGE、FTIR）、微細構造（走査型電子顕微鏡（SEM）観察）、物性（膨潤特性、引っ張り試験、動的粘弾性測定）、生体適合性（培養細胞の接着性、増殖性）を詳しく調べた結果、この多孔質ゲルは柔軟性と高い力学的強度を併せ持ち、細胞がゲル上で正常に接着、増殖することを報告した。上記2つの内容は既に論文発表済みである。

Chapter 3では、このハイドロゲルの応用として骨形成用の足場材料への適用について発表した。HOS細胞および間葉系幹細胞（MSC）をゲル上で培養して、骨芽細胞のマーカー酵素の活性上昇と、同細胞による生体外での骨形成反応が起きる事などを確認し、硬組織の形成の為に組織工学足場材料としての利用が有望である事を述べた。

以上のように、本論文は、動物の体毛由来のケラチン蛋白質の細胞培養基材への利用に関わる研究として、ケラチンのサブユニットを分離精製してその生理活性の違いを明らかにし、また界面活性剤を用いない新規抽出方法と、透析による多孔質ハイドロゲルの調製方法を確立し、骨などの組織工学足場材料としての利用に新たな可能性を見出した研究成果を纏めたものである。本学位論文審査委員会は、当該論文が博士（理学）の学位を授与するのに相当であると結論した。