

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03022

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞の自己複製メカニズムの解明と培養システムの開発

研究課題名(英文) Understanding molecular mechanism in human pluripotent stem cell self-renewal and development of synthetic culture system

研究代表者

長谷川 光一 (Hasegawa, Kouichi)

京都大学・高等研究院・特定拠点講師

研究者番号：50378890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞(ES細胞やiPS細胞)は、特定の培養条件下で、多能性を保ったまま無限に増殖させること(自己複製)や、人体の全ての細胞種を作り出すことが可能である。このため、細胞移植治療や創薬、疾患研究への利用が期待されている。本研究では、大量の細胞が必要となるこれらの応用利用を安全に安価で行うために、自己複製のメカニズムを解明し、化合物で制御することで合成培養システムの開発を行った。その結果、3種類の化合物を用いることで、従来より安価で安定した合成培地を開発し、この培地を用いた培養システムの開発に成功した。本システムによって多能性幹細胞を利用した再生医療が加速されるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells including ES and iPS cells have ability of infinitely self-renewal and differentiation into all major lineages of cells in the human body. A chemically-defined culture system, free of any biomaterials, is the ideal platform for the quality-controlled, large-scale, cost-effective production of human pluripotent stem cells for use in cell-based therapy and drug discovery. One major objective in developing such a system is to reduce the costs associated with recombinant proteins used as supplements in basal culture media. In this project, we have developed a defined culture system including growth factor-free culture medium utilizing only three chemical compounds and the least number of recombinant proteins of any other commercially available medium. This culture system may serve as a new benchmark for the development of completely xeno-free, chemically defined, synthetic culture systems.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：再生医科学 医工学 ケミカルバイオロジー 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

ヒト多能性幹細胞(ES細胞やiPS細胞)は、未分化性を維持し無限に自己複製でき、全ての細胞種に分化可能なため、細胞移植治療や創薬、疾患研究への利用が期待されている。大量の細胞が必要となるこれらの応用利用を安全に安価で行うために、その培養からタンパク質等の動物由来成分を排除した完全化学合成培養システムが望まれている。しかし、ヒトES/iPS細胞の維持には成長因子FGFとTGF β 、細胞外基質ピトロネクチンやラミニン等のタンパク質が必要とされ、これらタンパク質を置換可能な化合物が無く、そのシグナル経路も殆ど解明されていないことは、完全合成培養システムの開発の大きな妨げとなっていた。

我々は、WntシグナルがヒトES細胞の増殖促進と分化誘導の両方に作用することを発見し(Hasegawa K. *et al.* Stem Cells, 2007)、これを制御できればWntによってヒトES細胞を自己複製可能と考え、Wntシグナル経路のカテニンと転写補助因子(p300/CBP)の結合バランスによる運命決定の仮説を立てた。この仮説に基づき低分子化合物スクリーニングを行い、Wntによる分化誘導のみを阻害できる化合物ID-8を得た。また、ID-8がDYRKの特異的阻害剤であることを見出し、ID-8とWnt3を組み合わせることにより、FGF/TGF非依存でWnt/ID-8依存の培養システムを開発した(Hasegawa K. *et al.* Stem Cells Translational Medicine, 2012)。しかし、この培養システムでのヒトES/iPS細胞の増殖は遅いこと、Wntタンパク質は培養細胞から精製する必要があり高価であること等の問題があり、さらなる未分化性維持機構の解明と、それによる培養システムの発展が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞(ES細胞やiPS細胞)の自己複製の制御機構を解明し、完全化学合成培養システムを開発することを目的とした。

ヒトES/iPS細胞の自己複製について、必要な成長因子や転写因子、エピジェネティック制御については多く報告されているものの、細胞内シグナル伝達については殆ど報告がない。我々は、化合物を使用することで、成長因子非依存的にヒトES/iPS細胞の自己複製が可能であることを見出していた。これを利用し、これまでの成長因子依存的な自己複製と比較することで、ヒトES/iPS細胞の自己複製における細胞内シグナル経路とその機構の解明、ならびにシグナルを制御可能な化合物を用いた化学合成培養システムの開発を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

本研究の目的は、ヒトES/iPS細胞の自己

複製におけるシグナル経路の解明と、合成培養システムの開発である。これを達成するため、以下の方法を用いた。

(1) Wnt/ID-8 依存的培養システムと TGF/FGF 依存的培養システムで培養した細胞を用い、Wntシグナル経路やDYRKシグナル経路で制御される分子の発現およびリン酸化、局在の比較、網羅的遺伝子発現解析による自己複製関連遺伝子群の変化の解析を行った。

(2) 上記の解析で得られた予想される自己複製シグナル経路について、制御可能な小分子化合物を収集し、自己複製における機能の同定

(3) 高価の見られた低分子化合物群の組合せを検討し新規培地の開発

(4) 開発した培地と様々な基質や継代法を組合せて検討し新規培養システムの開発

(5) 開発した培養システムで複数株のヒトES/iPS細胞を長期培養し、安定性と増殖性、未分化性の確認

(6) 開発した培養システムを用いたヒトiPS細胞の作成の確認

(7) 開発した培養システムで培養した細胞が既存の分化誘導方法に対応可能か確認

4. 研究成果

我々の予測に反して、網羅的遺伝子発現解析では、既知の自己複製に関わる分子や、発生や分化、細胞増殖等に関わる分子の遺伝子の発現に大きな変動は見られなかった(Ikeda T. & Hasegawa K. The Chemical Times, 2016)。一方で、糖代謝に違いが見られたため、培地基礎成分の改変を行った。

ID-8の作用機序として、Wntシグナルの下流のp300/カテニン複合体形成を間接的な阻害が分かっていたため、明らかにしていたため、p300/カテニン複合体形成を直接阻害可能な化合物YH249/250を検討したところ、ID-8の方が自己複製効果が高いことがわかった(Higuchi Y. *et al.* Current Molecular Pharmacology 2016)。ID-8の更なる解析から、DYRK群の中でもDYRK1A/Bを阻害することで、主に神経分化誘導が抑制されることを見出した。また、DYRKの阻害によりNFATcファミリータンパク質の発現上昇、リン酸化の促進および核内への蓄積が増加すること、NFATc経路の阻害により、いくつかの細胞株では増殖が促進されることも見出した。

様々なアミノ酸や糖類、脂質、シグナル阻害剤等の単独および組合せ検討を繰り返し、改良を重ね、1-AzaKenpaullone (Wntシグナルを活性化するGSK3市街剤)、ID-8 (DYRK1A/B阻害剤)、Tacrolimus (Calcineurin/NFATc阻害剤)を組合せた完全合成培地(AKIT培地)を完成させた。

AKIT培地は、細胞株によっては他の培養システムに比べて若干遅く、Tacrolimusの濃度調整が必要であること等、市販培地として

は改良が必要な点もあったが、用いているタンパク質が既存のどの培地より少なく安価で安定した培地であるため、AKIT 培地を用いて培養システムの開発を行うこととした。

AKIT 培地と、様々な基質タンパク質・ペプチドやポリマー、継代溶液・方法の組合せを組合せ、浮遊培養システムと接着培養システムの研究開発を行った。浮遊培養については、我々が開発していた浮遊培養法(Otsuji TG. *et al.* Stem Cell Reports, 2014)と AKIT 培地との組合せでは Tacrolimus による増殖促進効果が見られず、システム開発を中断した。一方で、接着培養システムでは、基質としてラミニン 511-E8 断片、継代法として高浸透圧クエン酸ナトリウム溶液が最も良いことを見出し、接着培養での AKIT 培養システムを完成させた

開発した AKIT 培養システムは、用いた全ての細胞株(5ES 細胞株と 3iPS 細胞株)を長期に拡大培養可能であった。これらの細胞では、未分化性維持や分化能も保たれており、ゲノムの安定性も他の培養システムと優劣無いことを確認できた。また、既存の iPS 細胞作成法や分化誘導法への使用にも問題がなく使用できることも確認できた。

本研究で得られた知見やデータ、開発した培養システムは、最終年度 3 月に論文として発表した (Yasuda S. *et al.* Nature Biomedical Engineering, 2018)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Shin-ya Yasuda, Tatsuhiko Ikeda, Hosein Shahsavarani, Noriko Yoshida, Bhavana Nayer, Motoki Hino¹, Neha Vartak-Sharma, Hirofumi Suemori, Kouichi Hasegawa

“Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells”

Nature Biomedical Engineering, 2018. 2(3) 173–182, DOI:

査読有

(2) Li Liu, Ken-ichiro Kamei, Momoko Yoshioka, Minako Nakajima, Junjun Li, Nanae Fujimoto, Shiho Terada, Yumie Tokunaga, Yoshie Koyama, Hideki Sato, Kouichi Hasegawa, Norio Nakatsuji, Yong Chen

“Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells”

Biomaterials, 2017, 124, 47-54, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.039

査読有

(3) Yusuke Higuchi, Cu Nguyen, Shin-ya Yasuda, Michael McMillan, Kouichi Hasegawa, Michael Kahn

“Specific Direct Small Molecule p300/β-Catenin Antagonists Maintain Stem Cell Potency”

Current Molecular Pharmacology, 2016, 9(3) 272-279, DOI:

10.2174/1874467208666150526155146

査読有

(4) 池田達彦、長谷川光一

「応用利用に向けた低分子化合物によるヒト iPS 細胞の培養」

The Chemical Times, 2016, 241(3), 7-11. WEB:

https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/backno8_pdf21.pdf

査読無

(5) Mark Denham, Kouichi Hasegawa, Trevelyan Menheniott, Ben Rollo, Dongcheng Zhang, Shelley Hough, Abdullah Alshawaf, Fabia Febbraro, Samiramis Ighaniyan, Jessie Leung, David Elliott, Donald F Newgreen, Martin F Pera, Mirella Dottori

“Multipotent caudal neural progenitors derived from human pluripotent stem cells that give rise to lineages of the central and peripheral nervous system”

Stem Cells, 2015, 33(6) 1759-1770. DOI: 10.1002/stem.1991

査読有

[学会発表] (計 12 件)

(1) Kouichi Hasegawa

“Chemical Control of Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal”

The SPIRITS International Symposium 2018, Multidisciplinary Approaches for Cell Control (2018)

(2) Kouichi Hasegawa

“Technological innovation of human iPS cell mass production and disease modeling” International Seminar on Recent Biochemical Approaches in Therapeutics (RBAT-IV) (2018)

(3) 長谷川光一

「化合物によるヒト多能性幹細胞の未分化制御」

第 22 回 関西大学先端科学技術シンポジウム (2018)

(4) Kouichi Hasegawa

“New State of Pluripotency of Human Pluripotent Stem Cell”

International Conference on Science and Technology: Future Challenges and solutions (STFCS-2016) (2016)

(5) Kouichi Hasegawa, Noriko Yoshida, Nami Asari, Tatsuhiko Ikeda, Hosein Shahsavarani, Shin-ya Yasuda,, Neha Vartak-Sharma
"Human iPS/ES cell self-renewal under growth factor- and ECM-free condition"
The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 14th Annual Meeting (2016)

(6) Shin-ya Yasuda, Tatsuhiko Ikeda, Noriko Yoshida, Nami Asari, Hosein Shahsavarani, Yuriko Manabe, Atsuko Ueda, Bhavana Nayer, Othmar Korn, Rowland Mosbergen, Christine Wells, Neha Vartak, Kouichi Hasegawa
"Growth Factor-free, Chemically-defined Culture System for Maintenance and Derivation of Human Pluripotent Stem Cells"
CiRA-ISSCR international symposium 2016 (2016)

(7) Noriko Yoshida, Shin-ya Yasuda, Nami Asari, Kouichi Hasegawa
"Growth factor- and ECM-free defined culture system for human iPS/ES cell expansion"
The 2015 American Society of Cell Biology (ASCB) meeting (2015)

(8) Kouichi Hasegawa
"Growth Factor-free defined culture system for human pluripotent stem cells"
World Stem Cell Summit 2015 (2015)

(9) Noriko Yoshida, Shin-ya Yasuda, Nami Asari, Kouichi Hasegawa
"Growth factor- and ECM-free defined culture system for human iPS/ES cell expansion"
2015 Combined Australian Society of Stem Cell Research (ASSCR) and Stem Cells Australia (SCA) meeting (2015)

(10) Kouichi Hasegawa
"Understanding and Controlling Pluripotent Stem Cell Self-Renewal and Differentiation"
International Conference on Contemporary Advances of Science and Technology (IC-CAST 2015) (2015)

(11) 長谷川光一
「ヒト多能性幹細胞の自己複製メカニズムの解明と合成培養系の開発」

第5回細胞再生医療研究会 (2015)

1(2) Kouichi Hasegawa
"Understanding and Controlling Pluripotent Stem Cell Self-Renewal and Differentiation"
DANDRITE Topical Seminar, Aarhus University (2015)

〔その他〕
アウトリーチ活動
(1) iCeMS Science Festival 2017 (2017)
<https://www.youtube.com/watch?v=NO4CzJWBx1I>

(2) 長谷川光一
「で、どうなん iPS 細胞って実際? -将来に向けて今、iPS 細胞/ES 細胞でできること-」
出雲高校 iCeMS 訪問 (2017)

(3) Kouichi Hasegawa
"Introduction of Studying in Japan"
IJAA 2017, Goa, India (2017)

(4) 長谷川光一、長谷川グループ
「無限の可能性を保つ - 暴れん坊細胞を躰ける! -」
iCeMS サイエンスカフェ (2017)
<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/ja/news/3163>

報道関連

(1) 「低価格の iPS / ES 細胞の培養方法の開発に成功 - 化合物を用いた合成培地 -」
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/180306_1.html
テレビ: NHK、ABC、関西テレビ
新聞社: 日本経済新聞、産経新聞、毎日新聞、読売新聞、京都新聞など
通信社: 時事通信、共同通信

6. 研究組織

(1) 研究代表者
長谷川 光一 (Kouichi Hasegawa)
京都大学高等研究院(KUIAS)物質・細胞統合システム拠点(iCeMS)・特定拠点講師
研究者番号: 50378890

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
Martin F Pera (ペラ F マーチン)
The Jackson Laboratory・Professor

Michael Kahn (カーン マイケル)
Department of Molecular Medicine, City
of Hope • Professor

Jun Wu (ウー ジュン)
Department of Molecular Biology, UT
Southwestern • Assistant Professor