

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16319

研究課題名(和文)再プログラム化技術による人工細胞ファイバーの作製

研究課題名(英文) Generation of beta-cell graft using somatic reprogramming and cell fiber technology

研究代表者

長田 翔伍 (Nagata, Shogo)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：40751441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ流体デバイスを用いて形成されるコアシェル型細胞ファイバーを細胞培養・移植一体型デバイスとして応用することを目的に、ファイバー内での細胞培養と細胞特性評価、および細胞ファイバーの移植技術の研究を実施した。

アルギン酸ゲルをシェルとし、コアのファイバー状空間内でヒト線維芽細胞およびiPS細胞の新規三次元培養系を確立した。その三次元空間内における細胞周辺環境を最適化することで、特に線維芽細胞においては若返り(rejuvenation)が可能であることを示した。さらに、細胞ファイバーを特定の分化誘導培地で培養することで、ファイバー内で細胞運命制御が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： I researched on cell culture / transplant integrated device using cell fiber technology. The culture conditions and characteristics of cells encapsulated in the fibers were evaluated in order to apply the core-shell microfiber technology for transplantable graft.

A novel three dimensional (3D) culture system of human fibroblasts and iPS cells was established by the core-shell microfibers, in which those cells could survive and expand within the fibrous core regions. We showed that it was possible for induction of rejuvenation especially in fibroblasts by optimizing the microenvironment in the 3D space. Furthermore, it was clarified that cell fate control is possible within the fiber by culturing the cell fiber in a specific differentiation induction medium.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞ファイバー 三次元培養 移植 再生医療

1. 研究開始当初の背景

再プログラム化とは、ある系譜の細胞を別の系譜の細胞に人為的に変化させること、まさに「細胞運命の転換」とも言える現象である(1)。代表的な例には、体細胞に特定の転写因子を強制発現させることによる人工多能性幹(iPS)細胞誘導が挙げられる。2007年のヒトiPS細胞の報告以来、患者個人の体細胞からiPS細胞を作製し、その後目的の細胞へと再び分化させ移植するという、再プログラム化技術に基づく全く新たな再生医療の可能性に注目が集まってきた。しかしながら、iPS細胞自体の品質管理基準の選定や、分化後の移植細胞の腫瘍化リスクなど、臨床応用に向けて解決すべき問題も多く残っている。近年、特定の遺伝子導入や低分子化合物および成長因子の添加による培養条件の変更により、体細胞がiPS細胞状態を経ることなく、別の系譜の細胞に再プログラム化されることが明らかとなってきた。それは、iPS細胞を用いないさらに新たな再生医療の姿を提示している。

このような再生医療の対象疾患の中でも、I型糖尿病は、インスリン産生細胞という単一細胞種の移植により患者の生活の質(QOL)が改善することが期待されることから、特に優先順位の高い位置にある疾患である。I型糖尿病患者への他家膵島細胞移植はすでに臨床応用されており、患者のQOLを改善・維持することが知られている。しかし、移植ドナーの不足や、移植膵島細胞への拒絶反応や細胞機能の失活など、社会的にも医学的にも多くの問題が未解決のままである。

当研究室では細胞のファイバー化技術を開発しており、アルギン酸ナトリウムに塩化カルシウムを反応させることで外殻を形成させ、その内腔に細胞外基質と共に細胞を封入することで細胞ファイバーを作製している(図1)。この細胞ファイバーを新たな移植

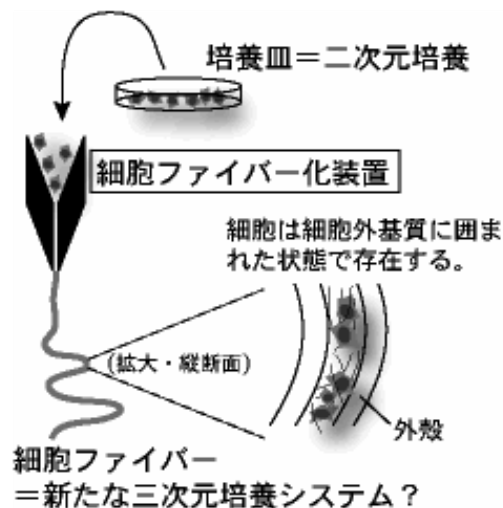


図1. 細胞ファイバーによる三次元培養

デバイスとして用いることも検討してきた(2)。しかしながら、実際のI型糖尿病の再生医療実現には、どのように移植用インスリン産生細胞を調達するのか、また、どのような形で移植することが細胞の生存および機能に最適なのかという大きな問題を同時に解決していく必要がある。

2. 研究の目的

人工多能性幹(iPS)細胞誘導に代表される再プログラム化技術の疾患治療への応用が期待されている。I型糖尿病も対象疾患の一つであるものの、患者の体細胞からいかに安全かつ効率的にβ細胞様インスリン産生細胞を作製するのか、またいかに効果的な形で移植を行なうのかについて、未だ確立された方法はなく、世界中で最適な方法を模索する研究が行なわれている。

本研究では、当研究室が開発してきた細胞のファイバー化技術に再プログラム化技術を応用し、ファイバー状にしたヒト体細胞から、iPS細胞状態を経ることなく、人工β細胞ファイバーを作製することを目的とした。すなわち、細胞ファイバーを培養-移植一体型デバイスとして用いる全く新しい再生・移植治療モデルを提唱する学術的・社会的に意義の大きな研究である。

3. 研究の方法

体細胞ファイバーから、再プログラム化を通して効率的かつ高品質なβ細胞様インスリン産生細胞を作製するために、3次元培養条件下における、ヒト線維芽細胞培養の最適化を行う。指標として、線維芽細胞による細胞外マトリクスのリモデリング関連遺伝子発現を用いて、様々な条件でのヒト線維芽細胞ファイバーを評価する。

ファイバー内でリプログラミングを推進することが可能かどうかを判断するために、ヒトiPS細胞ファイバーを作製し、特定の分化誘導に反応して、ファイバー内で任意の細胞系譜に分化可能であることを示す。それら技術を併せることで、リプログラミングに適した線維芽細胞を膵β細胞系譜にリプログラミングを誘導する。

4. 研究成果

アルギン酸ゲルをシェルとし、コアのファイバー状三次元空間内でヒト線維芽細胞の新規三次元培養系を確立した(図2)。その三次元空間内に任意の細胞外マトリクスを添加すること、あるいは細胞密度を調整することで、線維芽細胞の細胞特性が変化することを見出した。様々な細胞密度と細胞外マトリクスの組み合わせについて検討することで、線維芽細胞特性が最も高くなる条件を明らかにし、三次元培養環境の制御により線維芽細胞の若返り(rejuvenation)が可能であることを示した。結果は、図3で示すように、

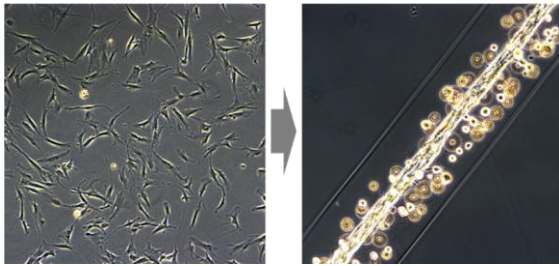


図2. ヒト線維芽細胞ファイバー培養の確立

高密度な環境でフィブリンが存在すると、I型コラーゲンの産生および分解機構が活性化し、細胞外マトリクスのリモデリングが盛んになった。また、三次元培養環境下において、III型コラーゲンの発現がI型コラーゲンのパターンと異なることを見出し、三次元培養線維芽細胞のリプログラミング時の検討項目になることが示唆された。

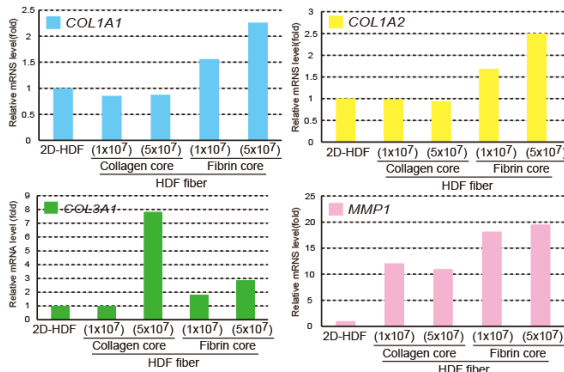


図3. 細胞密度と細胞外マトリクス条件による線維芽細胞ファイバーの特性変化。

次に、ファイバー内にカプセル化された細胞を任意の細胞系譜に分化可能であることを示すために、ヒト多能性幹細胞であるiPS細胞のカプセル化を行った。線維芽細胞と同様のマイクロ流体デバイスを用いることで、アルギン酸ゲルから成るシェルに囲まれたコ



図4. ヒトiPS細胞ファイバー培養の確立

ア領域にカプセル化することができ、また細胞増殖によりファイバー状の細胞凝集塊を形成することが明らかとなった。さらに、神経系などの外胚葉分化誘導培地、および膵β細胞や肝細胞に分化していく中内胚葉分化誘導培地で培養することで、細胞形態を維持したまま、それぞれの細胞系譜に分化することを見出した(図4)。遺伝子発現解析による詳細な細胞特性評価からも、それぞれの細胞系譜マーカー遺伝子に発現が誘導されていることが分かり(図5)、このように細胞ファイバー技術によりシェル内にカプセル化された細胞でも、任意の細胞系譜へ誘導可能であることが分かった。

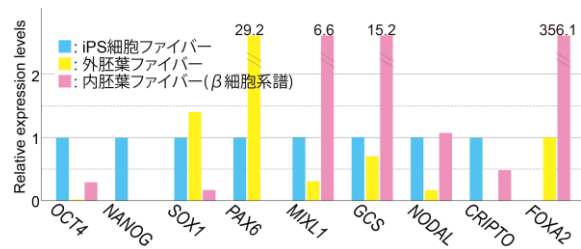


図5. 分化誘導前後での、iPS細胞マーカー、外胚葉マーカー、中内胚葉マーカー遺伝子の発現プロファイル。

以上のことから、細胞ファイバ技術は、三次元空間および細胞培養環境の最適化により、その内部で効率的に細胞運命の制御、リプログラミングが可能であることが示された。今後は、成熟した機能的膵β細胞へまで分化を進めることで、糖尿病治療のための細胞培養/移植一体型デバイスとして利用可能であることを示す必要がある。

<引用文献>

- ① J Cell Sci. 2012 Jun 1;125(Pt 11):2553-60.)
- ② Nat Mater. 2013 Jun;12(6):584-90.

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 0件)

[学会発表] (計 2件)

- THREE-DIMENSIONAL DIFFERENTIATION OF HUMAN iPS CELLS THROUGH CORE-SHELL HYDROGEL MICROFIBER., Nagata S., Ikeda

- K., Takeuchi S., *MEMS2016*, 2016, 中国.
- Rejuvenation of human dermal fibroblasts through 3D culture in a core-shell microfiber., Nagata S., Okitsu T., Ikeda K., Takeuchi S., *MicroTAS2015*, 2015, 韓国.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田翔伍 (NAGATA, Shogo)  
東京大学・生産技術研究所・特任研究員  
研究者番号：40751441

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

竹内昌治 (TAKEUCHI, Shoji)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号：90343110