

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14063

研究課題名（和文）複合物理刺激を利用した革新的ヒトiPS細胞培養プロセス創出に関する基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on the creation of innovative human iPS cell culture processes using complex physical stimulation.

研究代表者

堀江 正信（Horie, Masanobu）

京都大学・環境安全保健機構・助教

研究者番号：60727014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞の挙動を制御するための安価な軟培養面の作成に成功し、未分化維持に用いられる高価なサイトカインを添加することなく、培養面の硬さの制御のみによって、ヒトiPS細胞の未分化維持培養ができることを明らかにした。

培養面の硬さおよびECM依存的に、マウス骨格筋芽細胞の自己組織化が誘導されることを明らかにし、ゲルやスキャホールドなどの足場を用いることなく、収縮する人工骨格筋細胞の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物理刺激のみによってヒトiPS細胞の未分化維持培養ができれば、現在高コストが実用化障壁の1つになっているヒトiPS細胞を用いた細胞治療のための、新たな培養プロセス開発の一助となる。

また、自己組織化を効率的に誘導するプロセスを開発したことによって、より生体内の状態に近い人工骨格筋組織を誘導することができ、世界的な動物実験に対する風当たりの中において、新たな創薬等の研究開発のためのツールとなり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in creating an inexpensive soft culture surface for controlling the behavior of human iPS cells. It was clarified that undifferentiated maintenance culture of human iPS cells can be performed only by controlling the hardness of the culture surface without adding expensive cytokines used for maintenance of undifferentiation.

It was clarified that the self-organization of mouse skeletal myoblasts is induced depending on the hardness of the culture surface and ECM. Furthermore, we succeeded in constructing contracting artificial skeletal muscle cells without using scaffolding such as gel or scaffold.

研究分野：生物化学工学

キーワード：メカノバイオロジー ヒトiPS細胞 ティッシュエンジニアリング 自己組織化 骨格筋 培養プロセス
生物化学工学 大量培養

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体内において、細胞は多様な物理刺激を常に受けている。例えば血流によって、血管内皮細胞には剪断応力刺激が負荷される。呼吸によって、肺細胞には伸展刺激が負荷される。細胞はこれら多様な物理刺激を生化学的なシグナルへと変換して細胞内に伝達し、それに対して応答する(メカトランスダクション)。細胞は物理刺激に応答することで、本来の機能を維持していることが徐々に明らかになってきている。申請者らはこの物理刺激を、再生医療の細胞源として期待されているヒト iPS 細胞の培養プロセスに応用すべく、ヒト iPS 細胞の増殖と遺伝子発現が培養面の硬さ依存的に変化することを見出し、報告してきていた(図1)。さらに申請者らは攪拌懸濁バイオリアクターを用いた培養プロセス開発において、流れよる剪断刺激がヒト iPS 細胞の遺伝子発現に影響を与えることを示す知見も得ている。現在、ヒト iPS 細胞を目的の細胞へ分化誘導するためには、多くの添加薬剤を適切なタイミングで添加することによって行われているが、コストの高さが問題になってくるため、物理刺激のみによって細胞挙動を操ることは細胞製造プロセスに有用であると考えた。

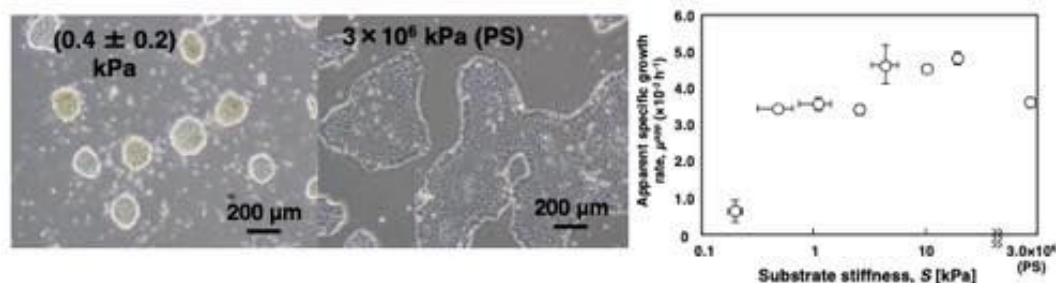


図1 培養面硬さ依存的なヒト iPS 細胞増殖変化

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞を用いた研究の驚異的な進歩により、様々な分化誘導手法が報告されているが、物理刺激のみで目的細胞まで分化誘導する一連の技術は確立されていない。本研究では、物理刺激を用いてヒト iPS 細胞の挙動を制御する手法を開発することを到達目標とする。

3. 研究の方法

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究ではヒト iPS 細胞やマウス骨格筋芽細胞が培養面の ECM や硬さに対してどのような応答をするのかを評価するために、様々な ECM や硬さの培養面上でそれぞれの細胞を培養して、その応答を明らかにする。また硬さを变化させた培養面は、ECM タンパク質を吸着させるための官能基を培養面上に導入するために Sulfo-SANPAH と呼ばれる試薬を用いており、非常にコストが効果になっている。そこでタンパク質架橋剤として Sulfo-SANPAH でなく、NHS-acrylamide ester を用いた新しいポリアクリルアミドゲル培養系を構築する。

4. 研究成果

これまでヒト iPS 細胞が硬さ依存的に増殖を变化させることは明らかにしていた、次に未分化維持において、培養面の硬さが細胞挙動に与える影響を評価した。さまざまな硬さの培養面上において、ヒト iPS 細胞の未分化維持に必須のサイトカインである bFGF を添加することなく培養を行った。その結果、より軟らかい培養面で培養した場合において、未分化性が維持されている

ことが明らかとなり、足場の硬さ依存的にサイトカインに依存しない未分化維持が成されていることが明らかとなった（図2）。

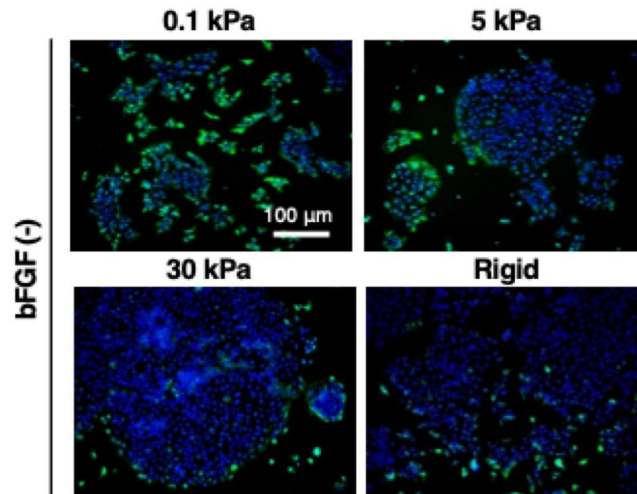


図2 培養面硬さ依存的なヒト iPS 細胞の未分化維持

ポリアクリルアミドを用いた安価な軟培養面作成のために、N-ヒドロキシこはく酸イミドアクリルアミドを用いて軟培養面を作成し、ECMの吸着および細胞培養に使用できるかどうかの評価を行った。その結果、ECMの吸着（図3左）および細胞の増殖を確認でき、Sulfo-SANPAHを用いた時と同様に、細胞の伸展に変化も確認できた（図3右）。よって Sulfo-SANPAH を用いることなく、安価な軟培養面を作成することができたと考えている。

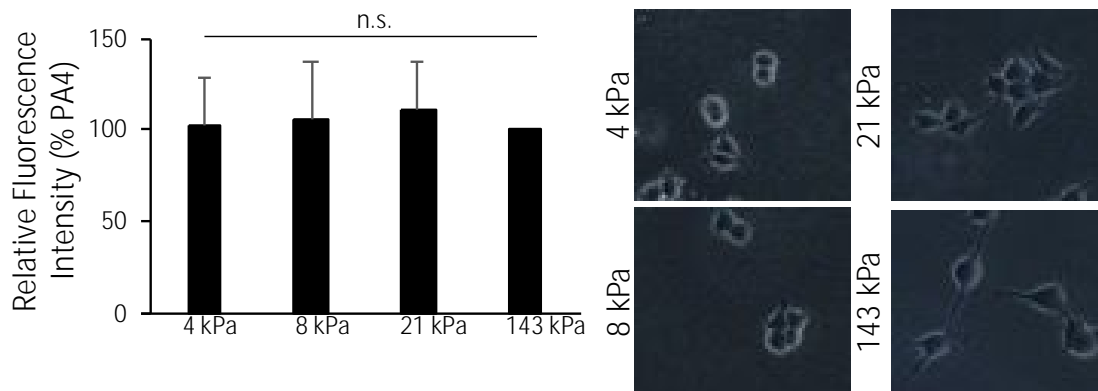


図3 N-ヒドロキシこはく酸イミドアクリルアミドを用いた新規軟培養面

さらに様々な硬さの培養面において、マウス筋芽細胞を用いて挙動の変化を評価した。ヒト iPS 細胞の筋分化に対する評価は未達であるが、予備的に行ったマウス筋芽細胞群が培養面の硬さ依存的に自己組織化することを見出した（図4）。またこの自己組織化は軟培養面上にコートするECMの種類によっても挙動が変化することが明らかとなった。これらのパラメーター全てを最適化することによって、マウス筋芽細胞の効率的な自己組織化を誘導し、骨格筋分化誘導を行うことによって、生体内と同様に電気刺激によって収縮する人工骨格筋組織を構築することに成功した。

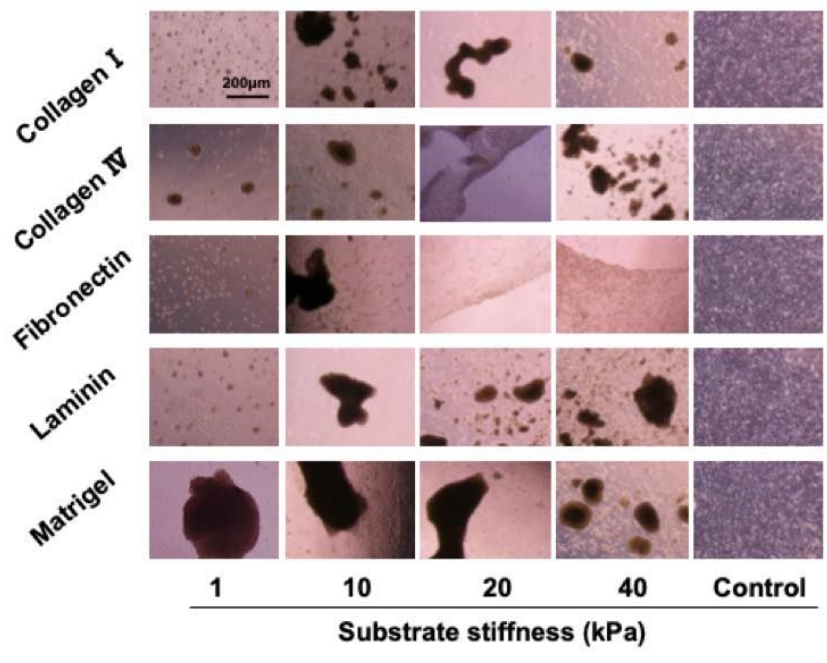


図 4 軟培養面を用いて誘導した人工骨格筋組織

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ran Ding, Masanobu Horie, Sumire Nagasaka, Saki Ohsumi, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda, Eiji Nagamori, Hideaki Fujita, Takuo Kawamoto	4. 巻 In press
2. 論文標題 The effect of cell-extracellular matrix interaction on myogenic characteristics and artificial skeletal muscle tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Madhu Malinee, Alok Kumar, Takuya Hidaka, Masanobu Horie, Kouichi Hasegawa, Ganesh N Pandian, Hiroshi Sugiyama	4. 巻 28
2. 論文標題 Targeted suppression of metastasis regulatory transcription factor SOX2 in various cancer cell lines using a sequence-specific designer pyrrole-imidazole polyamide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2019.115248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Brit Gracy David, Hideaki Fujita, Kazuko Okamoto, Masanobu Horie, Yulia Panina, Taro Ichimura, Yasushi Okada, Tomonobu M, Watanabe	4. 巻 41
2. 論文標題 Linking substrate and nucleus via actin cytoskeleton in pluripotency maintenance of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STEM CELL RESEARCH	6. 最初と最後の頁 101614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2019.101614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gantumur, Enkhtuul, Kimura, Miyu, Taya, Masahito, Horie, Masanobu, Nakamura, Makoto, Sakai, Shinji	4. 巻 12
2. 論文標題 Inkjet micropatterning through horseradish peroxidase-mediated hydrogelation for controlled cell immobilization and microtissue fabrication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 11001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1758-5090/ab3b3c.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masanobu Horie
2. 発表標題 Substrate stiffness dependent growth properties of human iPS cells
3. 学会等名 Termi-AP 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanobu Horie
2. 発表標題 高効率ヒトiPS細胞由来骨格筋細胞誘導および組織構築プロセスの開発
3. 学会等名 JAACT2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ran Ding
2. 発表標題 Self-organization of mouse myoblast cells mediated by soft substrates and improvement of myotube formations in artificial skeletal muscle
3. 学会等名 Termi-AP 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉開太一、井藤彰、池田一史、吉岡貫太郎、堀江 正信、櫻井英俊、堀田秋津、河邊佳典、上平正道
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の筋分化誘導条件の検討
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gantumur Enkhtuul、木村美夢、堀江正信、境慎司、中畑雅樹、田谷正仁
2. 発表標題 複数素材が適用可能なインクジェット式バイオプリンターを利用した細胞パターンニングの構築
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉開太一、井藤彰、池田一史、吉岡貫太郎、堀江正信、河邊佳典、上平正道
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来筋芽細胞の高機能分化誘導法の開発
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丁然、堀江正信、川本卓男
2. 発表標題 自己組織化現象を用いた人工骨格筋組織の構築
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanobu Horie
2. 発表標題 Substrate stiffness dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 Biotechnology Towards Next generation single Cell Analysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀江正信、櫻井英俊	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー	5. 総ページ数 in press
3. 書名 骨格筋社会を核とした筋スマート社会	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学教育研究活動データベース https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/oL4aF 京都大学教育研究活動データベース https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/oL4aF

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------