

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19242

研究課題名（和文）マイクロパターン培養系を用いたヒト初期発生の統合的理解と疾患研究への展開

研究課題名（英文）Integrated approach for analysis of early human development using micropattern culture system and its application to disease research

研究代表者

阿部 訓也（Abe, Kuniya）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー

研究者番号：40240915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、（1）ヒト初期発生の重要な局面である三胚葉形成過程を理解するため、ヒトiPS細胞のマイクロパターン培養系を用いた再現性・同調性の高い細胞分化解析プラットフォームを確立し、健康人由来の複数のiPS細胞株について、時系列に沿った細胞分化プロセスおよび、遺伝子発現の変動を明らかにした。（2）上記の技術を応用し、多数のiPS細胞株それぞれの分化能を画像データを基にして簡便・迅速に検定する手法を確立し、健康人由来の細胞株間においても分化パターンに差異があること、またそれらは数種のパターンに分類出来ることを示した。（3）シングルセル解析を効率良く実施するためのサンプル多重化技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、多数のiPS細胞株の分化能を高速、高効率に評価することが可能な標準化技術を確立した。マイクロパターン培養を用いたこの評価系では、3胚葉形成の進行が非常に再現性高く、同調的に進行することを見出し、この特性により各細胞株の分化特性の違いを定量的に評価することが可能となった。これまで、分化能特性は定性的な評価しか出来なかったが、今回、定量的データを取得することが可能になったことは高い学術的意義を持つ。また、本手法により、既に整備されている膨大なiPS資源の有効な利活用が可能になり、ヒトに係わる生物医学研究を大変革する可能性が高く、挑戦的研究として高い社会的意義を持つものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a highly reproducible and synchronous cell differentiation analysis platform using a micropatterned human iPS cell culture system to understand the process leading to three germ layer formation, an important aspect of early human development, and clarified the cell differentiation process and gene expression changes along the time series of multiple iPS cell lines derived from healthy individuals. We have established a simple and rapid method to test the differentiation potential of multiple iPS cell lines based on image data, and have shown that there are differences in differentiation patterns among cell lines, and that these patterns can be classified into several types. To facilitate the single cell gene expression analysis, novel sample multiplexing method has been established.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：ヒトiPS細胞 ヒト初期発生 細胞分化 分化特性 バイオリソース シングルセル解析 画像解析 AI

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ライフサイエンス分野では、ヒト基礎生物学および医療応用を視野に入れた研究が精力的に展開されている。しかし、ヒト生体自体を用いる研究には当然ながら限界があり、培養細胞などを用いて生体内事象を模倣した実験系の確立とその利用が必須である。哺乳類の発生プロセスは胎内で進行し、かつ胚体という多細胞構造の中で進行するため、その実態を多角的、定量的に解析するのは技術的に非常に困難である。特にヒトの場合は、材料取得の限界や、個体間の遺伝的差異等により標準化された知見を得ることが難しい。一方、ヒト ES 細胞や iPS 細胞は全世界で多数樹立されており、各国のリソースセンターには既に非常に多くの iPS 細胞株が収集、保存されているが、その性状解析、特に iPS の特徴である多分化能の検定がボトルネックとなり、未だ十分な活用が為されていないのが現状である。多分化能の検定は、従来、試験管内での胚様体形成や幹細胞をマウス個体に移植し、個体中でテラトーマを形成させ、その組織学的解析を実施する、などの方法が用いられてきたが、いずれの方法も長時間を要し、かつ細胞分化の同調性、再現性が低いために、各細胞株に固有の分化特性（分化の傾向）を把握するのは困難であった。

### 2. 研究の目的

上記の背景からわかるように、ヒト生物学およびヒト疾患研究のための有用かつ膨大な研究資源である iPS 細胞株を利活用するためには、それらの株の分化能特性を迅速に効率良く、定量的に評価する解析プラットフォームの確立が喫緊の課題である。本研究ではその解析プラットフォーム確立のための技術開発を行い、その性能を評価し、実際に健常人由来、疾患患者由来の複数の iPS 細胞株の分化特性を明らかにすることを第一義の目的とする。

### 3. 研究の方法

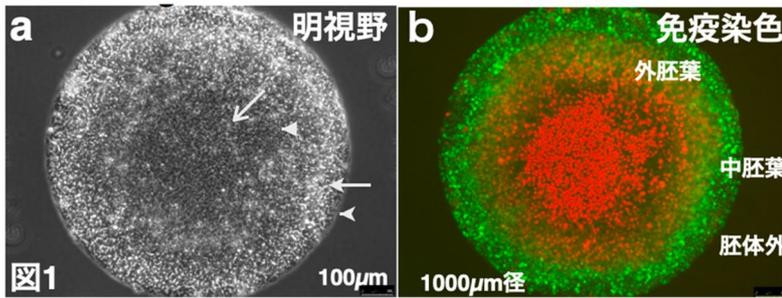
本研究では、マイクロパターン培養系を利用した分化系を用いた。今回用いたものはガラス基盤上に直径 1000um の円盤形状に培養基質をコートしたもので、細胞はこのマイクロパターン上でのみ、増殖・分化する。この基盤上にヒト iPS 細胞を播種し、BMP4 添加により、三胚葉形成を誘導し、48 時間後の時点で各胚葉のマーカに対する抗体染色を行い、各胚葉に分化した細胞を検出する。AI 技術を利用した解析法により、免疫染色像から各胚葉を構成する細胞の数、あるいは各胚葉が占める領域の面積を測定し、それぞれの分化細胞の定量を行なう。また 48 時間後に得られた細胞を基盤から解離し、細胞懸濁液を得て、その 1 細胞遺伝子発現解析を実施することにより、組織中に何種類の細胞がどれくらい存在するかを遺伝子レベルでも記述する。さらに、一部の株については、0h、24h、36h、48h の時系列サンプルを取得し、分化細胞クラスターの出現とその時系列に沿った挙動を明らかにする。発現解析からの知見をフィードバックし、時空間座標に沿った細胞系譜を同定すると共に、細胞分化に重要な遺伝子ネットワークを検索する。

### 4. 研究成果

#### マイクロ基盤上の細胞分化：同調性と再現性

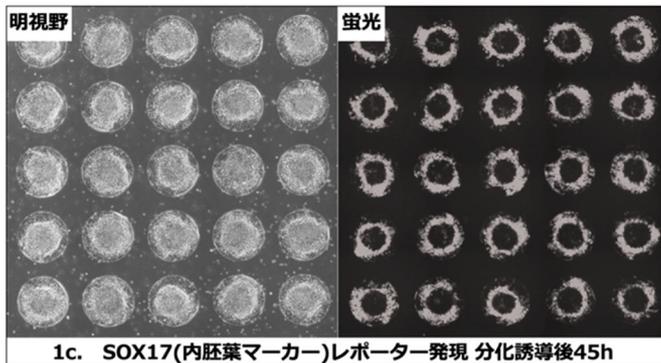
iPS 細胞を通常の培養ディッシュ中で分化誘導すると、不定形のコロニーの中で細胞分化がおき

るが、分化の進行は同調的ではなく、コロニーによって分化する細胞タイプも異なる場合がある。このような状態では、細胞株の分化特性を把握するのは困難である。

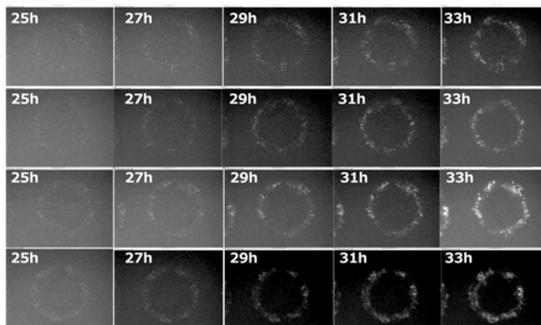


ヒト iPS 細胞をマイクロ基盤上で分化誘導すると、各胚葉の細胞は同心円上に配置された形の空間的分化パターンを形成した。この

分化パターンは、明視野像からもある程度把握されるが、SOX2 (外胚葉)、BRACHYURY (中胚葉)、SOX17 (内胚葉) の各分化マーカーに対する抗体染色によって明瞭に確認された (図 1 a, b)。この分化系では 3 次元的な細胞塊を形成する胚様体とは異なり、2 次元平面上で、ほぼ単層の状態



1c. SOX17(内胚葉マーカー)レポーター発現 分化誘導後45h



1 d. SOX17発現の時系列変化：多点のタイムラプス観察

空間的な進行を調べるために、内胚葉マーカーである SOX17 遺伝子座に赤色蛍光蛋白質遺伝子が挿入された iPS 細胞株をマイクロ基盤上で分化させその時間経過を観察した。今回用いた基盤上には 168 の円形マイクロパターンが載っているが、それぞれのパターン上でほぼ同時期(分化誘導開始後 25 時間)

に SOX17 レポーターの発現が認められ始め、誘導後 48 時間で同心円状の三胚葉パターンが形成された (図 1 c, d)。また各パターン上での異なる分化細胞の比率はよく類似していた。さらに、同一の細胞株を用いて分化誘導実験を繰り返した場合も、SOX17 レポーター発現が 25 時間前後ですべてのパターン上で認められ、

48 時間後の分化パターンについても初回と同様の結果を得た。これらの結果により、通常の培養系と大きく異なり、マイクロパターン上では細胞分化が非常に高い同調性を持って進行すること、またその時間経過や最終的に得られる分化パターンについても再現性が高いことが示された。したがって、この実験系により、特定の細胞株についてその株固有の分化特性を記すことが出来ると考えられた。

### 多数の細胞株の分化特性比較

以上のように、マイクロパターン上の分化パターン形成は、同調性、再現性とも非常に高いため、この技術を用いて、各細胞株に特徴的な分化傾向を定量的に表現することを試みた。健常人由来 iPS 細胞株 20 株を用いて、マイクロパターン上の三胚葉形成を行い、明視野画像、免疫染色画

像を基に AI を用いた画像解析ソフトウェアを用いて、誘導開始後 48 時間の時点での分化細胞タイプの判別を行ない、それぞれの胚葉領域を抽出し、その面積データを用いて各胚葉細胞の分化傾向を定量的に表現することとした。図 2 に 3 種の細胞株 A,B,C それぞれの 2 回の実験結果

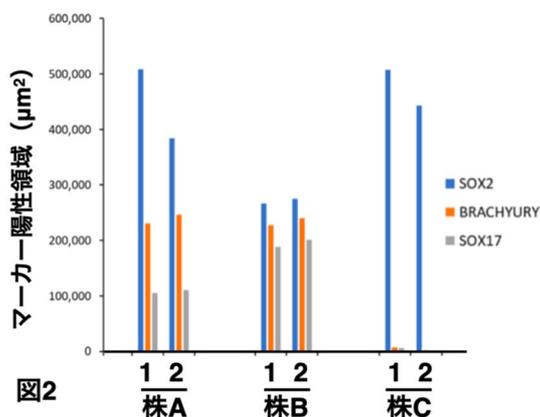


図2

を示す。いずれの場合も 2 回の実験結果はよく一致している、この実験系の再現性の高さが確認された。この 3 株はいずれも健常人由来の iPS 細胞であるが、その分化傾向はそれぞれ異なっており、細胞株固有の分化特性を示すことが明らかとなった。特に、細胞株 C では、SOX2 陽性細胞は認められるが、中胚葉系、内胚葉系の細胞分化はほぼ認められないという驚くべき結果が得られた。SOX2 は、未分化状態でも発現している分子なので、分化誘導後も未分化状態に留まっているため、このような結果が得られた可能性がある。シングルセル遺伝子発現解析の結果は、この可能性を支持しており、未分化状態にあるエピプラスト様の細胞に留まっていることが確認された。

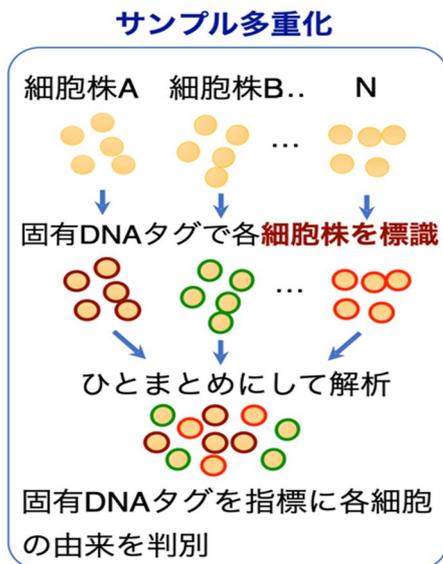
20 株調べた中で、このような株は株 C の他にも 1 株存在しており、遺伝子発現レベルでもよく類似したプロファイルを示すことが判明した。

以上のように免疫染色像から細胞株の分化傾向を定量的に表すことが出来るようになったので、その数値データを用いて、クラスター解析を行い、分化傾向を指標として、細胞株を分類することを試みた。その結果、複数の細胞株によって構成される 4 つのクラスターに分かれることが明らかとなった。このことは、分化パターンの違いは、全くランダムに生じているわけではなく、広い意味での分化誘導シグナルに対する反応性に数種類の違いがあるために、このような類似した分化傾向を持つ複数のグループに分けられたものと考えられた。

これらの結果は、健常人由来の細胞株であっても、今回用いた分化誘導系では、その分化傾向に差異を示し、いくつかの定型的パターンに分類出来る可能性を示唆している。今後、より多くの細胞株を解析することにより、健常人由来細胞株の細胞分化の(複数の)基準状態を規定出来る可能性があると考えられる。

### 多検体の解析を効率化するサンプル多重化新技術

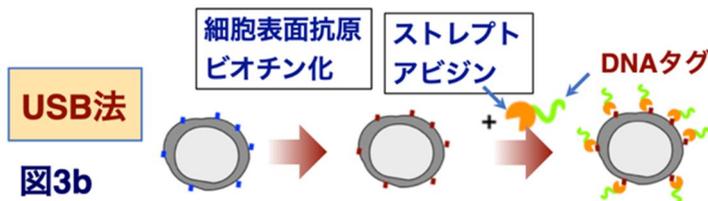
シングルセル解析は、その有用性にもかかわらず、技術的難度や実験コストなどの点で、未だ積極的に利用されていないのが現状である。本研究では、多数検体のシングルセル解析が必要になるため、効率良く、低コストで実施可能とする解析プラットフォームの構築を試みた。現有の単一細胞取得装置では、一度に 3 万個程度の細胞を取得することが出来るが、例えば 10 種類の異なるサンプルを一回のランで解析できれば、各サンプルから ~3000 個の細胞の情報を取得可能となるため、実験エラーやコストの低減が可能となる。多数のサンプルを一括に解析するためのサンプル調製技術が、サンプル多重化技術であり、図 3a にサンプル多重化の原理を示す。複数の細胞サンプルごとに固有の配列を持つバーコード DNA タグ (= ハッシュタグ) をあらかじめ付加した後、それらを混合して単一細胞解析に進み、得られた RNA-seq データ中にあるハッシュタグ DNA 配列に基づいて各細胞の由来を確定する。



**図3a エラーの低減、実験の効率化**

一般に、DNA タグの細胞への付加は、各細胞表面にある蛋白質に対する抗体を利用して行われる。しかし、この方法の問題点は、当該細胞表面タンパク質が検査サンプル中の全ての細胞で発現していることを前提としている点であり、実際はそのような各細胞に等しく発現している抗原、それに対する抗体を利用するのは困難であることが多い。そこで、我々は、特定の細胞表面タンパク質に依存しないユニバーサルな標識技術、Universal Surface Biotinylation (USB 法) を開発した(図 3b)。この手法では、細胞表面タンパク質のアミン基にビオチンを導入するため、これまでテストしたすべての細胞種で良好な標識結果が得られている。DNA タグ付きストレプトアビジンと組み合わせることで、各

細胞サンプルに特定の DNA タグを付加することが可能で、実際、従来の多重化法が適用できなかった細胞にも利用可能であった。USB 法は生物種や細胞種によらず、あらゆる種類の細胞に適用可能で、この手法を用いて、本研究における多数のヒト iPS 細胞株のシングルセル解析を比較的 low cost で実施することが出来た。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yokota Hideo, Abe Kuniya, Chang Yuan-Hsiang, Cho Dooseon, Tsai Ming- Dar, Huang Pin-Han	4. 巻 -
2. 論文標題 Visualization and quantitative analyses for mouse embryonic stem cell tracking by manipulating hierarchical data structures using time-lapse confocal microscopy images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/EMBC46164.2021.9629490	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 該当する
1. 著者名 Chu Slo-Li, Abe Kuniya, Yokota Hideo, Cho Dooseon, Chen Yuan-Hao, Tsai Ming-Dar	4. 巻 -
2. 論文標題 High Resolution U-Net for Quantitatively Analyzing Early Spatial Patterning of Human Induced Pluripotent Stem Cells on Micropatterns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/EMBC46164.2021.9630956	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 該当する
1. 著者名 Kamatani Takashi, Hagizawa Hiroki, Yarimitsu Seido, Morioka Miho, Koyamatsu Saeko, Sugimoto Michihiko, Kodama Joe, Yamane Junko, Ishiguro Hiroyuki, Shichino Shigeyuki, Abe Kuniya, Fujibuchi Wataru, Fujie Hiromichi, Kaito Takashi, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 284
2. 論文標題 Human iPS cell-derived cartilaginous tissue spatially and functionally replaces nucleus pulposus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 121491 ~ 121491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2022.121491	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 -
1. 著者名 Sugimoto Michihiko, Tada Yuhki, Shichino Shigeyuki, Koyamatsu Saeko, Tsumaki Noriyuki, Abe Kuniya	4. 巻 29
2. 論文標題 Universal Surface Biotinylation: a simple, versatile and cost-effective sample multiplexing method for single-cell RNA-seq analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsac017	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 -

1. 著者名 Wang Wenlong, Ito Tomohiro, Otsuka Satoshi, Nansai Hiroko, Abe Kuniya, Nakao Yoichi, Ohgane Jun, Yoneda Minoru, Sone Hideko	4. 巻 75
2. 論文標題 Epigenetic effects of insecticides on early differentiation of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology in Vitro	6. 最初と最後の頁 105174 ~ 105174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tiv.2021.105174	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 Otsuka Satoshi, Qin Xian-Yang, Wang Wenlong, Ito Tomohiro, Nansai Hiroko, Abe Kuniya, Fujibuchi Wataru, Nakao Yoichi, Sone Hideko	4. 巻 13
2. 論文標題 iGEM as a human iPS cell-based global epigenetic modulation detection assay provides throughput characterization of chemicals affecting DNA methylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-33729-4	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 -

1. 著者名 Chu Slo-Li, Sudo Kazuhiro, Abe Kuniya, Yokota Hideo, Nakamura Yukio, Liou Guan-Ting, Tsai Ming-Dar	4. 巻 -
2. 論文標題 Prediction of Human Induced Pluripotent Stem Cell Formation Based on Deep Learning Analyses Using Time-lapse Brightfield Microscopy Images	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/EMBC48229.2022.9871815	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 該当する

1. 著者名 Chu Slo-Li, Sudo Kazuhiro, Yokota Hideo, Abe Kuniya, Nakamura Yukio, Tsai Ming-Dar	4. 巻 229
2. 論文標題 Human induced pluripotent stem cell formation and morphology prediction during reprogramming with time-lapse bright-field microscopy images using deep learning methods	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Computer Methods and Programs in Biomedicine	6. 最初と最後の頁 107264 ~ 107264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmpb.2022.107264	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞の標識方法	発明者 杉本道彦、阿部訓也	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-016576	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------	---------