

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560949

研究課題名(和文) 幹細胞胚様体内外における物質移動現象・相互作用と細胞分化特性に関する研究

研究課題名(英文) Study of relationship between culture microenvironments of embryoid bodies and differentiation properties of stem cells

研究代表者

中澤 浩二 (NAKAZAWA, Kohji)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：00304733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロウェルチップとマイクロパターンチップを利用して、幹細胞胚様体を取り巻くマイクロ培養環境が幹細胞の分化特性に与える効果を評価した。マイクロウェルチップ培養では、ウェル径、ウェル間距離、チップ上の胚様体数が、胚様体の増殖と分化に影響を与えることを示した。マイクロパターンチップ培養では、胚様体間距離が少なくとも500 $\mu\text{m}$ 以下になると胚様体間の干渉作用が現れることを見出した。これらの結果は、胚様体を取り巻くマイクロ培養環境の設計は、幹細胞の分化特性の重要な因子であることを示す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated that the effects of culture microenvironments of embryoid bodies (EBs) on the stem cell differentiation. To control the culture microenvironments of EBs, we designed two kinds of microchips, microwell and micropattern chips by microfabrication and surface modification techniques. In the microwell chip culture, growth and differentiation of EBs were influenced by the microwell diameter, distance between the microwells, and microwell numbers. In the micropattern chip culture, growth and differentiation of EBs were influenced by the presence of neighboring EBs when the separation distance was less than 500 micron. These results indicated that the designs of culture microenvironment of EBs are important factors for regulation of stem cell properties.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：ES細胞 iPS細胞 胚様体 細胞パターンニング マイクロウェルチップ 相互作用 細胞分化 細胞増殖

### 1. 研究開始当初の背景

未分化状態での増殖能と様々な機能性細胞へと分化できる多分化能を有する ES/iPS 細胞は、再生医療や創薬研究などの有望な細胞源である。これら幹細胞から各種機能性細胞への分化誘導過程では、その初期ステップにおいて「胚様体」と呼ばれる細胞集合体を形成させる方法が一般的である(図1)。

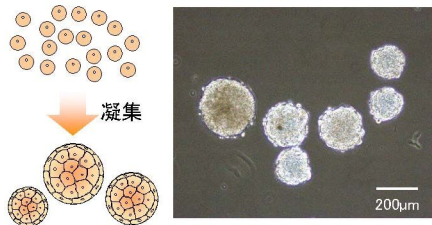


図1. ES/iPS細胞の胚様体培養

「胚様体」培養では、その内部における酸素・栄養素・分泌物・細胞外マトリクスなどの分布状態や細胞間の接着・コミュニケーションの形成状態の違いが、細胞分化のスイッチングや方向性に重要な役割を果たすことが知られている。また、胚様体は幹細胞同士が集合・凝集化した細胞集合体であることから、胚様体サイズによって内部の物質移動現象や相互作用が異なることが指摘されている。さらに、培養系に胚様体が多数存在する場合には、隣接する胚様体間で相互作用(干渉作用)が発生することが考えられる。したがって、胚様体を取り巻くマイクロ培養環境と細胞分化特性の関係を知ることは、幹細胞研究において重要な知見を与えることが期待できる。

しかしながら、一般的な胚様体形成法として利用されているハンギングドロップ法、U型プレート法、浮遊旋回・攪拌培養法などでは、培養下における胚様体の位置や距離などを厳密に制御することはできず、「マイクロ培養環境と細胞分化特性の関係」を網羅的かつ系統的に評価することは難しい。

一方、我々はこれまでに微細加工技術と表面化学修飾技術を巧みに組み合わせ、均質な胚様体を規則的に培養できるマイクロチップ技術を開発してきた。そこで、これらのマイクロチップ技術の特徴を活かすことによって、胚様体の内部環境状態ばかりでなく、胚様体間で見られる干渉作用も網羅的かつ系統的に解析することができ、マイクロ培養環境と幹細胞分化特性の関係が明らかにできると考え、本提案に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、「胚様体を取り巻くマイクロ培養環境と幹細胞分化特性」の関係性を明らかにすることを目的とし、研究期間内において以下の二つの現象を評価・解析することを試みた。

(1)「胚様体内部環境と幹細胞分化特性の関係」：サイズの異なる胚様体を用い、その内部における酸素濃度勾配、細胞外マトリクスの分布状態、細胞間コミュニケーションの発達合いなどの違いが、幹細胞の分化特性に与える影響を明らかにする。

(2)「隣接する胚様体間相互作用と幹細胞分化特性の関係」：培養系内において隣接する胚様体間の距離を変化させ、胚様体間の干渉作用が発生する条件やその作用によって導き出される幹細胞分化特性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、二つのマイクロチップ技術を利用して「胚様体を取り巻くマイクロ培養環境と幹細胞分化特性の関係」の評価を実施した。

(1)「マイクロウェルチップ培養による胚様体特性の評価」

微細加工技術と表面化学修飾技術によってマイクロウェルチップを作製した。このチップは、数センチ角の培養基板上に規則的なマイクロウェル(マイクロ培養空間)を設け、その表面はポリエチレングリコール(細胞非接着分子)が化学修飾された構造をしている。このチップに幹細胞を播種すると、細胞は自発的に集合・凝集化し、胚様体を形成する(図2)。

本研究では、チップのウェル径、ウェル数、さらには播種細胞数を変化させることによって、マイクロ培養環境が幹細胞の分化特性に与える効果を評価した。

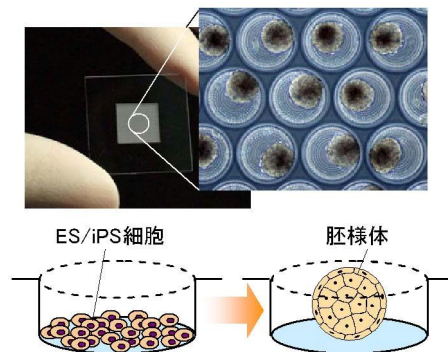


図2. マイクロウェルチップ培養

(2)「マイクロパターンニング培養による胚様体特性の評価」

マイクロコンタクトプリンティング技術を利用してマイクロパターンニングチップを作製した。このチップは、数センチ角の平坦な培養基板上にゼラチン(細胞接着分子)スポットをプリンティングし、その周囲はポリエチレングリコール(細胞非接着分子)が修飾された構造をしている。このチップに幹細胞を播種すると、細胞はまずゼラチンスポット上に接着・伸展し、その後、細胞の増殖に伴って胚様体を形成する(図3)。

本研究では、ゼラチンスポット間距離を変化させることによって、マイクロ培養環境が幹細胞の分化特性に与える効果を評価した。

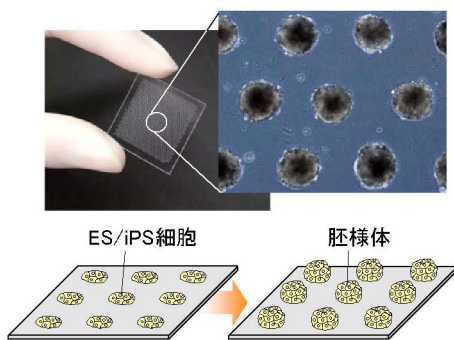


図3. マイクロパターンニング培養

なお、本研究では、胚様体自身が造りだすマイクロ培養環境に着目していることから、すべての実験において特定の分化誘導剤は未添加の培養条件とした。

#### 4. 研究成果

(1) 「初期胚様体サイズの違いが細胞分化特性に与える効果」

4種類のマイクロウェルチップ;チップ400(ウェル径400 $\mu\text{m}$ 、ウェル数572個)、チップ600(ウェル径600 $\mu\text{m}$ 、ウェル数270個)、チップ800(ウェル径800 $\mu\text{m}$ 、ウェル数150個)、チップ1000(ウェル径1000 $\mu\text{m}$ 、ウェル数105個)を設計・作製した。このチップに $1.0 \times 10^5$ 個のマウスES細胞を播種することにより、各チップのウェル当りの細胞数が、チップ400では約200 cells、チップ600では約400 cells、チップ800では約700 cells、チップ1000では約1000 cellsとなり、初期サイズの異なる胚様体を形成させて、幹細胞分化特性との関係性を評価した。

各チップにおいて培養1日目には胚様体が形成され、そのサイズはチップ400では約100 $\mu\text{m}$ 、チップ600では約130 $\mu\text{m}$ 、チップ800では約150 $\mu\text{m}$ 、チップ1000では約180 $\mu\text{m}$ であった。その後、細胞増殖に伴って胚様体サイズは増加したが、細胞の増殖性はチップ400、600、800、1000の順で高く、初期胚様体サイズが小さい程、細胞増殖が活発に起こることが明らかとなった。

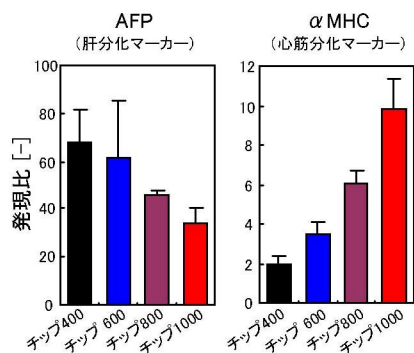


図4. 分化マーカー遺伝子の比較

培養7日目における細胞分化マーカー遺伝子の解析を行った結果、チップ径が小さい(初期胚様体サイズが小さい)程、肝分化(内胚葉系)が促進され、逆にチップ径が大きい(初期胚様体サイズが大きい)程、心筋分化(中胚葉系)が促進される傾向にあることを見出した(図4)。

これらの結果より、初期胚様体サイズの違いは、胚様体の増殖性と分化の方向性に影響を与えることが明らかとなった。

(2) 「胚様体増殖性の違いが細胞分化特性に与える効果」

ウェル数を一定(195個)とし、ウェル径が異なる4種類のマイクロウェルチップ;チップ400(ウェル径400 $\mu\text{m}$ )、チップ600(ウェル径600 $\mu\text{m}$ )、チップ800(ウェル径800 $\mu\text{m}$ )、チップ1000(ウェル径1000 $\mu\text{m}$ )を設計・作製した。各チップのウェル当りの細胞数が約1000個となるようにマウスES細胞を播種し、胚様体増殖性が幹細胞分化特性に与える効果を評価した。

各チップにおいて培養1日目には約160 $\mu\text{m}$ の胚様体が形成された。その後、細胞増殖に伴って胚様体サイズは増加したが、細胞の増殖性はチップ1000、800、600、400の順で高く、ウェル径が大きい程、細胞増殖が活発に起こることが示された。

培養10日目における細胞分化マーカー遺伝子の解析を行った結果、各チップにおいて分化の方向性には違いが見られなかったが、ウェル径が大きい程、細胞の分化が促進されることがわかった(図5)。また、マウスiPS胚様体を用いた実験でも同様な傾向が得られた。

これらの結果より、マイクロウェルチップの条件によって、胚様体の増殖性と分化速度を制御できる可能性が示された。

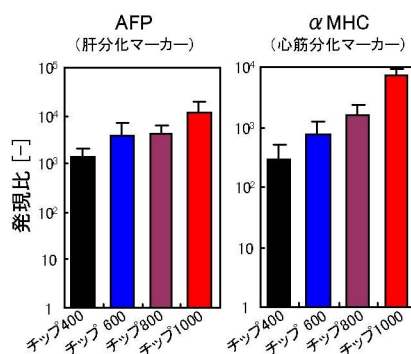


図5. 分化マーカー遺伝子の比較

(3) 「胚様体間干渉作用が細胞分化特性に与える効果」

ゼラチンスポット(300 $\mu\text{m}$ )を一定(91個)とし、スポット間ピッチ(胚様体間距離)が異なるマイクロパターンニングチップ;チップ500(ピッチ500 $\mu\text{m}$ )とチップ1500(ピッチ1500 $\mu\text{m}$ )を設計・作製した。

播種したマウス ES 細胞は、まずはゼラチンスポットに接着・伸展し、その後、細胞の増殖に伴って胚様体を形成した。チップ 1500 では、チップ上の胚様体サイズはほぼ同程度であったが、チップ 500 では周辺部に比べ、内部に存在する胚様体サイズが小さく、細胞増殖が抑制されていることがわかった(図 6)。

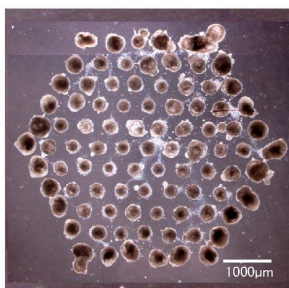


図 6 . チップ 500 の胚様体形態

形成した胚様体を周辺部と内部にエリア分類して回収し、細胞分化マーカー遺伝子の解析を行った。チップ 1500 ではチップ上の胚様体はほぼ同様な分化状態を示したのに対し、チップ 500 では周辺部に比べ、内部に存在する胚様体は未分化維持と肝分化促進の傾向がみられた。

これらの結果より、胚様体間距離が少なくとも 500 μm 以下になると胚様体間相互作用(干渉作用)が発生し、その作用は細胞分化特性に影響を与えることが示された。

#### (4) 「胚様体のパターンニング転写技術の確立」

マイクロウェルチップは、均質な胚様体を大量形成できる有望な培養ツールである。しかしながら、形成させた胚様体を回収し、別の細胞接着培養基板上へと再播種を行う際に胚様体同士が接着・融合し、その結果として培養系内の胚様体サイズが不均一となるという問題があった。

本研究では、マイクロウェルチップの発展型として、ウェルを構成するフレームとウェル底面が分離できるチップを開発した。このチップを利用することによって、マイクロウェルチップにおいて浮遊状態で形成させた胚様体を細胞接着基板上へと規則的に転写し、パターンニング培養できる技術を確認した。

#### (5) 「まとめと展望」

本研究では、マイクロウェルチップおよびマイクロパターンニングチップを用いて、胚様体を取り巻くマイクロ培養環境が幹細胞の分化特性に与える効果の一環を明らかにした。すべての検討に共通していえる知見は、胚様体が嫌氣的になりやすい環境が発生すると、細胞増殖が抑制され、さらに肝分化が促進される傾向を示すことである。

今後、これらの検討をさらに進め、マイクロ培養環境の制御と分化誘導剤の添加を組み合わせることにより、効率的な分化誘導技術へと発展させることが期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

K. Nakazawa, Y. Yoshiura, H. Koga, Y. Sakai, Characterization of mouse embryoid bodies cultured on microwell chips with different well sizes, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol.116, No.5, 2013, 628-633.

doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.005  
古賀晴香, 中澤浩二, 幹細胞胚様体のパターンニング培養, 細胞, 査読無, Vol.44, No.10, 2012, 370-373.

中澤浩二, マイクロチップ技術を利用したスフェロイド培養, ケミカルエンジニア, 査読無, Vol.56, No.7, 2011, 509-513.

Y. Sakai, K. Nakazawa, Novel microchip technique for the transfer of spheroids as floating cultures to micropatterned-adherent cultures, Journal of Biochip & Tissue chip, 査読有, 2011, S4-001.  
doi:10.4172/2157-0777.S4-001

〔学会発表〕(計 17 件)

中澤浩二, マイクロチップ技術を利用した幹細胞の胚様体培養, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2013 年 11 月 25 日, 東京大学

K. Nakazawa, T. Hara, H. Koga, Embryoid body culture of ES cells using gelatin/PEG micropatterned chips, The 4th International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials, 2013 年 9 月 26 日, University La Sapienza (イタリア)

中澤浩二, 原拓也, マイクロパターンニング技術を利用した ES 胚様体培養, 化学工学会 第 45 回秋季大会, 2013 年 9 月 16 日, 岡山大学

中澤浩二, スフェロイドアレイ技術と細胞アッセイ, 日本動物実験代替法学会第 25 回大会, 2012 年 12 月 9 日, 慶應義塾大学

〔図書〕(計 1 件)

田畑康彦 編集, 赤池敏宏, 赤澤俊之, 明石満, 中澤浩二, 他 82 名, メディカルドゥ, 細胞の 3 次元組織化 - その最先端技術と材料技術 -, 2014, 363 (229-234).

〔その他〕

ホームページ等

<http://chempro.env.kitakyu-u.ac.jp/~kna-kazawa/index.html>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 浩二 (NAKAZAWA, Kohji)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授  
研究者番号: 00304733