

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25630377

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞遊走性の制御に基づく内在的分化指向性の誘導

研究課題名(英文) Induction of differentiation directivity of human induced pluripotent stem cells through cell migration

研究代表者

紀ノ岡 正博(KINO-OKA, Masahiro)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40234314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト人工多能性幹細胞(ヒトiPS細胞)を用いた再生医療や創薬などの産業的利用のためには、未分化維持培養や分化誘導方法としての培養環境の改良や評価手法の確立が不可欠である。そこで本研究では「ヒトiPS細胞遊走性の制御に基づく内在的分化指向性の誘導」を目指した。特に、細胞組織工学における基盤技術として、二次元ヒトiPS細胞培養における細胞の初期運命決定の仕組み(未分化と脱未分化を制御する機構)やどのような機構によって細胞の分化方向性(外胚葉、中胚葉、内胚葉)を制御するのか解明を行った。さらに、それらの生物学的現象を用いて、未分化状態と多分化能の制御のための分化誘導培養プロセスの設計への応用を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to apply human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) for industrial application including regenerative medicine, elucidating the mechanisms underlying behaviour is required for regulating hiPSC fate determination. In this study, we focused on the initial fate decision of hiPSCs during the two-dimensional cultures with feeder cells. In addition, we proposed culture strategy designed dealing with determination of hiPSC fates. These studies provide a novel approach for expansion of hiPSCs through regulation of cell-cell and cell-substrate interactions.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオ生産プロセス 再生医療 ヒトiPS細胞 分化制御

1. 研究開始当初の背景

2007年、京都大学の山中伸弥教授が世界で初めてヒトのiPS細胞の作製に成功して以来、医療への応用が待ち望まれている。iPS細胞とは、皮膚細胞などのすでに分化が完了した体細胞を、いくつかの遺伝子を導入することで初期化し、さまざまな種類の細胞に分化する能力(多分化能)を持たせたものである。ES細胞とほぼ同等の分化多能性を示すことから組織の再生過程に重要な役割を果たすと考えられている。iPS細胞の増幅培養、分化した細胞の組織化培養を実施する際に、iPS細胞の未分化性・多能性の維持や目的とする分化細胞への制御が不可欠となる。しかし、未分化状態の維持機構や分化誘導条件など未解明な点が多く、さらには肝臓や心臓といった組織再生のために必要な細胞数の確保や確実に安定な移植細胞への分化など解決すべき問題も多く、新たな手法に基づく培養システムの確立が求められている。これまで、足場の設計指針と細胞機能を決定する「骨格」の形成機構を解明し、その制御を目的としたグルコース提示型デンドリマー面の設計に取り込んできた。特に、本培養面は、間葉系幹細胞に対して、機能的な細胞接着のダイナミックな再構築と細胞の遊走により三次元構造をもつ細胞集塊形成し、細胞内在的シグナリング制御により心筋細胞への分化に対する単一な分化方向性誘導を実現することができた。

2. 研究の目的

本研究開発の目標は、(1)ヒトiPS細胞遊走性の制御に基づく内在的分化指向性の誘導を目指し、さらにそれらの技術を用いて、(2)分化誘導培養プロセスを確立するものである。具体的には、細胞組織工学における基盤技術として、ヒトiPS細胞培養における細胞の初期運命決定の仕組み(未分化と分化を制御する機構)やどのような機構によって細胞の分化方向性(外胚葉、中胚葉、内胚葉)を制御するのかを解明するための指針設計を行う。さらに、それらの生物現象を用いて、未分化状態と多分化能の制御のための分化誘導培養プロセスの設計指針を提示する。

3. 研究の方法

フィーダー細胞との共培養におけるヒトiPS細胞(Tic株)の培養はReproStem培地およびMEFとSNLフィーダー細胞を用い培養を行った。iPS細胞播種後5日目まで、同一コロニーの画像を24時間ごとに取得し、コロニー内の未分化および逸脱現象を観察した。MEFフィーダー細胞上で培養したiPS細胞の遊走阻害が逸脱現象に及ぼす影響を検討するため、培養3日目に100 nM Rac1 inhibitorを添加し、逸脱コロニー形態を観察した。

また、10継代培養した細胞は未分化マーカーや初期分化マーカーの遺伝子解析により未分化・分化状態を評価した。

4. 研究成果

(1)二次元フィーダー細胞との共培養におけるヒトiPS細胞の運命決定メカニズムの解明

ヒトiPS細胞の未分化維持培養は、分裂能を欠如させたマウス胎児組織由来細胞を支持細胞(フィーダー細胞)とした共培養により行われている。フィーダー細胞は、細胞成長因子や細胞外マトリックスを産生するが、フィーダー細胞によって、iPS細胞の増殖速度や未分化逸脱傾向が異なり、未分化状態維持に重要である。そこで本研究では、iPS細胞培養における未分化状態からの逸脱現象を解明し、細胞未分化維持における間接着結合と細胞基質間接着結合のバランス制御を試みた。また、ヒトiPS細胞の遊走阻害による未分化・分化の制御の関係について検討した。SNLとMEFフィーダー細胞を用い、ヒトiPS細胞を培養したところ、図1に示すように、SNLフィーダーの培養において、未分化を逸脱した細胞がコロニー中心部において発生することを明らかにした。発生メカニズムは、コロニーが大きくなると必然的に逸脱現象が生じており、中心部分で圧迫された細胞が一部培養面から剥離することで、細胞-基質間接着の劣化し、アポトーシスが引き起こされる。その後、E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着の崩壊により逸脱細胞が発生し、活発な分裂による自己増幅により、逸脱細胞がコロニー内で優勢となることが分かった。一方、MEFフィーダー上では、iPS細胞の遊走が活発となり、コロニー中心部分での逸脱現象が見られないが、周辺部において、遊走が活発であるためE-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着が崩壊し、逸脱細胞が偶発的に発生している現象が見られた。さらに、遊走性を阻害するRac1阻害剤の添加は、コロニー周辺部の逸脱細胞の発生を抑制し、反対に中心部にて発生し、SNLフィーダー上と同様の逸脱現象が見られた。さらに、SNLとMEFフィーダー上で培養したヒトiPS細胞が長期間培養中に細胞運命決定に関与しているかどうかを評価するため、ヒトiPS細胞を10継代にわたって培養した。

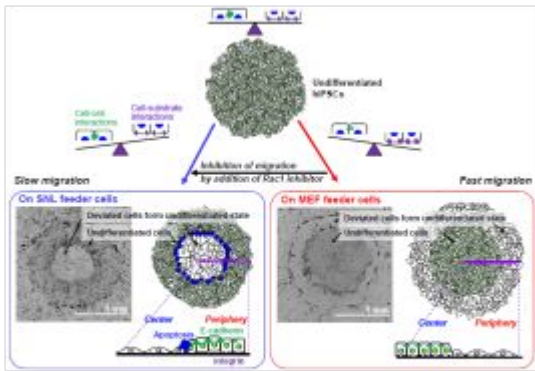


図 1. フィーダー上でのヒト iPS 細胞の未分化状態からの逸脱現象.

10 継代培養した細胞は未分化マーカーや初期分化マーカーの遺伝子解析を行ったところ、図 2 に示すように、SNL フィーダー上で培養した細胞では、1 継代培養での細胞と同様の未分化維持マーカーである Oct4, Nanog, Tra1-60 の発現レベルが確認されたが初期分化マーカー遺伝子では一部のマーカーについて発現が示された。しかし、10 継代後の MEF フィーダー上で培養した細胞では、未分化維持マーカーである Oct4 と Sox2 遺伝子の発現の低下し、中胚葉、外胚葉の分化マーカーの発現が上昇することが示された。以上の結果から、フィーダー細胞が提供している培養環境下で細胞遊走性の違いによる細胞 - 基質間接着と細胞 - 細胞間接着のバランスが変化され、内在的分化指向性の誘導に影響を及ぼすことが分かった。

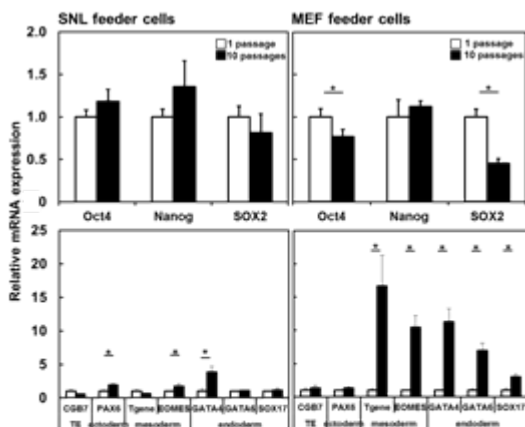


図 2. ヒト iPS 細胞の集塊培養における未分化・分化特性. 10 継代培養した iPS 細胞集塊の未分化と内胚葉, 中胚葉, 外胚葉への分化を示すマーカー遺伝子発現解析 (*, $p > 0.01$).

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 1 件)

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Switching between self-renewal and lineage commitment of human induced pluripotent stem cells via cell-substrate and cell-cell interactions on a dendrimer-immobilized surface, *Biomaterials*, 査読有, Vol.35, No.22, 2014, pp.5670-5678

doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.085

〔学会発表〕(計 5 件)

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Coordination of Cell-Cell Interactions and Cell-Substrate Interactions by Altering Migration is required for Regulating Fate Decision of Human Induced Pluripotent Stem Cells, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting (ISSCR), June 12-15, 2013, Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA

Mee-Hae Kim, Masuda Eri, and Masahiro Kino-oka, Characterization of Derivation from Undifferentiation in Colonies of Human Induced Pluripotent Stem Cells based on Kinetic Analysis, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting (ISSCR), June 12-15, 2013, Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA

守随 恵理, 金 美海, 紀ノ岡 正博, ヒト幹細胞の遊走阻害による未分化・分化の制御, 化学工学会第 45 回秋季大会, 2013 年 9 月 17 日, 岡山大学津島(東)キャンパス, 岡山県

松原 佳史, 増田 英里, 伊賀 朋世, 金 美海, 紀ノ岡 正博, ヒト iPS 細胞の継代培養における未分化状態からの逸脱現象の解明, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 20 日, 広島国際会議場, 広島県

金 美海, 紀ノ岡 正博, デンドリマー培養面を用いたヒト iPS 細胞の継代培養における未分化維持能の解析, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 20 日, 広島国際会議場, 広島県

〔図書〕(計1件)

金 美海, 紀ノ岡 正博, デンドリマー培養面を利用したヒト iPS 細胞の未分化維持, 日本医学館, バイオマテリアル - 生体材料, 2013, Vol.31, No3, pp.154-157

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紀ノ岡 正博 (KINO-OKA Masahiro)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 40234314