

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H00855

研究課題名(和文) 微小環境の動的変化を用いた幹細胞の機能制御技術

研究課題名(英文) Technology to Regulate Stem Cell Functions via Dynamic Modulations of Microenvironments

研究代表者

田中 求 (Tanaka, Motomu)

京都大学・高等研究院・特任教授

研究者番号：00706814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では周囲の物理的・化学的刺激により誘引された環境の動的変化を用いて幹細胞の機能(分化・自己複製)を制御する新しい技術基盤の開拓と、幹細胞の動的応答メカニズムを明らかにすることを旨とした。(1)化学刺激によるヒト造血幹細胞の骨髄内での接着と遊走の制御、(2)物理的刺激によるヒト間葉系幹細胞の増殖制御、また(3)細胞接着の変調によるヒト多能性幹細胞の制御という3つのテーマにおいて、精密に設計した幹細胞微小空間を用いて、独自の計測・数理解析技術を確立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的成果として特筆すべきものは、精密に設計した骨髄微小環境モデルを駆使して、臨床薬や骨髄内ケモカインがヒト造血幹細胞の接着強度や遊走へ与える影響を精密計測、その解析結果を数値指標化することで、「化学的刺激を受けた造血幹細胞の運動方程式」を確立したことがあげられる。この成果がもたらす社会的意義としては、急性骨髄性白血病などの治療において、標的阻害剤や化学療法による未知の副作用を定量的に記録する共通プラットフォームが確立されたことが大きな成果として挙げられる。

研究成果の概要(英文)：This project aims to develop novel technological platforms to understand the adaptation mechanism of human stem cells to dynamic environmental changes as well as to control their differentiation and self-renewal. We succeeded in the establishment of unique measurement techniques and analytical tools specifically designed for three target systems: (1) chemical cues that control adhesion and migration of human hematopoietic stem cells in bone marrow microenvironments, (2) physical cues that control proliferation of human mesenchymal stem cells, and (3) cell adhesion that regulates functions of human induced pluripotent stem cells.

研究分野：数物系科学・生命物理学

キーワード：バイオメカニクス 幹細胞制御 細胞微小環境モデル 細胞接着 細胞変形・遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は周囲の細胞や細胞外基質などの微小環境(幹細胞ニッチ)との相互作用を通じて、その機能を維持しつつ自己複製・分化といった運命を決定する。例えば造血幹細胞は骨髄内において間葉系幹細胞との接着によってその未分化状態を維持し自己複製を行う。一方、胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞のような多能性幹細胞は、カドヘリンによる細胞間接着を介して細胞塊を形成しその機能を維持しているが、バラバラの単細胞の状態ではアポトーシス(自死)を行う。

生体では幹細胞の微小環境は空間的に非常に不均一で、その動的変化は幹細胞の運命を決定する上で大きな役割を果たす。ゆえに、分子レベル・遺伝子レベルからとは異なる物理学的視座から外的摂動下における幹細胞の動態の普遍原理を解明することは、確率的な細胞の運命決定の本質に迫る非常に有効な手段である。幹細胞ニッチにおける化学的な誘導因子(ケモカイン)の役割については多くの先行研究があるが、ヒト幹細胞を用いた*in vitro*の研究ではケモカインなどの効果を現象論的に「観る」ために実際とは程遠い大量の化合物を用いている例が多い。一方で幹細胞ニッチの力学的影響については様々な弾性率をもつゲル基板を用いた「静的制御」がほとんどであり動的な外部からの刺激の影響に踏み込んだものはなかった。

2. 研究の目的

本研究では、外部から刺激を受けた際の個々の細胞レベルでの動的応答に重点を置いたワークパッケージ(WP)を三つ設定する。幹細胞の重要な三つの機能を、接着強度計測や変形と運動のモード解析など独自の実験・解析手法を用いて解明する。実験で得られた定量データをもとに、微小環境の変化への幹細胞の動的応答を普遍的に記述できるような数理モデルの確立を目指す。

(WP1) 化学的刺激による造血幹細胞の自己複製と遊走の制御

造血幹細胞の多分化能を維持しつつこれを自己複製することは骨髄内微小環境の重要な役割のひとつで、この機能不全は骨髄性白血病などの疾患をもたらす。しかし、健康ドナーの造血幹細胞を白血病患者に注入する細胞移植治療がこの30年の間に飛躍的な発展を遂げた一方、多分化能を損なわずにヒト造血幹細胞を継代培養することは未だに技術的に非常に困難である。そこで本研究では、骨髄ニッチで重要な役割を果たしている、間葉系幹細胞表面のモデル(Supported Membranes)を、ピオチンやヒスチジンでタグ付けをした組み替えタンパク質(NカドヘリンとSDF1)で精密に機能化したものを用いる。

(WP2) 物理的刺激による間葉系幹細胞の自己複製と分化の制御

再生医療への応用が期待される間葉系幹細胞の分化誘導には、特定の化学物質を含んだ培地が一般に用いられているが、一方で幹細胞がその培養基板の弾性率などといった力学的環境を敏感に感受し分化誘導を制御していることがここ10年近くの間数多く報告されている。間葉系幹細胞の力学的微小環境は空間的な不均一性に加え時間的にも変化するにも関わらず、先行研究はほぼ安定な化学結合の「静的な力学環境」に依拠している。本研究では、超分子化学の専門家である原田・中畑(連携)の協力の下、ポリアクリルアミドの側鎖をホスト・ゲスト基(シクロデキストリン・アダマンタン)で修飾したゲルを新たな材料として用いる。培地中のアダマンタン濃度を変えることで、細胞の代謝や活性に干渉せずゲル基板の弾性率をスイッチングする。これまで生物学において「細胞の極性の変化」という現象論的な記述をされてきた細胞内部の秩序の変化を、「時空間並進対称性の破れ」として物理学的に記述することができる。

(WP3) 細胞間接着を使った幹細胞の多能性維持

多能性幹細胞はカドヘリンによる細胞間接着を介して細胞塊を形成しないとアポトーシスによって死滅するが、ROCK阻害剤のような化学物質を与えることでばらばらの細胞のまま培養増

殖することができる。ミオシンのブロッカーである Blebbistatin を投与してもアポトーシスを防げることから、単離された多能性幹細胞においてはアクチン-ミオシン複合体が過剰に活性化され、これが細胞の自死を誘起することがわかっている。このような分子レベルでのメカニズムに対して、「どの程度細胞間接着、すなわち細胞表面の張力が弱くなったら自死が起こるのか」といった、多能性幹細胞の機能性維持に細胞力学の観点から取り組んだ先行研究はない。WP3 では、WP1 でも用いた Supported Membrane を細胞間接着分子 E カドヘリンで機能化し、その膜表面での分子間距離をナノメートルレベルで精密制御した基板を、多能性幹細胞表面の *in vitro* モデルとして用いる。本研究の準備に当たっては、連携・長谷川の協力の下、ヒト iPS 細胞をラミニン再構成タンパク質（多能性幹細胞の培養増殖に有効：分子間距離 11 nm）で機能化した膜上に播種したところ、ROCK 阻害剤を投与した場合には自死を防ぎ長期間の培養が可能であることを確認した。ここでは細胞の自死を防ぐのに必要な ROCK 阻害剤や Blebbistatin（化学的刺激）の投与レベルと細胞の力学的特性の相関を、圧力波を用いた接着強度計測・申請者の研究室で作製した光ピンセット装置を用いた張力計測（連携・吉川（研））によって明らかにする。ヒト ES・iPS 細胞の多能性を維持したまま単一細胞を安定培養できる条件を決定できれば、ヒト多能性幹細胞を一細胞分析する技術基盤を提供できる。

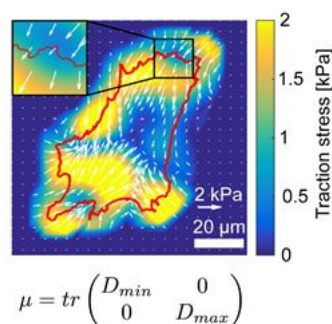
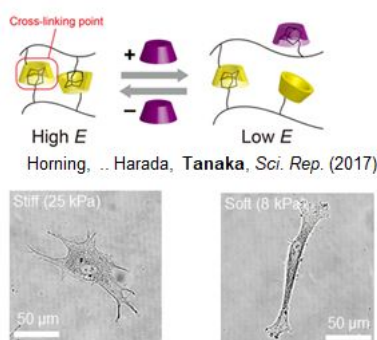
3. 研究の方法

本研究では、外部から刺激を受けた際の個々の細胞レベルでの動的応答に重点を置いた、（WP1）ケモカインのような化学的刺激による造血幹細胞の自己複製と骨髄内での遊走の制御、（WP2）細胞外基質の力学的変化による間葉系幹細胞の分化と自己複製の制御、そして（WP3）細胞間接着を使った幹細胞の多能性維持、というワークパッケージ（WP）を三つ設定した。

（WP1）化学的刺激による造血幹細胞の自己複製と遊走の制御

各タンパク質個別にとった基礎データ (Burk, ...Tanaka, Ho, *Sci. Rep.* (2015)) をもとに、これら二つの要素を共存させたモデル表面を用いて、パルスレーザー誘起圧力波装置を用いた造血幹細胞の接着強度を化学的的外部刺激（ケモカイン）や臨床薬剤のある状態とない状態で精密定量・解析し、これを記述する数理モデルを開拓する。

（WP2）物理的刺激による間葉系幹細胞の自己複製と分化の制御



Linke, ...Ho, Tanaka, 投稿中

本研究では、超分子化学の専門家である原田・中畑（連携）の協力の下、ポリアクリルアミドの側鎖をホスト・ゲスト基（シクロデキストリン・アダマンタン）で修飾したゲルを新たな材料として用いる (Horning, Nakahata, ...

Harada, Tanaka, *Sci. Rep.* (2017)).

（WP3）細胞間接着を使った幹細胞の多能性維持

多能性幹細胞は細胞塊を形成しないとアポトーシスによって死滅するが、単離された多能性

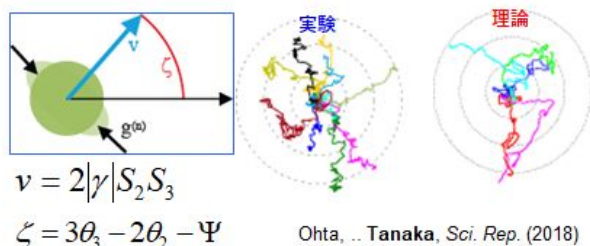
幹細胞においてはアクチン-ミオシン複合体が過剰に活性化され、これが細胞の自死を誘起することがわかっている。このような分子レベルでのメカニズムに対して、本研究では多能性幹細胞の機能性維持に細胞接着が与える影響を定量的に計測・解析した。

4. 研究成果

(WP1) 化学的刺激による造血幹細胞の自己複製と遊走の制御

臨床現場で使用されている2種類の細胞可動化薬剤および骨髄に存在する細胞誘導因子の存在下で定量した。薬剤の機能が細胞変形や遊走に与える影響を「動的表現型」として指標化し、これを用いることを国際誌にて提案した(Monzel, ..., Ho, **Tanaka**, *Sci. Rep.* (2018))。

自発変形によって『はい回る』造血幹細胞の数理モデル

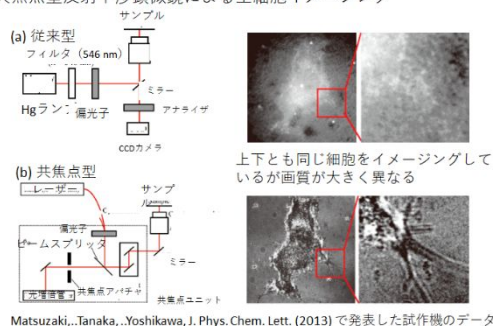


またこの成果をさらに大きく発展させ、これらの実験結果を定量的に再現する数理モデルを確立した(Ohta, ... Ho, and **Tanaka**, *Sci. Rep.* (2018))。この成果をさらにカドヘリン阻害剤へと応用し、接着分子への直接的干渉が細胞接着だけでなく変形や運動といったエネルギー散逸

に与える影響を解明した(Thoma, ... Ohta, **Tanaka** 投稿中)。

(WP2) 物理的刺激による間葉系幹細胞の自己複製と分化の制御

共焦点型反射干渉顕微鏡による生細胞イメージング



ここでは分担研究者：吉川と光学系を設計し、共焦点光学系を反射干渉顕微鏡に組み込んだ装置の開発を行った。また、連携研究者：原田・中畑と、弾性率を動的に可逆変化できる水和ゲル基板を開発し、この上でヒト間葉系幹細胞が安定に接着するための表面機能化に取り組んだ。この「弾性率を動的に可逆変化できるヒドロゲル基板」を用いて、一か月にわたって9割近くの間葉系

幹細胞の多分化能を維持できること、また硬さを周期的に変化させることによって幹細胞の自己複製を抑制できることを示した。間葉系幹細胞が自発的に基板を「つかんで」生み出す力場のライブ画像からの可視化に成功するなど、当初期待していたよりも大きな成果が得られた(Linke, Nakahata, ... Harada, **Tanaka** 投稿中)。また知財化したこの材料の実用化について、現在ドイツのバイオ企業がオプション契約のもと共同研究を進めるなど、材料の実用性が示された。

本研究のテーマをさらに発展展開して「可逆的な物理的刺激による細胞の動的制御」を目的として、配向性が自在に変調できる「しわ基板」を産総研・大園博士との共同研究で開発し、これまで静的な応用がほぼすべてであったコンタクトガイダンスに動的な刺激を導入した。この成果は田中がゲスト

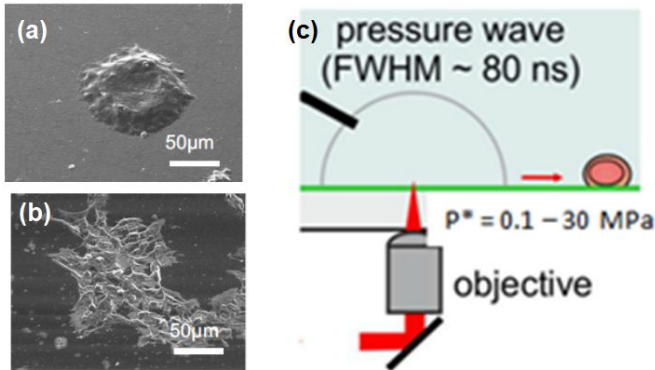


Linke, Suzuki, Yamamoto, ... Ohzono, **Tanaka**, *Langmuir* (2019)

エディターを務めたアメリカ化学会 *Langmuir* 誌の特集号「Mechanobiology」のカバー・アーティクルとして取り上げられた(Linke, ... Suzuki, ... **Tanaka**, *Langmuir* (2019))。

(WP3) 細胞間接着を使った幹細胞の多能性維持

ゼラチンナノファイバー上でヒトiPS細胞の中に異なる形状の細胞塊を形成する表現型が存在すること、それが細胞接着強度の違いに起因することを解明



Yu, Yamamoto, Tanaka, Liu, *Stem Cell Rep.*, 11, 142 (2018)

細胞接着が弱いナノファイバー上では多能性遺伝子が維持されることを報告した(Yu, .. Tanaka, Liu, *Stem Cell Rep.* (2018))。また連携研究者長谷川らとともに、上記ヒドロゲル基板上でヒトiPS細胞が接着・コロニー形成する過程を追跡、多能性遺伝子の維持も確認した。これをさらに大きく展開し、平行に整列するなど異方性を持ったファイバー上でのヒトiPS細胞のコロニー

発生の初期過程を追跡した論文を投稿した(Hayashi, ... Hasegawa, Tanaka 投稿中)。

これに加え、3Dレーザーリソグラフィーを用いた刺激応答性三次元構造の構築 (Hippler, .. Tanaka, Wegener, Bastmeyer, *Nat. Comm.* (2019))や、ナノ集光した放射線を用いて凍結細胞内部の化学組成を25nm精度で定量計測するという走査型X線蛍光顕微鏡を用いた新しいケミカルイメージングにも成功 (Froehlich, ... Lanzer, Tanaka, *Anal. Chem.* (2020))するなど、当初の計画を上回る大きな成果を挙げる事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Monzel, C.; Becker, A. S.; Saffrich, R.; Wuchter, P.; Eckstein, V.; Ho, A. D. & Tanaka, M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Dynamic cellular phynotyping defines specific mobilization mechanisms of human hematopoietic stem and progenitor cells induced by SDF1 versus synthetic agents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-19557-x	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
1. 著者名 Ohta, T.; Monzel, C.; Becker, A. S.; Ho, A. D. & Tanaka, M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Simple physical model unravels influences of chemokine on shape deformation and migration of human hematopoietic stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-28750-x	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
1. 著者名 Yu, L.; Li, J.; Hong, J.; Takashima, Y.; Fujimoto, N.; Nakajima, M.; Yamamoto, A.; Dong, X.; Dang, Y.; Hou, Y.; Yang, W.; Minami, I.; Okita, K.; Tanaka, M.; Luo, C.; Tang, F.; Chen, Y.; Tang, C.; Kotera, H. & Liu, L.	4. 巻 11
2. 論文標題 Low Cell-Matrix Adhesion Reveals Two Subtypes of Human Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 142-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.06.003	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
1. 著者名 Linke, P.; Suzuki, R.; Yamamoto, A.; Nakahata, M.; Kengaku, M.; Fujiwara, T.; Ohzono, T.* & Tanaka, M.*	4. 巻 special issue
2. 論文標題 Dynamic Contact Guidance of Myoblasts by Feature Size and Reversible Switching of Substrate Topography: Orchestration of Cell Shape, Orientation, and Nematic Ordering of Actin Cytoskeletons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 7538-7551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02972	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

1. 著者名 Lamas-Murua, M.; Stolp, B.; Kaw, S.; Thoma, J.; Tsopoulidis, N.; Trautz, B.; Ambiel, I.; Reif, T.; Arora, S.; Imle, A.; Tibroni, N.; Wu, J.; Cui, G.; Stein, J. V.; Tanaka, M.; Lyck, R. & Fackler, O. T.	4. 巻 201
2. 論文標題 HIV-1 Nef Disrupts CD4+ T Lymphocyte Polarity, Extravasation, and Homing to Lymph Nodes via Its Nef-Associated Kinase Complex Interface.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 2731-2743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701420	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 Monzel, C.; Becker, A. S.; Saffrich, R.; Wuchter, P.; Eckstein, V.; Ho, A. D.* & Tanaka, M.	4. 巻 8:1841
2. 論文標題 Dynamic cellular phenotyping defines specific mobilization mechanisms of human hematopoietic stem and progenitor cells induced by SDF1 versus synthetic agents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-19557-x	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

1. 著者名 Frank, V.; Chushkin, Y.; Froehlich, B.; Abouillan, W.; Rieger, H.; Becker, A. S.; Yamamoto, A.; Rossetti, F. F.; Kaufmann, S.; Lanzer, M.; Zontone, F. & Tanaka, M	4. 巻 7:14081
2. 論文標題 Lensless Tomographic Imaging of Near Surface Structures of Frozen Hydrated Malaria-Infected Human Erythrocytes by Coherent X-Ray Diffraction Microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-017-14586-4	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 M. Tanaka
2. 発表標題 Coherent X-Ray Diffraction Imaging of Frozen Hydrated Human Erythrocytes Infected by Malaria Parasites
3. 学会等名 European X-Ray Diffraction Conference (EPDIC) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Tanaka,
2. 発表標題 Supported membranes as a platform for dynamic phenotyping of primary human cells: Quantifying the effect of intrinsic and extrinsic factors,
3. 学会等名 American Society Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Benjamin Froehlich
2. 発表標題 Quantification of biomechanical properties of P.falciparum-infected hemoglobinopathic erythrocytes: Understanding the protective mechanism against severe forms of malaria
3. 学会等名 System Biology of Human Disease (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Federico Amadei and Motomu Tanaka
2. 発表標題 In vitro models to investigate the interaction between lipids and mucin: a microinterferometric study
3. 学会等名 European Colloid and Interface Science Conference, (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット	発明者 原田明、高島義徳、 中畑雅樹、田中求、 M.Horning	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-529902	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット	発明者 原田明、高島義徳、 中畑雅樹、田中求、 M.Horning	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、16/320,622	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット	発明者 原田明、高島義徳、 中畑雅樹、田中求、 M.Horning	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、17834295.2	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
研究 分 担 者	吉川 洋史 (Yoshikawa Hiroshi) (50551173)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	