

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03023

研究課題名(和文) 弾性パターンングゲルを用いたヒトiPS細胞のフィーダーフリー高速増殖技術の開発

研究課題名(英文) Development of feeder-free fast proliferating culture of human iPS cells with microelastically-patterned hydrogel substrate

研究代表者

木戸秋 悟(Kidoaki, Satoru)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号：10336018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：再生医工学にヒトiPS細胞を活用する上での重要な課題の一つに、ハイドロゲル等の弾性基材におけるiPS細胞の維持・増殖培養技術の確立があげられる。本研究では、独自に開発したハイドロゲルの弾性マイクロパターンング技術に基づきiPS細胞の品質保持・安定増殖のための基材力学場条件を検証したところ、iPS細胞の維持・増殖に至適な基材弾性率条件が存在するとともに、iPS細胞は自発的にその至適弾性領域を指向して移動して、そこでコロニーを形成しつつ未分化性マーカーの発現を最大化することを見出した。これらの知見は、iPS細胞の維持・増殖培養のための弾性基材設計の重要な方針を与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Development of elastic substrate such as hydrogels to assure the stable maintenance and proliferation of human iPS cells is strongly required for tissue engineering field. In this study, based on our original methodology of microelasticity patterning of hydrogel surface, the most optimal mechanical condition of culture substrate for human iPS cells has been scrutinized. We have found that iPS cells well proliferate on the hydrogel with optimal middle stiffness, and tend to move towards the optimal region to form colonies with maximum expression of undifferentiation makers. These findings should provide an essential principle for designing elastic substrate for high-qualified iPS cell cultures.

研究分野：医用生物物理工学

キーワード：細胞・組織工学材料 iPS細胞 メカノバイオロジー 弾性基材

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞はES細胞と同等の三胚葉分化能を有し、倫理面での問題を回避できることから、医療応用への展開が加速しつつある。種々の細胞に分化誘導して用いるためには、その前提として未分化状態を維持したまま高速・大量に増殖させることが重要であるが、研究開始当初までに確立されていた二種の培養方法（フィーダー細胞層利用、およびフィーダーフリーマトリゲル利用）はどちらも生物由来の原料を元に経験的に決定された条件での培養法であり、培養基材の化学的・力学的特性の明確な定義がなされているとは言えず、iPS細胞の真に最適な培養条件は定まっていなかった状況であった。特に、細胞培養基材の化学・力学特性は幹細胞分化の系統決定に強く影響する重要なファクターであることが近年知られつつあり [Discher et al., Cell 126, 67 (2006)]、これら二つの特性を正確に定義した基材の設計が求められていた。

このような培養基材の設計を行うためには、iPS細胞の標準的な培養で使用されるフィーダー細胞を用いず、かつ系統的に表面化学と弾性特性を調節可能な培養基材が必要とされる。この設計要件に対して我々は、独自に確立した弾性率可変ラミニン固定化ゼラチンゲルを用いて分散培養されたヒト iPS細胞について、従来のマトリゲル上でのフィーダーフリー培養の1.5倍程までに増殖を高速化できる至適培養基材の力学場設計要件を見出していた（特願 2014-39524）。この知見は iPS細胞の維持培養に iPS細胞自体の力覚感知特性が関与し得ることを初めて明らかにしたものであった（iPS細胞のメカノバイオロジー）。

2. 研究の目的

本研究は、上述の背景を踏まえ、我々が事前に独自に見出したヒト iPS細胞の高速増殖培養基材の設計技術を発展させ、iPS細胞のさらに高性能の高速増殖培養基材を開発するとともに、iPS細胞の高速増殖を誘導するための生物学的基礎原理の解明を目指したものである。

iPS細胞の増殖培養は再生医療の重要な基盤技術であるが、実用上必要となる $10^8\sim 10^9$ 個スケールの細胞数を準備するには数ヶ月程度かかるのが現状である。この課題に対して我々は、上述の弾性率可変のラミニン固定化ゼラチンゲルを用いて、ゲル表面のラミニン固定密度とゲルの弾性率の両パラメータを特定の条件に最適化することで、iPS細胞の増殖速度を従来培養法の1.5倍までに加速することができるという予備的知見を得ていた。これは従来数ヶ月かかっていた細胞の増殖期間を一ヶ月強ほどまでに短縮できる可能性を示し、実用上重要な意義がある一方、さらなる高速化・期間短縮が望まれた。本研究では iPS細胞の接触走性を操作する弾性パ

ターニングゲルの設計（後述）により、iPS細胞コロニー形成を迅速に安定化する基材表面設計の条件を明らかにすることで、iPS細胞のさらなる高速増殖基材の構築を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト iPS細胞の維持・増殖のための培養基材の設計を考えるとき、特に本質的な問題がある。それはヒト iPS細胞は孤立分散したシングルセル状態からの培養が困難であり、マウス ES/iPS細胞の場合とは異なり、細胞間接着を解除して個々の細胞にバラバラに分散した状態にするとアポトーシスを起こし、維持・増殖させることができない。これを阻止するために通常ヒト iPS細胞の継代培養は、最小限の細胞間接着を確保する小さい細胞クラスターの状態から行うか、またはミオシン過剰活性化を阻止する ROCK 阻害剤 Y-27632 の培養液への添加が必須である。この現象の原因の一つとしては、細胞間接着を解除された状態の iPS細胞において細胞膜直下の表層アクチン/ミオシン網に過剰な機械的張力が生成し、その機械的ストレスがミトコンドリアへのアポトーシス誘導シグナルを駆動する可能性が指摘されており [Ohgushi et al., Cell Stem Cell 7, 225 (2010)]、iPS細胞自体の内部の応力状態がその維持・増殖に関連を持つことが予想されていた。細胞の内部応力は一般に、培養環境・培養基材の表面化学と機械的特性に依存して制御されるが、我々が本研究課題の実施に先立って見出していたヒト iPS細胞の高速増殖現象とその基材条件は、iPS細胞の増殖に最適な細胞内部応力の設定に関与するものであると推察されるところであった。

孤立分散的に播種されたヒト iPS細胞の維持・増殖のため培養基材条件の最適化が本研究の第一の前提となるため、本研究の具体的なアプローチとしてはまず、iPS細胞の運動方向を制御し、自発的な集合を誘導する同心円状の収束型弾性勾配パターンニングゲルの開発を予定した。この方針によれば、分散培養 iPS細胞の細胞間接着が迅速に誘導され、生存性を速やかに確保したのち、増殖に移るものと期待したためである。この iPS細胞の走性制御の弾性パターンニング基材の設計最適化と、iPS細胞の高速増殖基材条件の探索を行うとともに、高速増殖を可能とする培養環境の機械力学的効果の系統的解析を進め、iPS細胞の高速増殖を誘導する生物学的基礎原理を明らかとする知見の獲得に挑戦することが当初予定した研究方法であった。

しかし、iPS細胞の分散培養技術に関する研究動向は、本研究課題の実施中にも大きな発展が進んでおり、特に次の二つの技術と試薬が上市されるに至って、上述の方法論による iPS細胞の維持・増殖培養法の優位性は限定的なものとなった（平成28年度において）。一つは、細胞非接着皿において丸底ないし U

底形状を持つコロニー安定化ウェルの開発が企業において完成したこと、もう一つはラミニン 511-E8 フラグメントの市販品の一般への流通である。これらの二つの技術および試薬がヒト iPS 細胞の維持・増殖において極めて有効であることが、実際に使用してわかり、本研究課題の当初目的を凌駕するものであることが了解された。そこで本研究では、それらの既存技術においてもなお困難となっている iPS 細胞の維持・増殖培養系について、焦点をシフトして研究を続行・推進した。

その新たな焦点は、ハイドロゲル上における iPS 細胞の維持・増殖培養の最適化である。増殖・分化操作後の、足場材料や人工 ECM へのシームレスな移行を考えた場合、ハイドロゲル等の弾性基材上における iPS 細胞の分散培養が必要となる。本研究では、ハイドロゲル上での iPS 細胞の分散培養を可能とする表面生化学および培養力学場の最適条件の確立を目指し、ラミニン固定化弾性率可変ゼラチンゲルを用いてその増殖動態および iPS 細胞の幹細胞性の解析を行った。

実際の実験方法としては、ゼラチンに p-ビニル安息香酸を縮合したスチレン化ゼラチン (StG) を用いた。StG の 30wt% PBS 溶液に開始剤 SCQ (カンファーキノン-10-スルホン酸) を加え光照射を行い StG ゲルを作製した。AFM を用いた微視的圧入試験によりゲルの弾性率を測定した。続いて、EDC(1-(3-Dimethyl aminopropyl)-3-ethyl carbodiimide) と NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) を用いてラミニン 511-E8 フラグメントを StG のカルボキシル基との間で縮合固定した。このラミニン固定 StG ゲル上に iPS 細胞を 3.0×10^3 cells/cm² の密度で播種し、七日間培養した後、Oct4 に対する免疫抗体染色を行い、蛍光顕微鏡観察および蛍光強度解析を行った。

4. 研究成果

2~40 kPa の異なる表面弾性率を有する StG ゲル上で iPS 細胞の増殖培養を行ったところ、これらのゲル上における iPS 細胞の安定した増殖の再現性を確認した。弾性率 5kPa 以下のゲルで培養した iPS 細胞の増殖スピードがやや低下し、10kPa 以上では増殖挙動に大きく変化は見られないことがわかった (Fig1)。

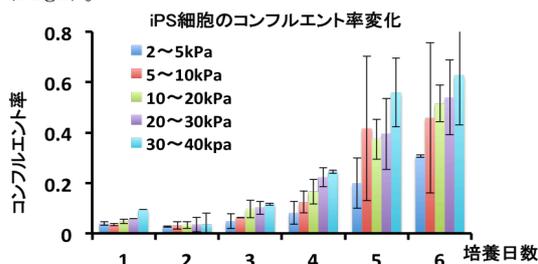


Fig.1 異なる弾性率条件のゼラチンゲル上における iPS 細胞の増殖挙動

さらに培養ゲルの弾性率を 5~130 kPa の範囲で変えて長期培養した iPS 細胞の未分化マーカー Oct4 の発現性について免染画像の蛍光強度解析を行ったところ、30~40kPa のゲル上において Oct4 の発現が最も高いことがわかった (Fig. 2)。このことは、iPS 細胞の幹細胞性の維持において、30~40kPa の中程度の弾性率域が最適であることを示している。

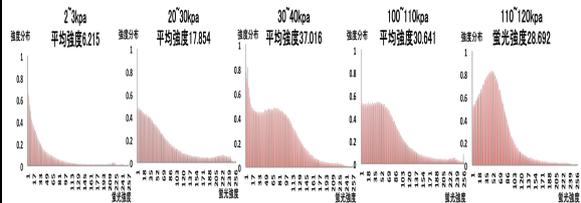


Fig.2 異なる弾性率条件下で形成された iPS 細胞コロニーにおける Oct4 の免疫染色蛍光強度分布

以上を踏まえてさらに興味深いことに、今回調査した弾性率条件を選んで設計したマイクロパターニングを施したゲル上で、播種後の iPS 細胞は 30~40kPa の領域を好んで移動し、かつ長期培養過程でその領域にコロニーを形成する傾向も観察された。30kPa の領域と 200kPa の領域を非一様にパターニングしたゲル基材においては、iPS 細胞のコロニーは 30kPa 領域を目指して移動し (硬→軟への移動)、そこで安定した増殖を示すことが確認された (Fig. 3)。

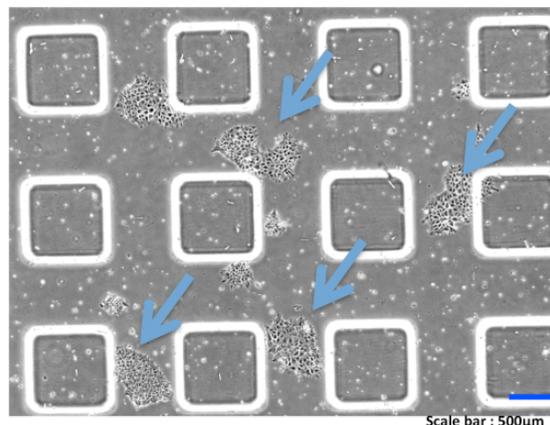


Fig.3 弾性パターンニングゲル上における iPS 細胞のコロニー形成. 四角ドメイン: 200kPa、周囲 30kPa. コロニーは優先的に軟領域に移動した上で形成されており、かつ、その領域において Oct3/4 の発現が最大となる。

予備的検討では 5kPa 領域と 30kPa 領域をパターンニングしたゲル上においては、今後は逆に軟→硬への移動を示しつつ、やはり 30kPa 領域において安定増殖をしめし、そこで Oct3/4 の発現がもっとも高まった。これらの結果より、iPS 細胞の品質保持・安定増殖には基材の至適弾性率条件が存在するとともに、iPS 細胞は自発的に至適弾性領域を指向して移動する性質を有することがわかった。この知見は iPS 細胞の局所的集積技術

の基盤として活用可能であり、集積させたのちに他の種類の細胞を領域区分的な追加共培養を施すことで iPS 細胞を含む異種細胞の機能的局所配置に応用でき、オルガノドテクノロジーへの展開も期待される。

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 5 件)

- ① 木戸秋 悟, 微視的弾性勾配場設計による細胞運動操作, 生物物理, 査読有, 57, 135-139 (2017)
- ② 木戸秋 悟, 細胞接着界面のソフトメカニクス設計による細胞メカノバイオロジーの操作, 膜 (MEMBRANE), 査読有, 42, 78-83 (2017)
- ③ 木戸秋 悟, 細胞操作メカノバイオマテリアルの設計と幹細胞操作材料への応用, Clinical Calcium, 査読無, 26, 123-128 (2016)
- ④ 木戸秋 悟, メカノバイオマテリアル, 医学のあゆみ, 査読無, 257, 1119-1123 (2016)
- ⑤ 木戸秋 悟, 細胞操作メカノバイオマテリアル, バイオマテリアル-生体材料-, 査読無, 34, 112-119 (2016)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 木戸秋 悟, 細胞メカノバイオロジーを操作する微視的培養力学場設計, 日本機械学会 第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 2017.
- ② Satoru Kidoaki, Mechanobio-Materials Manipulating Motility and Functions of Stem Cells, 第 55 回日本生物物理学学会年会, 2017.
- ③ 木戸秋 悟, 微視的培養力学場設計による細胞行動・機能操作, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会, 2017
- ④ Satoru Kidoaki, Mechanobiomaterials manipulating motility and functions of stem cells, ISOMRM2017, 2017
- ⑤ Satoru Kidoaki, Kenta Mizumoto, Negative mechanotaxis of iPS cells observed on microelastically patterned hydrogels, Single-Cell Biophysics: Measurement, Modulation, and Modeling, 2017
- ⑥ 水本 健太, 木戸秋 悟, ラミニン固定化弾性率可変ハイドロゲル基材を用いた iPS 細胞のフィーダーフリー分散培養, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017
- ⑦ 水本 健太, 木戸秋 悟, 分散培養 iPS 細胞の増殖応答性に対するハイドロゲル表面へのラミニン修飾状態の本質的効果, 第 54 回日本生物物理学学会年会,

2016

- ⑧ 水本 健太, 木戸秋 悟, iPS 細胞の分散培養最適化のためのラミニン固定化弾性率可変ハイドロゲル基材の設計, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016
- ⑨ 木戸秋 悟, 幹細胞を操作するメカノバイオマテリアルの設計, 日本化学会 平成 27 年度先端技術講演会, 2015
- ⑩ 木戸秋 悟, 細胞を操作するマイクロ・ナノメカニクスシステム, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会, 2015
- ⑪ Satoru Kidoaki, Mechanobio-materials manipulating motility and functions of stem cells, 26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2015.
- ⑫ 水本 健太, 木戸秋 悟, ラミニン固定化弾性率可変ゼラチンゲルを用いた分散培養 iPS 細胞の増殖挙動解析, 第 37 回バイオマテリアル学会, 2015
- ⑬ Satoru Kidoaki, Ayaka Ueki, Manipulation of cell mechanotaxis by designing curvature of the elasticity boundary on hydrogel matrix, 27th European Conference on Biomaterials ESB2015, 2015

[図書] (計 2 件)

- ① 木戸秋 悟, 化学同人, “メカノバイオミメティクスによる細胞操作工学” 『CSJ Current Review 28: 持続可能性社会を拓くバイオミメティクス』 (第 13 章), 2018, 135-141.
- ② 木戸秋 悟, “メカノバイオマテリアル” 別冊・医学のあゆみ, 「メカノバイオロジーからメカノメディシンへ」 (編集: 曾我部正博), 2017, 153-157.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸秋 悟 (KIDOAKI, Satoru)
九州大学・先導物質化学研究所・教授
研究番号: 10336018

(2) 連携研究者

久保木 タッサニーヤ (KUBOKI Thasaneeya)
九州大学・先導物質化学研究所・助教
研究者番号: 20526834

(3) 研究協力者

内海 彩香 (UTUMI Ayaka)
水本 健太 (MIZUMOTO Kenta)
王 夢繁 (WANG Mengfan)