

令和元年6月5日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06875

研究課題名（和文）自発的な酸素環境の変化に伴うiPS細胞の分化スイッチング現象の解析

研究課題名（英文）Differentiation switch phenomena of iPS cells depending on culture oxygen environments

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、PMMA（酸素供給が低い）およびPDMS（酸素供給が高い）マイクロウェルチップを利用して、iPS胚様体を取り巻く酸素環境が幹細胞の分化特性に与える効果を評価した。PDMSチップのiPS胚様体は、PMMAチップよりも細胞増殖能や低酸素状態が改善された。また、PMMAチップでは肝分化が促進されるのに対し、PDMSチップでは血管系分化が促進され、酸素環境の違いによって分化スイッチング現象がみられた。これらの結果から、胚様体を取り巻く酸素環境は幹細胞特性を制御する重要な因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療や細胞アッセイなどの技術開発では、細胞特性を培養下でいかに制御するかが重要である。ここで、培養細胞の特性は栄養素、酸素、サプリメント、細胞代謝物などの様々な環境因子の影響を受ける。本研究では細胞を取り巻く「酸素環境」に着目し、酸素供給能が異なる独自の培養プラットフォームを作製してiPS細胞の特性を評価した。その結果、酸素環境の違いによって細胞の増殖性や分化状態が大きく変動することを明らかにした。これらの成果は、細胞特性を制御するための培養環境設計に重要な指針を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated that the effects of culture oxygen environments on embryoid body (EB) differentiation of iPS cells. As a culture platform, we designed PMMA microwell chip (low oxygen permeability) and PDMS microwell chip (high oxygen permeability), and then mouse iPS cells cultured in these chips. The cell proliferation and hypoxia condition of the EBs in PDMS chip were improved than those in PMMA chip. Furthermore, the vascular and hepatic differentiations of EBs were promoted in the PDMS chip and PMMA chip cultures, respectively. These results indicate that the differentiation fates of stem cells are varied by the difference of oxygen environment surrounding EBs.

研究分野：生物学

キーワード：iPS細胞 胚様体 マイクロウェルチップ 酸素 細胞分化 細胞増殖 PMMA PDMS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞（ES細胞やiPS細胞など）から分化した機能性細胞（肝細胞、心筋細胞など）を再生医療や創薬研究などへと応用するためには、幹細胞の分化特性を制御することが重要である。幹細胞の分化誘導法の一つとして、「胚様体」と呼ばれる細胞集合体を形成させて初期分化を促し、次いで各種分化誘導因子を順次作用させる手法が確立されている。この方法は、発生過程でみられる細胞形態や分化誘導因子を培養下において模倣する「発生的アプローチ」であり、目的細胞への分化が可能になってきているが、分化の方向性制御や分化効率の向上は未だに改善されるべき問題点である。

一方、我々は均質な胚様体を効率的に形成・アレイ化できる新しい培養法として、微細加工技術と表面化学修飾技術を巧みに組み合わせた「マイクロウェルチップ」技術を独自に開発してきた。そして、このチップを用いたマウスES/iPS細胞の胚様体の研究において、以下のことをこれまでに明らかにしてきた。

- ・マイクロウェル径や隣接する胚様体間の距離に依存して細胞の分化特性が変化する。
- ・従来のハンギングドロップ培養（微小液滴内で胚様体を形成させる方法）とチップ培養では細胞の分化特性が異なる。

これらの発見は、チップ培養は従来の胚様体培養法とは異なる培養環境が形成されていることを示すものである。そして、それはチップ培養に起因する自発的な酸素環境の変化が関与していることが考えられる。そこで、この現象を詳細に解析することにより、幹細胞分化における酸素環境の役割やそのメカニズム、分化に適した酸素環境条件などが明らかとなり、将来的には幹細胞の分化方向性の制御や分化効率の向上へとつながると考え、本研究の提案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロウェルチップ培養による酸素環境の変化によってiPS胚様体の分化がスイッチングする現象とそのメカニズムを明らかにし、胚様体培養における酸素環境設計の重要性を証明することを目的とした。具体的には、以下の項目を明らかにすることに取り組んだ。

- ・培養系内への酸素供給能が異なるチップを設計・作製し、iPS胚様体の分化と酸素環境の関係性を明らかにする。
- ・iPS胚様体の内部状態を解析するとともに、胚様体近傍の酸素濃度分布を明らかにする。
- ・酸素環境の変化に伴うiPS胚様体の分化スイッチング現象のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

独自に開発した「マイクロウェルチップ」を培養プラットフォームとした。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、その表面が細胞非接着分子（MPC）で修飾された構造をしている。このチップにES/iPS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1左）。

本研究では、培養系内への酸素供給能が異なるチップとして、ガス透過性が低いポリメチルメタクリレート（PMMA）製チップとガス透過性が高いポリジメチルシロキサン（PDMS）製チップを設計・作製した（図1右）。ここで、一般的な培養プラットフォーム（本研究ではPMMAチップが該当）では培養液中への酸素供給は気液界面を介して行われるのみである。これに対し、PDMSチップは気液界面を介した酸素供給に加え、PDMSを介した固液界面からの酸素供給も加わるため培養系内への酸素供給能が向上する。

これらのチップでiPS胚様体を培養し、酸素環境が細胞特性に与える効果を評価した。

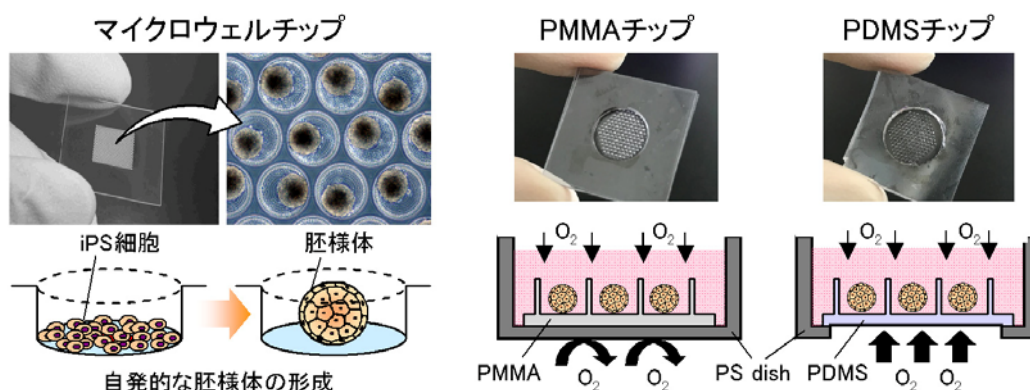


図1. マイクロウェルチップ技術

## 4. 研究成果

(1) 培養系内への酸素供給能の違いがマウスiPS胚様体特性に与える効果

作製したPMMAチップとPDMSチップの培養系内への酸素供給能を評価した結果、PDMSチップはPMMAチップに比べて約15倍高い酸素供給能を有することがわかった。両チップにおいてマウスiPS胚様体を培養すると、PDMSチップの胚様体増殖性はPMMAチップよりも飛躍的に向上

し、酸素供給環境の違いで細胞増殖性が異なることが示された。また、PMMA チップでは肝分化が促進されるのに対し、PDMS チップでは血管系分化が促進され、従来のハンギングドロップ培養と類似した分化特性を示すことを見出した (図2)。

培養系内の酸素濃度は酸素の供給速度と細胞の酸素消費速度によって決定されることから、PDMS チップ上のウェル数 (= 胚様体数) を 100 個、300 個、500 個と変化させることで胚様体近傍の酸素環境が異なる条件を作製した。iPS 胚様体はウェル数の増加に伴って分化速度が低下し、ウェル数の少ないチップでは血管系分化、ウェル数の多いチップでは肝分化が促進される傾向を示した。

これらの結果から、チップの材質や設計条件によって iPS 胚様体の分化スイッチング現象が起こり、低酸素環境は細胞分化がゆっくりと進行し、かつ肝分化が促進されやすい環境であることを見出した。

## (2) iPS 胚様体内部状態の解析

上記の検討は培養系全体の評価であることから、次に個々の iPS 胚様体内部の特性を比較した。低酸素蛍光プローブを用いて PMMA チップと PDMS チップにおけるマウス iPS 胚様体内部の酸素化状態を評価したところ、PMMA チップでは胚様体中心部において低酸素環境が発生 (体積比にして約 25% の領域) したのに対し、PDMS チップでは低酸素環境の発生はほとんど見られなかった (図3)。また、PDMS チップにおける低酸素応答遺伝子の発現は、PMMA チップに比べて著しく低かった。さらに、蛍光プローブを用いて胚様体内部の未分化状態を評価すると、PMMA チップではその中心領域に多くの未分化細胞集団が存在した。

これらの結果から、培養系内への酸素供給能の違いは、iPS 胚様体内部の酸素化状態に影響することがわかった。さらに、iPS 細胞の分化は胚様体周辺部から進行し、低酸素環境が発生する胚様体内部では未分化状態が維持されやすい傾向にあることが示唆された。

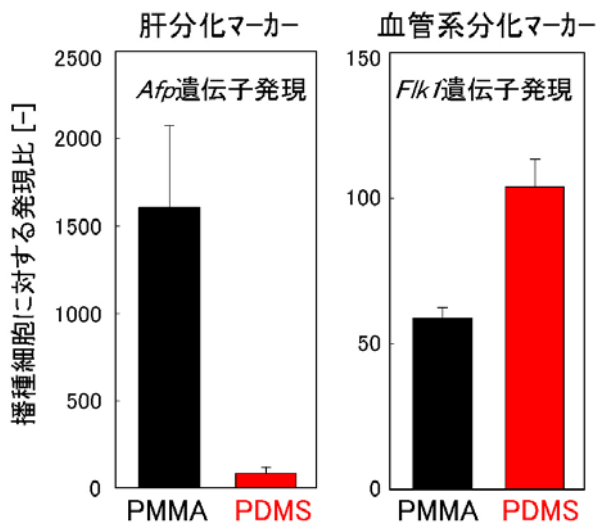


図2. iPS 胚様体の分化スイッチング

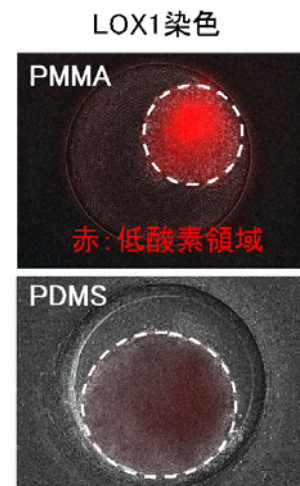


図3. 胚様体内部の酸素化状態

## (3) 培養系内の酸素濃度分布

ハンドリングや現象観察が容易な HepG2 スフェロイドをモデル評価系とし、パターンニング培養を利用してスフェロイド間隙における酸素濃度分布を評価した。具体的には、基板上に 37 個の HepG2 スフェロイドをパターンニング培養し、ニードル式マイクロ酸素センサーを用いてスフェロイド間隙における溶存酸素濃度を測定した。培養液中 (37°C) の飽和溶存酸素濃度は 6.8 ppm であるのに対し、隣接するスフェロイド間距離が 1500  $\mu\text{m}$ 、1000  $\mu\text{m}$ 、500  $\mu\text{m}$  と近づくにつれてスフェロイド間隙の溶存酸素はそれぞれ約 4 ppm、3 ppm、2 ppm へと減少した。

これらの結果より、スフェロイドの酸素消費に対して培養系内への酸素供給は十分に追いついておらず、スフェロイド近傍の酸素濃度は隣接するスフェロイド間距離に依存して低下することが明らかになった。すなわち、スフェロイドが低酸素環境へと陥る律速因子は培養液への酸素供給能であり、iPS 胚様体においても同様な現象が発生していることが考えられる。

## (4) 酸素環境応答性分化メカニズムの解析

PMMA チップと PDMS チップにおいて、マウス iPS 胚様体が分化スイッチングを起こす細胞内シグナル経路の探索を試みた。様々なシグナル因子のなかで、細胞が自己分泌するタンパク質である Wnt5a の発現に変動がみられ、そのシグナル伝達の下流に位置する細胞内酵素である AKT1 の作用が分化調節に関与している可能性を見出した。具体的には、通常酸素環境 (PDMS チップ) では下流シグナルである Akt1 の高発現に伴う血管系分化の促進が起こり、低酸素環境 (PMMA チップ) では Akt1 発現の低下に伴う Foxa2 の高発現化によって肝分化の促進が起こっていることが示唆された (図4)。

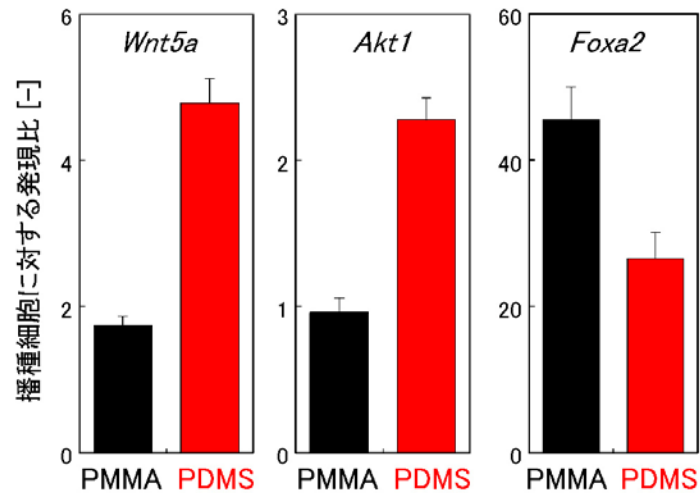


図 4. シグナル因子の遺伝子発現

#### (5) ヒト iPS 胚様体の酸素環境応答現象

上記のように、酸素環境に応答するマウス iPS 胚様体の特性変動はほぼ解明できたが、再生医療や創薬研究などへの技術展開を考えると「ヒト iPS 細胞」の酸素応答現象を明らかにする意義は大きい。そこで、マウス iPS 胚様体で確立した条件をもとにヒト iPS 胚様体でみられる現象を評価した。

マウス iPS 胚様体では酸素環境に応じて血管系分化と肝分化の分化促進スイッチング現象が起こったが、ヒト iPS 胚様体ではスイッチング現象はみられず、その代わりに酸素供給能が高い PDMS チップにおいて神経分化が飛躍的に促進されることを見出した。この結果は、細胞種によって酸素応答現象が異なる可能性を示唆するものであり、さらなる詳細な検討を進めることで酸素環境設計の重要性を明らかにできると思われる。

#### (6) マイクロウェルチップ技術の幹細胞スフェロイド培養への展開

本研究では iPS 胚様体の酸素応答性に焦点を絞って研究を進めたが、神経幹細胞スフェロイドや間葉系幹細胞スフェロイドにおいても酸素環境によって応答性が変化することを予備的に見出した。さらに、本マイクロチップ技術を利用すると、間葉系幹細胞スフェロイドの骨分化が促進することも明らかにした。

今後、各種幹細胞スフェロイドと酸素環境の関係性を明らかにすることにより、優れた培養環境設計の提案へとつながることが期待できる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ①D. Miyamoto, T. Hara, A. Hyakutake, K. Nakazawa, Changes in HepG2 spheroid behavior induced by differences in the gap distance between spheroids in a micropatterned culture system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.125, No.6, 729-735, 2018. (査読有) doi.10.1016/j.jbiosc.2017.12.013
- ②Y. Moritani, M. Usui, K. Sano, K. Nakazawa, T. Hanatani, M. Nakatomi, T. Iwata, T. Sato, W. Ariyoshi, T. Nishihara, K. Nakashima, Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells, *Journal of Periodontal Research*, Vol.53, No.5, 870-882, 2018. (査読有) doi.10.1111/jre.12577.
- ③D. Miyamoto, K. Nakazawa, Differentiation of mouse iPS cells is dependent on embryoid body size in microwell chip culture, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.122, No.4, 507-512, 2016. (査読有) doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.018

〔学会発表〕 (計 15 件)

- ①宮本大輔, 中澤浩二, PDMS 製マイクロウェルチップを用いた iPS 胚様体培養, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 2018.
- ②D. Miyamoto, K. Nakazawa, Embryoid body culture of mouse iPS cells using microwell chips with different oxygen permeability, 2018 ASCB/EMBO Meeting, 2018.
- ③O. Kitano, D. Miyamoto, K. Nakazawa, Neuronal differentiation of NT2 cells in two-dimensional monolayer and three-dimensional spheroid cultures, 2018 ASCB/EMBO Meeting, 2018.
- ④宮本大輔, 山口健太, 中澤浩二, 酸素透過性マイクロウェルチップを用いたマウス iPS 胚様体培養, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017.

- ⑤ D. Miyamoto, K. Nakazawa, Embryoid body culture of mouse iPS cells using an oxygen-permeable microwell chip, 2017 TERMIS-Americas, 2017.
- ⑥ K. Yamaguchi, D. Miyamoto, K. Nakazawa, Effect of oxygen environment on embryoid body culture of mouse iPS cells, 2016 TERMIS-AP, 2016.
- ⑦ 山口健太, 宮本大輔, 中澤浩二, iPS 胚様体を取り巻く酸素環境と幹細胞分化特性の関係, 2016 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2016.
- ⑧ D. Miyamoto, K. Nakazawa, Characteristics of mouse iPS embryoid bodies cultured on a microwell chip, 2016 TERMIS-AM, 2016.

[図書] (計4件)

- ① 井嶋博之, 水本博, 中澤浩二, 他 27 名, 情報機構, 三次元培養における培養手法と周辺技術動向, 2019, 197 (31-40) .
- ② 酒井康行, 金森敏幸, 中澤浩二, 他 46 名, シーエムシー出版, 臓器チップの技術と開発動向, 2018, 293 (245-251) .
- ③ V. Houbart, M. Fillet, E. Roy, A. Pallandre, B. Zribi, M.C.Horny, F.D. Delapierre, A. Cattoni, J. Gamby, A.M. Haghiri-Gosnet, S. Sugiura, K. Nakazawa, T. Kanamori, K. Ohnuma, 他 40 名, INTECH, Advances in Microfluidics - New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences, 2016, 420 (67-90) .
- ④ 田畑泰彦, 小原有弘, 福田隆之, 古江-楠田美保, 林洋平, 清水則夫, 西條薫, 藤岡剛, 三浦巧, 佐藤陽治, 山本雅哉, 田中賢, 中澤浩二, 土屋勝則, 藤本興治, 掛川貴弘, 木戸秋悟, 篠原満利恵, 木村圭一, 他 7 名, 情報機構, 細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・開発の留意点, 2016, 200 (127-137) .

[その他]

北九州市立大学 中澤研究室ホームページ

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

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。