

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06928

研究課題名(和文) iPS細胞由来内胚葉前駆細胞の大量創出と肝再生医療への応用に関する基盤研究

研究課題名(英文) An approach for the generation of endodermal progenitor cells from iPS cells and its application to liver regenerative medicine

研究代表者

水本 博 (Mizumoto, Hiroshi)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：90346817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中空系を用いた独自のiPS細胞の分化誘導プロセスによって、効率的に内胚葉前駆細胞を取得可能な培養プロセスの構築を試みた。中空系内部においてiPS細胞を未分化維持条件下で増殖させ、分化誘導条件に切り替える二段階培養について検討した結果、中空系内部での高密度培養を達成した。中空系内部でのiPS細胞の分化誘導について、単層培養と比較して高い分化誘導率が示された。また自発的分化の方向性は中空系径に依存することが示された。さらに、高密度条件下において内胚葉分化誘導を試みた結果、約45%の内胚葉前駆細胞の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、一般的な単層培養と比較して高い細胞密度条件下においても、中空系径を制御することにより内胚葉への分化効率を高めることが可能な三次元培養法を確立した。この結果、本手法が大量の細胞を取得可能でかつ効率的なiPS細胞由来内胚葉前駆細胞誘導プロセスとして有望になる可能性は高い。また、標的臓器細胞によって中空系径を変化させることにより、種々の臓器細胞への分化誘導プロセスへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to establish an efficient culture process to obtain endodermal progenitor cells from iPS cells using an original three-dimensional culture method using hollow fibers.

We achieved a high-cell-density culture of iPS cells in the hollow fibers by culturing cells under the undifferentiated condition and switching to differentiation-inducing condition. The differentiation efficacy of iPS cells in hollow fiber culture was higher than that of monolayer culture. We also found that the size of hollow fibers affected the differentiation fate of iPS cells. Furthermore, we attempted to induce endodermal differentiation under high-cell-density conditions using a suitable size of the hollow fiber. We found that approximately 45% of endodermal progenitor cells were obtained in the differentiation culture.

These results indicated that the hollow fiber culture would contribute to establishing an efficient differentiation culture process for iPS cells.

研究分野：生物化学工学

キーワード：幹細胞 iPS細胞 分化誘導 三次元培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、再生医療における有力な細胞源の候補である。iPS細胞は、胚性幹細胞(ES細胞)と同様に、自己複製能と分化多能性を有する多能性幹細胞である。受精卵から樹立されるES細胞と異なり、体細胞への遺伝子導入によって樹立される。従ってES細胞が持つ本質的問題である倫理的問題を回避でき、機能性細胞を用いる再生医療の分野において、目的の臓器細胞を提供できる細胞源として大いに注目されている。一方、iPS細胞を用いた再生医療の実現化には、樹立に関する基礎的な研究に加え、目的の治療を実現させる技術への円滑なトランスレートが必要とされる。すなわち、iPS細胞そのものは未成熟な細胞であり、標的臓器細胞への大量分化誘導プロセスの確立が重要である。iPS細胞から種々の臓器細胞への分化誘導について、一般的な単層培養法と種々の増殖因子を用いた分化誘導法は既に多くの研究者により検討がなされており、手法としても確立しつつある。一方、医療の現場での利用にはこれら幹細胞由来臓器細胞の大量調製プロセス、その細胞を用いた組織様構造体の構築プロセスが必須であるが、これらの検討は未だ不十分である。

### 2. 研究の目的

本研究では、代謝の中心臓器であり、不全時における根本的治療法の確立が急務となっている肝臓をターゲットとし、中空系を用いた独自のiPS細胞の分化誘導プロセスによって、効率的に内胚葉前駆細胞を取得可能な培養プロセスの構築を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中空系を用いたiPS細胞の未分化 分化の2段階培養の試行

中空系内で細胞を増殖させた後に分化誘導を行う2段階培養を用いて、iPS細胞の分化誘導プロセスにおける中空系培養の有効性について評価を行った。

内径330 $\mu\text{m}$ の中空系(旭化成メディカル製)を用いて中空系バンドルを作製した。作製した中空系バンドルに対し、ヒトiPS細胞を約 $7 \times 10^5$  cells/bundleとなるよう播種を行い、未分化維持条件下にて7日間培養を行った。その後、培養培地を変更することにより、自発的分化誘導を促す分化培養を引き続き行った。培養培地として、未分化での増殖期間はEssential 8<sup>TM</sup> medium(Thermo Fisher Scientific)を用い、また、分化培養ではEssential 6<sup>TM</sup> medium(Thermo Fisher Scientific)を用いた。評価として、培養期間中の細胞形態、細胞数変化ならびに遺伝子発現解析を行った。一方、中空系内部で分化誘導された細胞集団の分離取得を行った、まず、各培養期間において酵素処理法により中空系内部から細胞を回収した。次に、中ノ内胚葉マーカーであるCXCR4を指標とした磁気細胞分離法によりCXCR4陽性細胞の分離を行い、その割合を評価した。

#### (2) iPS細胞の分化誘導プロセスにおける中空系径効果の評価

内径の異なる2種類の中空系を用い、iPS細胞の自発的分化、並びに内胚葉への分化に与える影響について検討を行った。

内径145 $\mu\text{m}$ 、366 $\mu\text{m}$ (共にユニチカ製、以下HF145、HF366)を用いて、培養体積が等しくなるよう中空系バンドルを作製した。作製した中空系バンドルに対し、ヒトiPS細胞を約 $7 \times 10^5$  cells/bundleとなるよう播種を行い、培養を行った。iPS細胞の自発的分化培養では、培養培地はEssential 6<sup>TM</sup> mediumを用い、10日間の培養を行った。評価として培養期間中の細胞数変化を評価すると共に、分化能評価として三胚葉それぞれの代表的なマーカーを用いた遺伝子発現解析を行った。内胚葉への分化誘導培養では、培養培地はEssential 6<sup>TM</sup> mediumを用い、分化誘導因子として、Activin A(100 ng/mL)を培地中に添加した。評価として培養期間中の細胞数変化を評価すると共に、遺伝子発現解析、並びにFACS解析による特異的細胞集団の発現割合を評価した。

#### (3) 効率的な内胚葉分化誘導のための2段階培養の試行

中空系内で効率的な細胞増殖と分化誘導を行うため、2段階培養を試みた。

内径106 $\mu\text{m}$ (ユニチカ製)の中空系を用いて、中空系バンドルを作製した。作製した中空系バンドルに対し、ヒトiPS細胞を播種後、未分化維持条件下にて増殖培養を行った。中空系内部において細胞密度が約 $3 \times 10^8$  cells/cm<sup>3</sup>となった時点より、培養培地を内胚葉分化誘導培地に変更し、分化培養を開始した。評価として培養期間中の細胞数変化を評価すると共に、内胚葉マーカーであるSOX17の遺伝子発現解析、FACS解析による発現割合の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 中空系を用いたiPS細胞の未分化 分化の2段階培養

中空系内部において、iPS細胞は最初の7日間において約10倍に増殖した。その後の分化誘導条件下での培養では、増殖活性は低下しつつも増殖を維持し、培養17日で約23倍に増殖した(図1)。このとき、中空系内部での細胞密度は $1.4 \times 10^9$  cells/cm<sup>3</sup>の高密度培養を達成した。iPS細胞は中空系内部において円柱状の凝集塊を形成し、その凝集塊が中空系長さ方向に成長しながら増殖している様子が観察された(図2)。培養期間中の遺伝子発現の解析の結果、内胚葉マ

ーカー (SOX17) 中ノ内胚葉マーカー (CXCR4) 肝細胞マーカー (HNF4、ALB、TD02) 中胚葉マーカー (MSX1) 外胚葉マーカー (PAX6、OTX2) の経時的な増加が観察され、自発的な分化が進行していることが示された。

次に、分化培養過程において、CXCR4 を指標とした磁気細胞分離を行った。この結果、培養 12 日目における陽性細胞率は約 30% 程度であった。これは単層培養と比較すると約 2 倍の高値であった (図 3)。

以上の結果、中空系培養は iPS 細胞の高密度培養が可能であり、また自発的な分化の効率は単層培養と比較して高いことが示された。

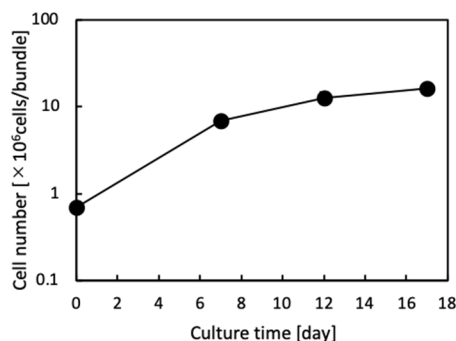


図 1 中空系内での細胞数変化

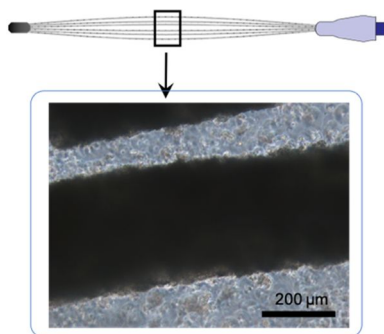


図 2 中空系内部での細胞形態

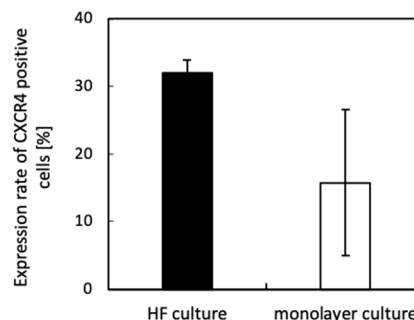


図 3 CXCR4 陽性細胞の発現解析

## (2) iPS 細胞の分化誘導プロセスにおける中空系径効果

培養 10 日間における細胞増加率は約 4 倍であった。それぞれの培養系における内胚葉マーカー (SOX17) 中ノ内胚葉マーカー (CXCR4) 中胚葉マーカー (Brachyury T, MSX1) および外胚葉マーカー (PAX6, OTX2) の遺伝子発現解析を行った。この結果、中胚葉系マーカーでは HF366 において発現が高く、外胚葉系マーカーでは HF145 において発現が高いことが示された。一方、内胚葉マーカーである SOX17 の発現では両条件において明確な違いは見られなかった。

次に、内胚葉への分化培養では、培養 5 日間の間で両培養系ともに細胞数はほとんど変化しないことが示された。SOX17 を内胚葉マーカーとした遺伝子発現解析と FACS 解析による SOX17 発現陽性細胞の割合について評価した結果、遺伝子発現レベル、陽性細胞の発現割合のいずれも HF143 で高い値が示された。さらに、内胚葉分化を行った細胞に対し、既報の肝分化誘導法を適用した結果、培養 15 日目において代表的な肝機能であるアンモニア除去能、アルブミン分泌能の発現が認められた。

以上の結果、iPS 細胞の自発的な分化過程において、中空系径が分化傾向に影響を与えることが示された。すなわち、2 つの中空系径の比較では、大口径の中空系を用いた方が中胚葉へ分化しやすく、また小口径の中空系を用いた方が外胚葉へ分化しやすい傾向が示された。一方、外的刺激因子として Activin A を添加した内胚葉分化誘導では、小口径中空系において内胚葉への分化効率が高いことが示された。この結果、分化誘導プロセスに応じて適切な中空系径を選択することにより、分化誘導プロセスの効率化が図れることが示された。

## (3) 効率的な内胚葉分化誘導のための 2 段階培養

本検討では、約  $3.2 \times 10^8$  cells/cm<sup>3</sup> に達するまで未分化維持条件で前培養を行い、その時点から 5 日間の分化培養を行った。この結果、分化誘導開始後も iPS 細胞は培養 5 日間で 2 倍程度の増殖活性を示した。SOX17 の遺伝子発現解析、および SOX17 陽性細胞の割合評価を行った結果、中空系径の小口径化に伴い、SOX17 の遺伝子発現量ならびに陽性細胞の発現割合は増加することが示された。この結果、約  $6 \times 10^8$  cells/cm<sup>3</sup> という高細胞密度条件下において、約 45% の SOX17 陽性細胞を得ることが出来た。

以上の結果、単層培養と比較して高い細胞密度条件下においても、中空系径を制御することにより内胚葉への分化効率を高めることが可能であることが示された。さらなる調査が必要になるが、本手法が大量の細胞を取得可能でかつ効率的な内胚葉分化細胞誘導プロセスとして有望になる可能性は高い。今後、内胚葉以降への成熟化 (肝細胞分化等) を検討するとともに、さらなる高効率化を図りたい。また、中空系径の検討により、心筋細胞などのその他の臓器細胞分化誘導プロセスへの応用についても検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Yu, Iwanaga Shinya, Mizumoto Hiroshi, Kajiwara Toshihisa	4. 巻 70
2. 論文標題 Evaluation of hollow fiber culture for large-scale production of mouse embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 975～982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-018-0210-z	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 -

1. 著者名 Matsushita Sakiko, Kajiwara Toshihisa, Mizumoto Hiroshi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Expansion and differentiation of human iPS cells in a three-dimensional culture using hollow fibers and separation of the specific population by magnetic-activated cell sorting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.014">https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.014</a>	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 -

1. 著者名 Mizumoto Hiroshi, Amimoto Naoki, Miyazawa Toru, Tani Hideki, Ikeda Kaoru, Kajiwara Toshihisa	4. 巻 7
2. 論文標題 In vitro and ex vivo Functional Evaluation of a Hollow Fiber-type Bioartificial Liver Module Containing ES Cell-derived Hepatocyte-like Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advanced Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 18～27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14326/abe.7.18	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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 水本博, 大賀美帆, 松下沙希子, 梶原稔尚
2. 発表標題 iPS細胞の三次元分化誘導培養における凝集体形状効果
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水本博, 奥平達也, 藪田涼平, 梶原稔尚
2. 発表標題 スフェロイドを用いたボトムアップ法による肝-内皮-間葉系複合培養組織の構築
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第31回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水本博, 佐々木浩二, 藪田涼平, 梶原稔尚
2. 発表標題 ボトムアップ法によるファイバ型肝組織構築と再生医療への応用
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Huaixu Liu, Hiroshi Mizumoto, Masamichi Kamihira, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Functional Evaluation of a Hepatic Tissue Constructed from Multicellular Spheroids
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakiko Matsushita, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Isolation and characterization of an endodermal cell population in a three-dimensional culture of human iPS cells using hollow fibers
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yue Yue , Yu Nakano , Kohji Sasaki , Yuki Naruo , Nana Shirakigawa , Hiroyuki Ijima , Hiroshi Mizumoto , Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Functional analysis of heparin-conjugated collagen gel as a scaffold for regenerative medicine
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Mizumoto , Tatsuya Okudaira , Ryohei Yabuta , Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Construction of a fiber-type hepatic tissue by bottom-up method using multilayer spheroids of hepatocytes, endothelial cells and mesenchymal cells
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大賀美帆, 松下沙希子, 水本博, 梶原稔尚
2. 発表標題 中空糸を用いたiPS細胞の分化誘導培養における中空糸径効果
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下沙希子、水本博、梶原稔尚
2. 発表標題 中空糸内三次元培養を用いたiPS細胞由来内胚葉系細胞の大量調製に関する基礎検討
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水本博、赤岡智彬、梶原稔尚
2. 発表標題 中空系を用いた肝組織形成プロセスの最適設計-組織形成誘導過程における生存率評価-
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水本博、赤岡智彬、梶原稔尚
2. 発表標題 中空系内三次元培養を用いた肝組織形成誘導プロセスにおける中空系径効果
3. 学会等名 化学工学会第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江本雄一、水本博、白木川奈菜、井嶋博之、梶原稔尚
2. 発表標題 幹細胞の高密度培養プロセスのための増殖因子徐放粒子の開発
3. 学会等名 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藪田涼平、奥平達也、水本博、梶原稔尚
2. 発表標題 ボトムアップ法による肝-内皮-間葉系細胞からなる培養組織の構築と性能評価
3. 学会等名 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤岡智彬、水本博、梶原稔尚
2. 発表標題 中空系を用いた肝組織形成誘導プロセスにおける中空系径効果
3. 学会等名 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水本博
2. 発表標題 中空系型培養器による多能性幹細胞の大量培養
3. 学会等名 第37回動物細胞工学会シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Mizumoto, Naoki Amimoto, Toru Miyazawa, Hideki Tani, Kaoru Ikeda, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 In vitro and ex vivo functional evaluation of a hollow fiber-type bioartificial liver module containing ES cell-derived hepatic cells
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Mizumoto, Tatsuya Okudaira, Ryohei Yabuta, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Functional and structural analysis of a fiber-type hepatic tissue fabricated by a bottom-up method using multilayer spheroids
3. 学会等名 TERMIS AP 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Sakiko Matsushita, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 Generation of Endodermal Cells from Human iPS Cells in A Three-Dimensional Culture Using Hollow Fibers
3. 学会等名 TERMIS AP 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yu Nakano, Shinya Iwanaga, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 HEMATOPOIETIC DIFFERENTIATION OF MOUSE AND HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS IN A THREE-DIMENSIONAL CULTURE USING HOLLOW FIBERS
3. 学会等名 Biomaterials International 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sakiko Matsushita, Hiroshi Mizumoto, Toshihisa Kajiwara
2. 発表標題 GENERATION OF ENDODERMAL CELLS FROM HUMAN IPS CELLS IN A THREE-DIMENSIONAL CULTURE USING HOLLOW FIBERS
3. 学会等名 Biomaterials International 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroshi Mizumoto, Nana Shirakigawa, Hiroyuki Ijima	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 256
3. 書名 Current Status and New Challenges of the Artificial Liver (in: Biomedical Engineering Challenges: A Chemical Engineering Insight)	

〔産業財産権〕

[その他]

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001447/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----