

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23596

研究課題名(和文)合成ハイドロゲルによるES/iPS細胞機能制御の開発

研究課題名(英文)Development of synthetic polymer gels that control the function of ES/iPS cells

研究代表者

廣田 聡 (Hirota, Akira)

北海道大学・化学反応創成研究拠点・博士研究員

研究者番号：20847181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハイドロゲルは網目状構造内に多量の水分子を含む高分子であり、生物組織と類似した特徴を持つことから、バイオマテリアルとしての応用が期待されている。本研究において、ES/iPS細胞を種々の合成ハイドロゲル上で培養し、未分化状態の維持が可能であること、また、いくつかの合成ハイドロゲル上では分化能に影響を与えることが分かった。さらに、ハイドロゲル表面の電荷が幹細胞機能に大きく影響することを見出し、培養基板の電荷が幹細胞に与える影響とこれに反応する分子メカニズムの一端を解明することができた。以上の成果は、電荷によって幹細胞機能の制御することができる新たなバイオマテリアルの開発につながると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は様々な環境情報を認識し、その変化に適切に反応しつつ複雑な器官形成や恒常性の維持を可能とする。ES/iPS細胞などの多能性幹細胞でも、周囲の環境の微妙な変化が、未分化性や分化能に重大な影響を及ぼす。本研究により、組成が明確な合成ハイドロゲルを用いることで、幹細胞機能を制御する新たな足場の物理的な性質とその分子メカニズム一端を明らかにした。これは「細胞外基質の様々な性質が幹細胞の機能にどのように影響するのか」という細胞生物学上の重要課題の解明に貢献するものである。今後、この成果を端緒として合成培養基質により幹細胞機能を自在に制御するという再生医療研究の新たな潮流を創造できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Hydrogels harboring features similar to those of the biological tissues have been expected as a promising source of biomaterials. In this study, we aimed to apply synthetic hydrogel technologies to the culture and control of ES/iPS cells. We found that ES/iPS cells can be maintained in an undifferentiated state with distinct cellular morphologies on various synthetic hydrogels. In addition, we also found that lineage specification of pluripotent stem cells was affected on some synthetic hydrogels. Furthermore, we found that the charge on the hydrogel surface has a significant effect on the stem cell function, and elucidated partially the underlying molecular mechanism. These findings will be a basis for future studies aiming to establish novel methods to control functions of ES/iPS cells by using synthetic hydrogels.

研究分野：幹細胞生物学分野

キーワード：ES/iPS細胞 合成ハイドロゲル バイオマテリアル 幹細胞ニッチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の機能は周囲の環境からの様々な刺激に応じて変化し、この細胞の応答機構を理解することが複雑な生命現象の理解に不可欠である。特に、高い自己複製能と多分化能を持つ多能性幹細胞の機能は、細胞外環境からの刺激や細胞間の情報伝達によって複雑に変化し、その背景にある分子機構の解明が幹細胞を用いた再生医療研究の重要課題となっている。これまでの研究では、細胞外環境を構成する要因のうち、増殖因子など液性因子の作用については様々な検討がなされており、複数の液性因子を組み合わせて幹細胞機能を制御する多数のプロトコルが報告されている。一方、細胞の足場となる細胞外基質も細胞機能に影響することが知られており、間葉系幹細胞では基質の硬さによって分化方向が変化することが知られている (Engler AJ, 2006, Cell)。しかし、細胞が足場から受ける刺激を体系的に理解するためには、プラスチックディッシュを特定のタンパク質でコートしている従来の方法では生体内の多様な環境を十分に再現出来ていないことや、これまでに検討された基質の多くは生物材料に由来しており、成分の複雑さや性質を厳密に調整できないことなどの問題があった。そのため、「細胞外基質の様々な性質が幹細胞の機能にどのように影響するのか？」という幹細胞生物学の重要な問いの解明には未だ遠いのが現状である。そこで申請者は、培養基質の物理化学的および生物学的性質をより自在かつ厳密に調節し、細胞の変化を調べることができる新しい培養法の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、組成を自由に変更することが可能であり、かつ物理化学的な性質を厳密に調節できる合成ハイドロゲルを用いて細胞外基質が ES/iPS 細胞の機能に影響する基本原理を解明し、その知見を応用することでこれらの多能性幹細胞の自己複製能や分化能を制御する新しい方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では組成や性質が異なる様々なハイドロゲルを多能性幹細胞の培養基板として使用し、維持培養や分化誘導を行う。合成ハイドロゲル上で培養された ES/iPS 細胞の自己複製能が可能であるかを細胞増殖や未分化マーカーの発現量を評価した。さらに、ゲル上で分化誘導を行った場合の分化マーカーの発現パターンの変化と分化に関わるシグナル活性の変化を解析し、分化能への影響を調べた。さらに、ゲル上で培養もしくは分化誘導を行った細胞の遺伝子発現変化を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

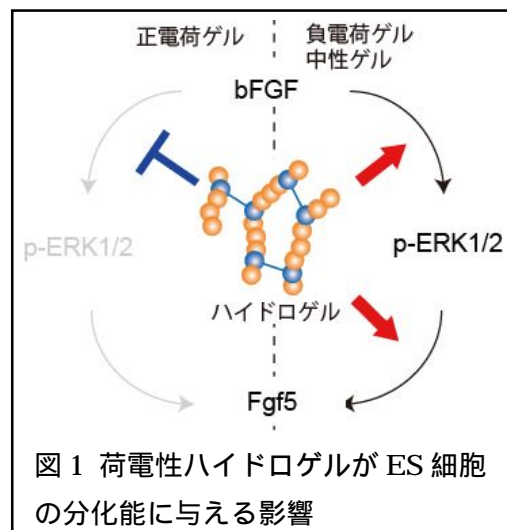
4. 研究成果

(1) まず初めに、モノマーの組成が異なる種々の合成ハイドロゲル上でマウス ES 細胞を培養した。通常の培養方法であるゼラチン上での培養と比較して、ハイドロゲル上では細胞形態に変化が見られた。Double-Network ゲル上で培養した ES 細胞は、浮遊して凝集塊を形成し、その他のゲルの場合では、細胞はゲルに接着し、通常よりもコンパクトなコロニーを形成した。続いて、通常の培養方法とゲル上で培養したマウス ES 細胞の未分化マーカーと分化マーカーの発現を qRT-PCR により解析した。ハイドロゲル上で培養した場合でも ES 細胞は未分化状態を維持しており、LIF 不含培地で分化誘導を行った場合では、ハイドロゲル上で培養した細胞は中内胚葉系列の分化マーカーの発現が顕著に上昇していた。これらの結果から、合成したハイドロゲル上でマウス ES 細胞を維持培養することが可能であることが明らかになり、ゲル上で分化誘導を行った際に分化方向に偏りが生じていたこと

から、今回使用したゲルが持つ物理化学的な性質が細胞に影響を与えることが分かった。

(2) 上記の結果から、ハイドロゲルが持つ性質のうち、どのような物理的性質が細胞機能に影響を与えるかを検討し、ハイドロゲル表面の電荷が、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞の自己増殖能や分化能に与える影響に焦点をあてて研究を行った。申請者はまず、表面電荷のもつ役割について解析するために必要な荷電状態の異なるハイドロゲルの作製を行った。正の電荷を持つモノマーと負の電荷を持つモノマーを様々な割合で混合し、共重合させることで荷電状態の異なるハイドロゲルを作製した。作製したハイドロゲルを用いて培養を行ったところ、ES/iPS 細胞には、細胞接着において最適な荷電状態が存在することが明らかになり、動物種で接着に適した荷電状態が異なることが分かった。また、ヒト iPS 細胞を電荷の異なるハイドロゲル上で培養したところ、ハイドロゲル上で培養されたヒト iPS 細胞は、ドーム状のコロニーを形成した。この細胞では KLF4 の発現量が亢進しており、Naïve 型ヒト iPS 細胞の特徴を有している可能性を示唆していた。

(3) 次に、足場における表面荷電の違いが幹細胞の分化能に影響を及ぼすか検証した。正の電荷を持つハイドロゲル上で培養したマウス ES 細胞の未分化マーカーと分化マーカーを qRT-PCR により解析した結果、このゲル上で培養した細胞では、未分化マーカーの発現に影響はないが、分化誘導に対しては抵抗を示す傾向があることが分かった。そこで、荷電性ハイドロゲルは幹細胞の分化初期に、すでに影響を及ぼしていると考え、マウス ES 細胞から Epiblast-like cells (EpiLCs) への分化に培養基板の電荷が影響するか検証した。未分化マーカー-Rex1 と



分化マーカー-Fgf5 の発現量を qRT-PCR で解析したところ、正電荷から負電荷になるにしたがって分化が促進していることが分かった。また、この時のシグナルの変化をウェスタンブロットにより解析したところ、正電荷を帯びたゲル上で培養した細胞では、自己複製に関わるシグナル(p-STAT3)が維持されており、分化を促すシグナル(p-ERK1/2)が抑制されていることが分かった。このように、正に帯電したゲル上で分化誘導を行った場合では、分化で重要とされている FGF 経路が障害されており、未分化状態を保っていることが明らかになった(図 1)。これは、電荷の情報が細胞膜上の受容体を介して細胞内に伝達され分化誘導に影響を与えたと考えられる。このように、これまで全く未知であった培養基板の荷電状態が多能性幹細胞の機能に影響を与えるメカニズムの解明につながる新たな知見を得ることができた。最後に、荷電性ハイドロゲル上で分化誘導を行ったマウス ES 細胞の遺伝子発現変化を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。その結果、正電荷ゲル上で誘導された細胞の状態は分化前に近く、中性及び負電荷ゲル上で誘導した細胞の状態は分化後に近いことが明らかになった。

以上のように、本研究において性質の異なる多様な合成ハイドロゲル上で ES/iPS 細胞を培養し、細胞機能に与える影響を解析した結果、培養基質表面の組成や電荷が ES/iPS 細胞の未分化性や分化能に影響を与えることを示した。今後、足場の荷電が幹細胞に与える分子メカニズムをより詳細に明らかにしていくことで、荷電性ハイドロゲルを用いた新たな幹細胞機能の制御方法の開発につながると考えている(図 2)。

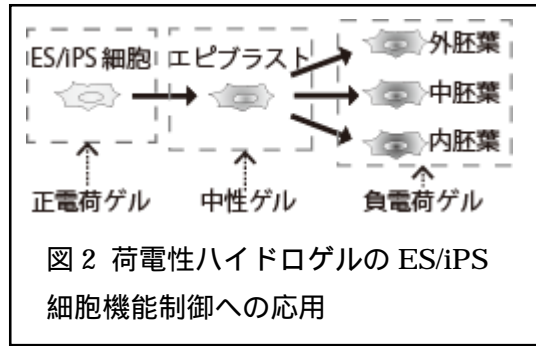


図 2 荷電性ハイドロゲルの ES/iPS 細胞機能制御への応用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 廣田 聡
2. 発表標題 合成ハイドロゲルによる多能性幹細胞機能制御の開発
3. 学会等名 第16回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣田 聡
2. 発表標題 多能性幹細胞の機能を制御する合成ハイドロゲルの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Hirota
2. 発表標題 Development of synthetic polymer gels that control the function of pluripotent stem cells
3. 学会等名 2nd ICRoDD Internatioanl Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Hirota
2. 発表標題 Development of synthetic polymer gels that control the function of mouse embryonic stem cells
3. 学会等名 3rd ICRoDD Internatioanl Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------