

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21560809

研究課題名（和文） 培養皿の培養面に塗布した機能物質による多能性幹細胞（ES・iPS細胞）の分化制御

研究課題名（英文） Control of the differentiation of pluripotent stem cells (ES・iPS cells) by culture surface coated with functional compounds.

研究代表者

黒澤 尋（KUROSAWA HIROSHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10225295

研究成果の概要（和文）：

本研究では、培養面にコーティングした機能物質により、多能性幹細胞（ES や iPS 細胞）に由来する胚様体（embryoid body: EB）の分化状態をコントロールすることを試した。EB のサイズについては、機能物質の種類に関わりなくほぼ同じ大きさとなった。0.5%および 10%-PL で形成した EB では心筋への分化率が低く、MPC では分化率が高かった。中胚葉系マーカー遺伝子  $\alpha$ -MHC および内胚葉系のマーカー遺伝子 TTR の発現率は、MPC において高く、PL では低かった。しかし、継代培養時の細胞の状態が、EB 形成に大きく影響するため、培養表面の機能物質の影響を正確に評価することは困難であった。このため、実験に供する細胞の質をコントロールすることの重要性が再認識された。

研究成果の概要（英文）：

In this study we have attempted to control the differentiation of embryoid bodies (EBs) derived from pluripotent stem cells (ES and iPS cells) by functional compounds. The functional compounds hardly influenced the size of EBs. The generation efficiency of beating cardiac cells was low in the EBs formed under 0.5% and 10%-PL, and high in those formed under MPC. The expression levels of  $\alpha$ -MHC (mesoderm marker) and TTR (endoderm marker) were high in the EBs formed under MPC and low in those formed under PL. However, the activity and pluripotency of the cells at passage stage greatly affected the EB formation. The heterogeneity in cell quality before EB formation made more difficult to properly evaluate the real effect of functional compounds on the EB formation. We reaffirmed the importance of controlling the quality of the cells before use on the experiments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオ生産プロセス、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞及び iPS 細胞 (Takahashi and Yamanaka, *Cell*, **126**, 663 (2006)) は、再生医療のための細胞供給源として期待されている多能性幹細胞である。再生医療の実用化に向けて確立されるべき重要な技術の一つとして、多能性幹細胞の *in vitro* 分化誘導法がある。これら多能性幹細胞から特定の細胞種を分化誘導する場合に、分化誘導の中間段階で胚様体 (EB) が形成される。胚様体 (EB) は、多能性幹細胞を効率的に分化誘導するシステムとして広く研究に用いられているが、EB 形成のためのプロトコールは種々存在し、形成されてくる EB の分化状態も様でなかった。このことは、EB の分化状態がきちんと制御されていないことを意味し、分化誘導結果に十分な再現性が得られない一因となっていた。これまでの研究 (基盤研究 (C) H18-19 年度) において、我々は初期細胞数や培養方法の違いが、形成されてくる EB の分化状態に大きく影響することを明らかにし、リン脂質ポリマーをコートした細胞非接着性の 96-well plate を用いることによって、EB 形成条件を厳密に設定することが可能となり、EB 形成の再現性を高めることに成功した (Koike *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 294 (2007))。また、予備的な研究より、細胞が接する培養容器表面の性状が EB の分化状態に影響することがわかった。すなわち、培養面に荷電状態の異なるリン脂質ポリマーをコーティングすると、分化状態の異なる EB が形成された。このことは、培養容器表面の性状を適宜デザインして、培養基材から細胞へ働きかけるシグナルの強度や種類を変化させることによって、形成されてくる EB の分化状態をコントロールできる可能性があることを示すものである。

本研究では、培養容器表面に配した機能物質により、多能性幹細胞由来 EB の分化状態を任意にコントロールできるようにする。同時に、ES 細胞と iPS 細胞の機能物質に対する応答性の違いについても検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、培養容器の培養面にコーティングした機能物質により、多能性幹細胞 (ES や iPS 細胞) に由来する胚様体 (embryoid body: EB) の分化状態をコントロールすることを試みる。胚様体 (EB) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の *in vitro* 分化誘導システムとして広く用いられている。従って、ある種の細胞が多能性幹細胞から誘導される効率は、EB の分化状態、すなわち「品質」に大きく影響されることになる。そのため、EB の「品質」を管理することが再生医療を実用化する上での重要課

題となっている。

EB の分化状態に影響を与える因子には種々あるが、本研究では、培養容器の培養面の細胞に対する働きかけに注目して、培養面の機能によって EB の分化状態をコントロールすることを目的とする。また、マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞での検討結果を比較することによって、ES 細胞と iPS 細胞の分化傾向の差異を明らかにする。

## 3. 研究の方法

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンからなるリン脂質ポリマー (MPC)、負に荷電している MPC ポリマー (Negative charge; NC)、10% Pluronic F127 (10%-PL)、および 0.5% Pluronic F127 (0.5%-PL) を 96-well 丸底プレートにコートした。ここにマウス ES 細胞 (129/svev) を 1000 cells/well となるように播種し、5 日間の浮遊培養を行い、EB を形成した。また、同時に 1000 cells/50  $\mu$ l でハンギングドロップ (HD) 法により EB を形成した。形成された EB を接着培養し、拍動を伴った心筋の発生を確認した。また、形成された EB の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

機能性物質を添加して、その影響を調べた。機能性ポリマー 10 種類を 0.1% (w/v) 含む EB 形成培地を用い、丸底 96-well plate にて EB 形成を行った。

## 4. 研究成果

### (1) EB 形成中の EB の直径

形成された EB の形状および大きさに関しては、機能物質の種類に関わりなくほぼ同じ大きさとなった。EB の円形度は、培養期間 3 日が最も高く、それ以上になると低下する傾向が見られた。しかし、10%-PL にて形成した EB は培養 5 日目においても高い円形度を維持していた。ほとんど差は見られなかった (Fig. 1)。

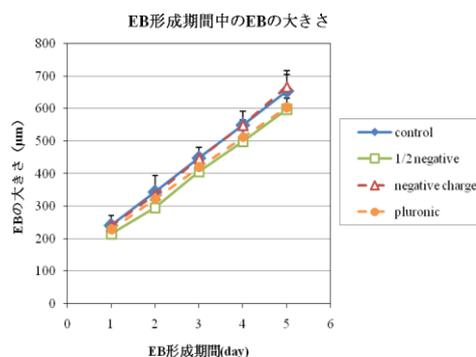


Fig. 1 EB 形成期間中の EB の大きさ

## (2) 拍動率

拍動を伴った心筋を発生した well の割合を拍動率として設定し、評価を行った (Fig. 2)。MPC plate で形成した EB (control) を接着培養に移すと、6 日目にはほぼすべての well で拍動を伴う心筋が観察できた。PL plate で形成した EB は心筋の発生が他の条件よりも遅れる傾向にあった。一方、1/2 NC plate および NC plate で形成した EB は control よりも心筋の発生が若干早かった。0.5%-および 10%-PL で形成した EB では分化率が低く、MPC では分化率が高かった。培養 5 日目の EB における遺伝子発現を RT-PCR で解析したところ、中胚葉系マーカー遺伝子  $\alpha$ -MHC および内胚葉系のマーカー遺伝子 TTR の発現率は、MPC において高く、PL では低かった。本研究で使用した機能物質をコートした培養面は異なる接触角 (疎水性) を示したが、接触角と分化傾向の関連性は見られなかった。

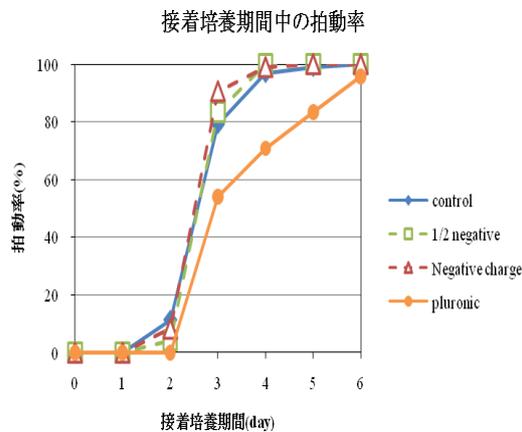


Fig. 2 接着培養期間中の拍動率

## (3) MPC plate と NC plate で形成した EB の拍動率

MPC plate と NC plate で形成した EB の拍動率を Fig. 3 に示した。接着培養 3 日目の拍動率に差が出たので有意差検定を行った。過去 4 回の結果 (Fig. 3A) では  $P=0.28$  となるが、過去 3 回の結果 (Fig. 3B) では  $P<0.05$  となる。さらに、各回の結果は 4 回とも NC plate の方が MPC plate よりも 8% から 12% 程度 (平均で 11.46%) 拍動率が高かった。

## (4) 考察

- ① 形成された EB の大きさに関して差は見られなかった。
- ② PL plate で形成した EB では心筋の発生が遅れる傾向を示した。

- ③ NC plate では心筋の発生が早くなる傾向が見られた。MPC plate との差はわずかであるが、4 回の実験を行った結果、いずれも NC plate で形成した EB からの心筋発生時期が早くなった。
- ④ NC plate は心筋の発生を促進する可能性が示唆された。

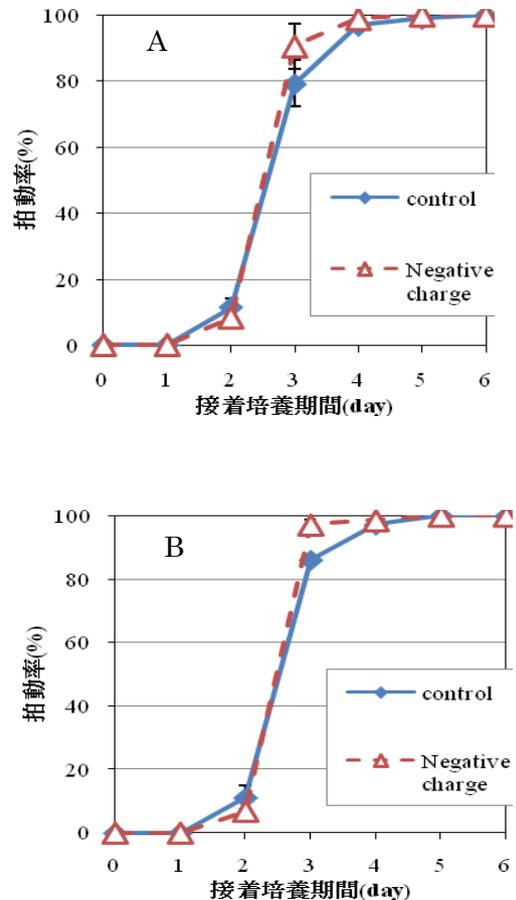


Fig. 3 Control と Negative Charge の拍動率

## (5) まとめ

培養表面の機能物質が EB の分化状態に影響を及ぼすことは明らかになったが、分化状態をコントロールするには、さらなる検討が必要であった。ES 細胞と iPS 細胞では、同じマウス由来の細胞であっても、機能物質に対する応答性は異なった。ヒト iPS 細胞とマウス ES 細胞では応答性はさらに大きく異なり、マウス ES 細胞の結果をもって、ヒト iPS 細胞への機能物質の影響を推定することは不可能であることが示された。また、EB 形成以前の細胞の状態、すなわち継代培養時の細胞の状態 (未分化性や活性) が、EB 形成に大きく影響するため、培養表面の機能物質の影響を正確に評価することは困難であった。このため、細胞の継代培養の条件を厳し

く設定し、実験に供する細胞の質をコントロールすることの重要性が再認識された。

#### 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 1 件)

1) Mochizuki, H., Ohnuki, Y., Kurosawa, H. Effect of glucose concentration during embryoid body (EB) formation from mouse embryonic stem cells on EB growth and cell differentiation. *J. Biosc. Bioeng.*, 111: 92-97 (2011). (査読付き)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 大貫 喜嗣、黒澤尋、ハンギングドロップ法による胚様体形成における初期細胞数がマウス ES 細胞分化に及ぼす影響、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月 28 日 (宮崎シーガイア)
- 2) 大貫 喜嗣、黒澤尋、培養器材がマウス ES 細胞の胚様体分化に及ぼす影響、第 9 回日本再生医療学会総会、2010 年 3 月 18 日 (広島国際会議場)
- 3) 大貫 喜嗣、黒澤尋、マウス ES 細胞の胚様体分化に及ぼす培養面コート剤の影響、第 61 回日本生物工学会大会、2009 年 9 月 24 日 (名古屋大学)

[その他]

ホームページ等

[http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/kenkyu/index.php?content\\_id=6](http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/kenkyu/index.php?content_id=6)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

黒澤 尋 (KUROSAWA HIROSHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：10225295

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし