

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25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21684024

研究課題名（和文） ゆらぐ分化誘導情報に対する幹細胞の応答特性

研究課題名（英文） Differentiation response of stem cells in noisy induction environments

研究代表者 若本 祐一（WAKAMOTO YUICHI）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：30517884

研究成果の概要（和文）：

幹細胞は外部シグナルや内因的に生成される情報に基づき、さまざまな細胞タイプへ分化できる。この細胞分化がどのような論理に基づいて起こるのかを正しく理解するには、従来の幹細胞研究で用いられてきた集団計測だけでなく、個々の細胞の時間的な状態変化を実験者側から制御された環境下で調べることのできる新たな計測ツールが必要となる。本研究課題では、このような計測を実現する1細胞計測技術を開発し、それを用いてマウスES細胞の分化応答を1細胞レベルで解析することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Stem cells can differentiate into different cell types according to external cues and intrinsically generated information. For understanding the logic of stem cell differentiation, an experimental tool that allows the measurement of state transition of stem cells under controlled environmental conditions is required in addition to conventional population-level measurements. In this research project, we developed a new single-cell analysis device and applied it to the study on differentiation response of mouse ES cells at the single-cell level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	20,600,000	6,180,000	26,780,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学、生物物理・化学物理

キーワード：生物物理

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的背景

細胞内の遺伝子発現は、反応に関わる分子

の少数性などに起因する必然的なゆらぎをもつ。この遺伝子発現のゆらぎは、原核生物・真核生物を問わず見られるものであり、また、程度には差があれ、細胞や遺伝子の種類にもよらず、一般的に観察される現象であ

る。したがって、細胞の状態はどのような定常環境に置かれたとしても、時間的にゆらぐことになる。

一方で、生体内での各細胞の周囲の環境は、さまざまな種類の細胞や細胞外基質からなる複雑な構造となっており、各細胞が受け取るシグナル因子などの環境情報それ自体も大きくゆらぐと考えられる。周囲の分化誘導情報にしたがってさまざまな細胞に分化すると考えられる幹細胞が置かれる環境も例外ではなく、ひとつひとつの幹細胞は、そのような不安定な誘導情報をもとに、分化をするか否か、もしするならば、どの方向へ分化するかということを決定しなければならない。

では、内部の状態にすでに揺らぎをもつ幹細胞が、不安定な誘導情報に対して、どのようなメカニズムで安定に分化するのだろうか？

一般には各組織に存在する幹細胞の数は少なく、初期胚発生でも、ごく少数の細胞から安定に分化が起こる。したがって、幹細胞の分化安定性、再現性の背景には、細胞を多数個用意し、大数性で分化細胞の構成比を保つという単純な機構とは別の原理が存在する可能性が高い。

(2) 1細胞レベルでの幹細胞の分化応答特性

これまでの幹細胞の研究では、多数の幹細胞を用意し、その集団に対して分化誘導刺激を与え、応答特性を探るという手法が一般的に用いられてきた。しかし、この計測で得られる結果は、あくまで集団で均された平均的応答であり、個々の細胞の振る舞いにばらつきがある場合、細胞それ自体の応答特性の情報は大きく失われている。さらに本質的な問題として、個々の細胞の内部状態に依存して、増殖率や死亡率といった適応度に違いがある場合、集団の計測値は、内部の細胞の状態変化と、状態差に依存した適応度にもとづく集団内自然選択の効果を反映した量になるという問題がある(Wakamoto, et al. (2012) Evolution)。通常の生物実験では、後者の影響はほとんど無視され、もっぱら集団の平均値の変化が内部の細胞状態の変化によると考える場合が多い。しかし分化状態に応じて分裂率などが大きく変化する幹細胞の分化現象では、適応度差の影響は無視できない。

このような問題を解決するためには、ひとつひとつの幹細胞の分化誘導シグナルに対する応答と、分裂率や死亡率といった適応度の変化を同時に計測し、ばらつきも含めた1細胞の応答と集団レベルで観察される平均的応答との関係を明らかにする必要がある。また、幹細胞の応答特性を明らかにするためには、単純なステップ的環境変化だけでなく、

細胞周囲の環境を実験者側から制御した形で変動させ、その中での細胞の状態変化過程を詳細に調べる必要がある。

2. 研究の目的

(1) 分化誘導条件を自由に制御できる1細胞計測技術の開発

上記研究背景で述べた問題を解決するため、幹細胞の状態変化を1細胞レベルで追尾計測できる新たな1細胞計測技術を構築する。特に、分化誘導条件を自由に実験者側から制御できる計測系とする。

(2) マウス ES 細胞における分化誘導に対する応答特性の1細胞レベル計測

構築した1細胞計測技術を用いて、マウス ES 細胞の分化応答を1細胞レベルで計測し、集団内の応答のばらつきや適応度差についての特性を明らかにする。

(3) 幹細胞の分化特性の構成的理解

幹細胞と分化細胞の本質的な差がどのような性質によるのかを理解するため、幹細胞性を担うことが期待される遺伝子制御ネットワークを大腸菌に組み込み、その分化特性を構成的に明らかにする。さらに ES 細胞の結果と比較し分化現象の共通性質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 分化誘導条件を自由に制御できる1細胞計測技術の開発

分化誘導因子の濃度パターンを自由に変化させながら、幹細胞ひとつひとつの分化応答を調べるために、マウス ES 細胞を1細胞レベルで直接追尾観察できる新たなデバイスを構築した。半透膜で上下に区分けされたコンパートメントを利用する方法 (Tomita, T., et al. (2011) Langmuir) と、顕微鏡用のスライドガラス上にマイクロメーターサイズの細胞培養観察用溝を作製し、半透膜を利用してその内部に細胞を配置する方法を試した。どちらの方法でも、全自動倒立型タイムラプス顕微鏡上で細胞の様子を観察し、1細胞レベルの追尾計測を実現するとともに、培養液灌流系と組み合わせることで、誘導環境の制御をおこなうこととした。また、変動環境を実験者側から制御した形で細胞に課すことができるように、培養液灌流系の送液方法の検討もおこなった。

(2) マウス ES 細胞における分化誘導に対する応答特性の1細胞レベル計測

未分化状態に維持されたマウス ES 細胞に分化誘導培地を与え、その中で起こる細胞の挙動を 1 細胞レベルで計測した。特に細胞表現型の指標として、細胞の分裂間隔時間、生死、および未分化マーカーである Nanog の発現量に注目し、その定量情報を取得した。また、これらの表現型的性質がクローン集団内の細胞系列の違いに依存するかを明らかにするため、姉妹細胞相関の解析をおこなった。

未分化維持の培地としては、ESF7 (Furue, et al. (2005) *In Vitro Cell Dev. Biol.*) に BMP4, B27 を加えたもの (ESF7BB) を用いた。また、分化誘導用の培地としては、未分化維持用の培地から Lif および BMP4 を除いたもの (ESF6B) を用いた。

(3) 幹細胞の分化特性の構成的理解

マウス ES 細胞に代表される複雑な内部ネットワークをもつ実際の動物細胞の幹細胞の性質の解析と相補的なアプローチとして、幹細胞性を担うことが理論的に予想される発現制御遺伝子ネットワーク (Goto and Kaneko (2013) arXiv:1303.7319) を人工的に合成した。これを大腸菌に導入することで、分化が起こるか否か、さらにはその分化挙動と ES 細胞の分化挙動の相同性を検証し、文化現象における共通ルールを探った。

遺伝子回路の設計には、合成生物学分野で多用される機能既知のプロモーターやターミネーター、リボソーム結合配列を用いた。特に、*Vibrio fischeri* のクオラムセンシングを担う lux システムを大腸菌に導入し、細胞増殖に伴う相互作用の増強が自然と起こる系とした。

4. 研究成果

(1) 分化誘導条件を自由に制御できる 1 細胞計測技術の開発

① 半透膜で仕切りをしたコンパートメントを用いる方法

細胞周囲の培養環境条件を制御するためには、ひとつひとつの細胞を追尾計測する一方で、培養液を任意のタイミングで速やかに交換する必要がある。例えばディッシュ上に配置された細胞周囲の培養液を単純に交換すると、交換の際の培養液の流れが細胞を基板表面から剥がしてしまい、追尾計測ができなくなるという問題が生じやすい。したがって安定に追尾計測をおこなうためには、細胞周囲の培養環境は制御できる一方で、溶液の流れを細胞に直接当てない工夫が必要である。

これを実現するために我々は、内容積が 25 μl の枠状の両面テープ (Frame seal chamber, small, BioRad) を利用し、細胞培養用の下部コンパートメントと溶液灌流用の上部コンパートメントを半透膜で仕切る構成の灌流デバイスを作製した (Tomita, T. (2011) *Langmuir*) (図 1(A))。下部コンパートメントのガラス底面にマウス ES 細胞を接着させ、未分化維持用培地 ESF7 を 2 ml/hr の流速で流し続けたところ、細胞は安定に増殖することを確認した。

ただし通常のコラーゲンコートした底面では ES 細胞が塊を形成してしまい、1 細胞の追尾が困難になる。この問題を回避するため、ガラス底面に E-cadherin-Fc (Nagaoka, et al. (2006) *PLoS ONE*) をコートした条件で培養したところ、観察開始から 3 日程度は 1 細胞を追尾することができるが (図 1(B))、分離していた細胞が時間とともに徐々に凝集体を形成し、それ以上の 1 細胞の追尾計測が難しくなることが分かった。したがって、E-cadherin-Fc を用いても、現在のデバイス構成では 3 日以上長期タイムラプス計測は難しいことが分かった。

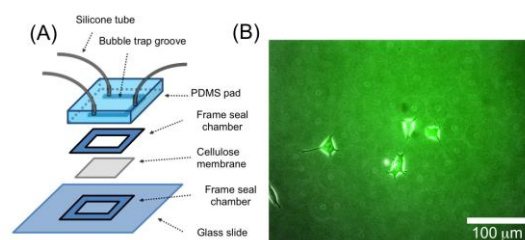


図 1 2つのコンパートメントをもつ灌流デバイスとそれを用いた ES 細胞のタイムラプス計測. (A) 灌流デバイス概要図. (B) (A) のデバイス中で観察される下部コンパートメントに配置されたマウス ES 細胞. 底面には E-cadherin-Fc をコートしているため、観察開始後 3 日程度は細胞は分離した状態で増殖する。

② 微細加工により作製したスライドガラス上の溝を利用する方法

細胞の凝集体形成に伴う細胞追尾の困難を回避するため、顕微鏡のスライドガラス上に溝を作製し、細胞の存在可能範囲を空間的に制限することで、1 細胞追尾計測を実現する方法を試した (図 2)。その結果、マウス ES 細胞が溝中でほぼ平面的に増殖し、特に細胞密度が高い領域では安定して細胞が増殖していくことが分かった。ただし、細胞が不定形であるために、細胞同士の境界の区別が付きにくいという問題を確認している。現在細胞核を蛍光タンパク質で染色し、それにより細胞ひとつひとつを区別する方法を試し

ている。

③ 送液方法の検討

分化誘導条件を様々な方式で制御できるように、灌流デバイスへの送液方法について条件検討をおこなった。複数のプログラマブルシリンジポンプと、ストップバルブを組み合わせた構成で、多種類の溶液を決まったサイクルで交互に送り込める送液系を立ち上げた。この送液系を用いれば、最小5分サイクルで溶液環境を変化させられることを確認している。

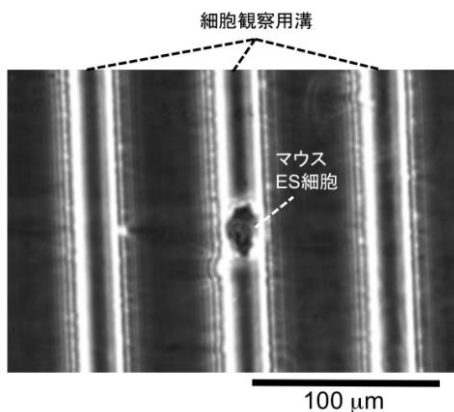


図 2 ガラス基板上に微細加工により作製した、細胞観察用の溝と、その内部で増殖するマウス ES 細胞。

(2) マウス ES 細胞における分化誘導に対する応答特性の 1 細胞レベル計測

① 分化誘導培地導入に伴う ES 細胞応答と Nanog 発現量の関係

Nanog-GFP を発現するマウス ES 細胞を利用し、未分化維持培地 ESF7BB から分化培地 ESF6B に培養液を交換した際の応答を 1 細胞レベルで計測した。

得られるタイムラプス画像から、細胞系統樹を構築し(図 3)、分裂や細胞死のタイミングを同定するとともに、Nanog のプロモーター活性を GFP 蛍光量から見積もり、両者の相関を調べた。

その結果、GFP 発現量が高い(すなわち Nanog プロモーター活性が高い)細胞ほど、分化培地中で死ぬ確率が高いことが分かった。一般に集団計測をおこなった際、分化培地中では Nanog の発現量は低下する。これは通常、細胞分化に伴う Nanog の細胞内発現量の低下だと捉えられることが多い。しかし今回の結果は、集団計測での Nanog 発現量の低下は、必ずしも発現抑制応答のみに依るものではなく、Nanog 活性の高い細胞が分化培地

中で高い確率で死んでしまうという、細胞の適応度差にもとづくものである可能性が強く示唆された。

② 細胞系統樹解析

さらに、マウス ES 細胞の適応度差が細胞系列に依存しているか調べるため、1 細胞系統樹を用いてエピジェネティックな相関を定量的に調べる新たな定量解析手法を開発した。この手法の有用性は、バクテリアの 1 細胞計測で得られていた細胞系統樹のデータに応用することで確認した。実際、この解析手法を用いることで、抗生物質に対するマイコバクテリアの生死に関わるエピジェネティックな要因の同定に成功している(Wakamoto, et al. (2013) Science)。

この解析手法をマウス ES 細胞の分化誘導時の系統樹データに応用したところ、細胞の生死には系列依存性があり、ひとつの細胞から生じた娘細胞は同じ生死の運命を辿りやすい傾向があることを明らかにした。このことは、細胞の状態決定に 1 細胞レベルで履歴

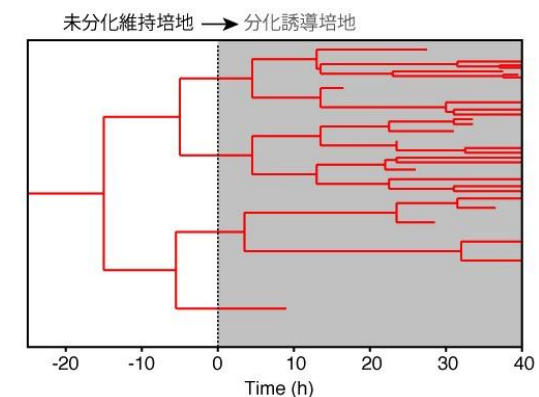


図 3 未分化維持培地から分化培地に環境を変化させた際に得られた細胞系統樹。時間 0 のところで環境を変化させている。系統樹の分岐は分裂をあらわし、切れているところは細胞が死んだことを表す。

の影響があることを示しており、細胞の分化運命決定のロジックを明らかにするには、1 細胞レベルの時系列解析が必須であることを示唆している。

(3) 幹細胞の分化特性の構成的理解

細胞の増殖に伴う細胞間相互作用を通して細胞分化を引き起こすことが理論的に予測される遺伝子発現制御ネットワーク(Goto and Kaneko (2013) arXiv:1303.7319)を大腸菌に組み込んだ株を作製し、その挙動を 1 細胞レベルで計測した。

組み込んだ遺伝子回路は 3 つのモジュール(X, Y, Z)から成るが、XとYの活性は蛍光タンパク質 Venus および mCherry によりモ

ニターできるようにになっている。顕微鏡を用いた観察により、初め Venus と mCherry を同時に発現していた細胞から、Venus だけを発現する細胞、mCherry だけを発現する細胞へと、増殖にともない分離していく「分化」様の挙動が観察されている (図 4)。さらに、このような発現状態の変化が、成長状態の変化とカップルしていることが観察されており、実際の幹細胞でも見られる分化に伴う成長状態の変化との対応関係を考える上で興味深い細胞系を構築できた。

現在これらの細胞株の性質を詳細に解析するとともに、実際の幹細胞応答との関連を探っている。

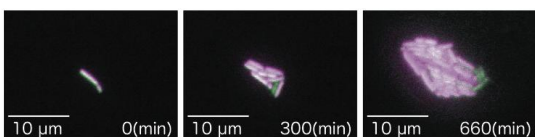


図 4 人工遺伝子回路をもつ分化様挙動を示す大腸菌。Venus の発現を緑色で、mCherry の発現をマゼンダに対応させている。

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 8 件)

- ①. 野添嵩、橋本幹弘、若本祐一、1 細胞計測で明らかになる集団の増殖と適応、実験医学、査読無、31(8)、2013、1209-1216
- ②. 若本祐一、ネガティブフィードバックのトレードオフを回避するウイルスの発現制御回路、実験医学、査読無、31(6)、2013、893-894
- ③. Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., McKinney, J. D., Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed Mycobacteria, Science, 査読有, 339(6115), 2013, 91-95, DOI: 10.1126/science.1229858
- ④. 若本祐一、生細胞 1 個の質量変化を測る、実験医学、査読無、30(18)、2012、2950-2951
- ⑤. 若本祐一、抗生物質に対する耐性菌進化の予測は可能か?、実験医学、査読無、30(8)、2012、1294-1295
- ⑥. Wakamoto, Y., Grosberg, A. Y., Kussell, E., Optimal lineage principle for age-structured populations, Evolution, 査読有, 66(1), 2012, 115-134, DOI: 10.1111/j.1558-5646.2011.01418.x

- ⑦. 若本祐一、確率的表現型変化によるがん細胞構成比の安定性、実験医学、査読無、29(18)、2011、2980-2981
- ⑧. Tomita, T., Sugawara, T., Wakamoto, Y., Multitude of morphological dynamics of giant multilamellar vesicles in regulated nonequilibrium environments, Langmuir, 査読有, 27(16), 2011, 10106-10112, DOI: 10.1021/la2018456

[学会発表] (計 5 件)

- ①. 若本祐一、成長ゆらぎに依存する細胞集団と歴史統計量の性質、2012 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの構築とその維持機構の研究」、2013/03/28-29、国立遺伝学研究所 (三島)
- ②. 小野すみれ、大倉玲子、若本祐一、分化様のふるまいを示す人工遺伝子ネットワークの構築、定量生物の会第 5 回年会、2012/11/24-25、東京大学生産技術研究所 (東京)
- ③. Yuichi Wakamoto, Inconsistency between population and single cell growth rates revealed by dynamics cytometer, 第 50 回日本生物物理学会年会、2012/09/22-24、名古屋大学 (名古屋)
- ④. Sumire Ono, Reiko Okura, Yuichi Wakamoto, Synthetic biology of stem cells: creating artificial gene network of “differentiation”, 第 50 回日本生物物理学会年会、2012/09/22-24、名古屋大学 (名古屋)
- ⑤. 小野すみれ、若本祐一、幹細胞様のふるまいを示す人工遺伝子ネットワークの構築、第 9 回 21 世紀大腸菌研究会、2012/06/11-12、長浜ロイヤルホテル (長浜)

[図書] (計 1 件)

- ①. Toyota, T., Wakamoto, Y., Hayashi, K., Ohnuma, K. (2012) Controlling Cell Migration with Micropatterns, Innovations in Biotechnology, Dr. Eddy C. Agbo (Ed.), InTech, <http://www.intechopen.com/books/innovations-in-biotechnology/controlling-cell-migration-with-micropatterns>

[産業財産権]

○出願状況（計2件）

名称：細胞培養装置、細胞培養方法、および細胞培養観察方法

発明者：若本祐一、橋本幹弘

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許

番号：PCT/JP2012/068005

出願年月日：2012/07/13

国内外の別：国外

名称：細胞培養装置、細胞培養方法、および細胞培養観察方法

発明者：若本祐一、橋本幹弘

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2011-156767

出願年月日：2011/07/15

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/wakamoto-lab/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若本 祐一 (WAKAMOTO YUICHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：30517884