

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15357

研究課題名（和文）ES細胞・iPS細胞の機能制御を可能とする新規荷電性培養基板の開発

研究課題名（英文）Development of synthetic polymer gels that control the function of pluripotent stem cells

研究代表者

廣田 聡 (Hirota, Akira)

京都大学・高等研究院・特定研究員

研究者番号：20847181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ES細胞やiPS細胞などの高度な多能性を持つ幹細胞は再生医療の基盤資源である。しかし、その維持や分化誘導は多種類の増殖因子を必要とし、高いコストや再現性、効率に課題が残されている。この問題を解決するため、本研究では従来にない視点で、新規培養基板の開発を試みた。正電荷をもつ合成ハイドロゲルとマウスES細胞を用いた実験系において、表面電荷が幹細胞機能に必要なシグナルに影響を与えることがわかった。また、ヒト細胞でも検証を行い、この現象の一部が再現された。この結果は、培養基板上の電荷と幹細胞性を維持するシグナルがつながる新たな知見を示し、幹細胞性を制御する新たなバイオマテリアルの創出実現へ近づいた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES/iPS細胞などの多能性幹細胞は、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。本研究では多能性幹細胞の未分化性の維持に着目し、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の理解が前進した。これは「細胞外基質の様々な性質が幹細胞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、この成果を基に、合成培養基質を用いて幹細胞機能を自在に制御するという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）：Embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells are fundamental resources for regenerative medicine. However, their maintenance and differentiation induction require various growth factors, posing challenges in terms of high costs, reproducibility, and efficiency. To address this issue, this study attempted to develop novel culture scaffold. Using synthetic hydrogels with positive charges and mouse ES cells, it was found that surface charge influences the signals required to maintain stem cell function. In addition, we have also examined in human cells and found that part of this effect was successfully demonstrated. These results provide a new insight into the connection between the surface charge on the culture substrate and the signals that maintain stemness, and bring us closer to realizing the creation of new biomaterials that control stemness.

研究分野：分子生物学

キーワード：多能性幹細胞 ハイドロゲル

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、この細胞の応答機能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も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になっている。これまでの研究では、細胞外環境を構成する要因のうち、増殖因子などの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。一方で、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できていないことや、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。

申請者は、性質を変化させた合成ハイドロゲルをマウス ES 細胞の培養基板として使用し、維持培養と分化誘導を行った際に生じる細胞形態の違いや遺伝子発現パターンの変化を検証してきた。その結果、未分化の維持と分化誘導には、それぞれ最適な足場の電荷があることを見出してきた。しかしながら、培養基板の表面電荷が多能性幹細胞に与える影響については知見が乏しく、したがって、この性質が幹細胞性を支える分子メカニズムへ与える影響は全くの未知であった。そこで本研究では、幹細胞性を示す特徴のうち未分化性の維持に着目し、足場の表面電荷が与える影響を分子レベルで明らかにすることにより、幹細胞機能を制御する新たな培養基板の創出につながると考えた。

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の特徴を活かし、細胞外基質の表面電荷が多能性幹細胞の機能に影響を及ぼす分子メカニズムを解明する。そして、得られた知見を応用し、今までにない、幹細胞性の制御を可能とする新規培養基板の開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、表面電荷を変更した合成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った。合成ハイドロゲル上で培養された ES/iPS 細胞の自己複製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の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(RNA-seq)により網羅的に解析した。RNA-seq のデータ解析から明らかとなったシグナルの影響を検証するため、阻害剤を添加し解析を行った。ヒト細胞を使用した実験では、ヒト iPS 細胞とがん細胞を用いて検証を行い、未分化マーカーの発現量変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 培養基板の表面電荷がマウス ES 細胞の分化能を阻害するメカニズムの解明

正電荷ゲル上で分化誘導した細胞が、分化の途中で停止した状態であることが推測されたが、どの未分化段階で停止もしくは維持されているのか不明であった。そこで、この細胞と一般的にマウス ES 細胞に用いられている培養方法で得られた細胞を比較し、どの未分化段階に近いのかを調べることにした。マウス多能性幹細胞には、未分化状態によって大まかに以下の3つの培養方法がある。MEKi、GSK3i と LIF を加えることで Naive 型を維持できる方法(2i/LIF)、Activin A と bFGF を加えることで、Naive 型における分化能の一部を失った EpiSCs(Prime 型)で維持する方法(Activin/bFGF)、そしてこの2つの状態が混在する状態で維持される FCS と LIF を加えた方法(FCS/LIF)がある。今回、これらの細胞と正電荷ゲル上における細胞とを比較することで、培養基板の電荷がどのような遺伝子群に影響を与えているかを RNA-seq で得られたデータを詳細に解析し、検証した。その結果、Wnt3 や Spry1 などの分化に関わるシグナル因子群の発現パターンが 2i/LIF や FCS/LIF で培養している細胞と類似していることが明らかになった。これにより、正電荷ゲル上の細胞が分化に対して抵抗性を示しているメカニズムの一端として、分化を

促進する因子の発現が低下しており、分化シグナルが細胞内にうまく伝達していない可能性が示唆された。

(2) 荷電性ハイドロゲル上のマウス ES 細胞内におけるシグナルの解明

上記の結果から、正電荷ゲル上の細胞が分化に対して抵抗性を示しているメカニズムの一端として、分化を促進する因子の発現が低下しており、分化シグナルが細胞内にうまく伝達していない可能性が示唆された。そこで、正電荷ゲルが未分化維持を促すシグナルに与える影響に着目し解析をおこなった。上記に示した各培養条件において正電荷ゲル上で分化誘導を行い、未分化維持に関わる遺伝子の発現パターンを比較したところ、*Klf4*、*Klf2*、*Klf5* の発現が維持されていた。これらの遺伝子は未分化維持の中心を担う *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* の発現を支持する役割があることが知られている。さらに、*Klf4*、*Klf2*、*Klf5* の上流を明らかにするため、阻害剤による検討をおこなった。その結果、ERK5 の機能を阻害すると正電荷ゲル上でも分化が進むことがわかった。これらの結果を踏まえると、正電荷ゲル上で分化誘導をおこなったマウス ES 細胞では、分化を促すシグナルの阻害と ERK5 を介した未分化を維持するシグナルの入力が同時に起こるため未分化な状態が維持されていると考えられた。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幹細胞性に影響を与えるメカニズムの全体像を捉えることができ、荷電性ハイドロゲルを培養基板へと応用する可能性を示唆することができた。

(3) 荷電性ハイドロゲルがヒト細胞に与える影響とその解析

マウス ES 細胞は、表面が正電荷で覆われた合成ハイドロゲル上において、ERK5 経路とその下流に位置する *Klf4*、*Klf2*、*Klf5* が影響を受けることで未分化な状態を維持することができていた。上記の因子は幹細胞性を保つために必須な遺伝子として知られているが、これはヒト多能性幹細胞でも同様である。近年注目されている Naïve 型ヒト多能性幹細胞は、その誘導・維持が容易ではないため、新規培養方法の開発が望まれている。

また、幹細胞性への影響を多角的な視点から捉えるため、多能性幹細胞と似た特徴を持つがん幹細胞も用いた。この細胞でも同様に未分化マーカーとして知られる遺伝子が発現している。先行研究から、高機能ハイドロゲル(DN ゲル)上にがん細胞を播種すると、細胞内の遺伝子発現パターン等が大きく変化し、がん幹細胞のマーカーとされている SOX2 や OCT3/4 の発現が上昇することがわかっている(Nat. Biomed. Eng., 2021)。がん幹細胞は治療標的であるため、この幹細胞性を制御する分子メカニズムの解明も非常に重要である。

したがって、荷電性ハイドロゲルの応用への第一歩として、多能性幹細胞とがん幹細胞の培養基板として使用し、多能性幹細胞では、新規培養基板としての有用性を検討し、がん幹細胞ではその誘導基板となりうるかを、それぞれ遺伝子発現パターンの変化や細胞形態の変化から検証した。

マウスとヒトでは多能性幹細胞の機能維持に必要なシグナルが一部異なるため、ハイドロゲルの組成や培地の組成を細かく検討する必要がある。Naïve と Primed のそれぞれの状態を維持できる条件を絞り込むことはできたが、それ以降の詳細の分子メカニズムの解明には至らず、実用化には課題を残すことになった。

がん幹細胞への応用では、正電荷を帯びた合成ハイドロゲル上でがん細胞を培養すると、先行研究と同様にがん幹細胞マーカーの発現量が上昇した。また、この細胞では、ミトコンドリア合成やグルコース代謝経路に関わるタンパク質の発現量に変化が生じることが明らかになっている。この成果の一部は論文として報告している(Cancers, 2022)。

以上の結果から、荷電性ハイドロゲルを培養基板に用いた場合、細胞内ではダイナミックな変化が起こり、その効果は幹細胞性を維持する方向に働くことが分かった。そして、実用化への課題はあるが、その効果の一部はヒト細胞でも発揮され、再生医療研究だけでなく、がん治療にも貢献できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirota Akira, Clément Jean-Emmanuel, Tanikawa Satoshi, Nonoyama Takayuki, Komatsuzaki Tamiki, Gong Jian Ping, Tanaka Shinya, Imajo Masamichi	4. 巻 14
2. 論文標題 ERK MAP Kinase Signaling Regulates RAR Signaling to Confer Retinoid Resistance on Breast Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5890 ~ 5890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14235890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------