

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820401

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞培養中における脱未分化現象の解明および新規培養プロセス開発

研究課題名(英文) Assessment of deviation from the undifferentiated state in colonies of hiPSCs and development of its maintenance culture process

研究代表者

金 美海 (KIM, MEE-HAE)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30506449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞組織工学における基盤技術として、ヒトiPS細胞培養における未分化状態からの逸脱現象の解明し、さらにそれらの生物学的現象を用いて、培養プロセス開発の応用を示した。特に、ヒトiPS細胞のコロニー内の未分化状態からの逸脱現象は、細胞遊走による細胞-細胞間と細胞-基質間接着のバランスを不均衡により生じることを明らかにした。細胞遊走と増殖の役割を利用したiPS細胞の未分化維持培養プロセスの開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we describe an understanding of the possible mechanisms that control hiPSC self-renewal in cell culture conditions in the presence of feeder cells. From the standpoint of the deviation from the undifferentiated state in colonies of hiPSCs on feeder layers, the most important aspects for cell migration and growth inside a single colony are a balance between cell-cell and cell-substrate interactions that induces spatial differences in their morphological and functional characteristics. This approach can be applied to an important generic technology for expanding the in the undifferentiated state of hiPSCs.

研究分野：工学

キーワード：バイオ生産プロセス 再生医療 ヒトiPS細胞 未分化維持

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞及びその他の多能性幹細胞から作成した組織（心臓，肝臓，神経等）については，再生医療および新薬候補のスクリーニングへの活用に向けて世界各国で研究が本格化しつつある。iPS 細胞の未分化を維持しつつ細胞数の増幅を目指した増幅培養において，未分化状態から必然的または偶発的に分化が引き起こされる「未分化状態からの逸脱」の現象が多くみられる。継代培養中にこの未分化状態からの逸脱現象を放置し，継代回数を重ねると逸脱した細胞（逸脱細胞）からなるコロニーが多くなり未分化維持が困難となる。その結果，未分化維持には，熟練した操作者の丁寧な培養ならび継代時のコロニーの選別という煩雑な操作が不可欠となっている。これまで，未分化逸脱現象の発生防止を目指し，培地や基質の開発が行われており，その発生頻度は低頻度となって実用化されている。しかし，依然，偶発的に発生した逸脱細胞を含むコロニーに対して，人手による丁寧な除去が不可欠である。未分化状態の維持機構については不明な点が多く残されているため，未分化状態を調整する仕組みを明らかにし，その仕組みを利用した未分化状態良好に維持した培養手法の構築が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では，細胞組織工学における基盤技術として，ヒト iPS 細胞培養における未分化状態からの逸脱現象の解明し，さらにそれらの生物学的現象を用いて，培養プロセス開発する。具体的には，ヒト iPS 細胞のコロニー内における未分化逸脱現象に着目し，各細胞群の増殖性を速度論的に解析する。さらに，ヒト iPS 細胞の未分化維持の仕組みを利用して，iPS 細胞の未分化維持培養システムの開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞 (Tic 株) を用い，ReproStem 培地および SNL と MEF フィーダー細胞を用い培養を行った iPS 細胞播種後 24 ~ 144 時間まで，同一コロニーの画像を 6 時間ごとに取り得し，コロニー内の未分化および逸脱した領域を目視で区切ることで面積を算出した。SNL と MEF フィーダー細胞上での未分化逸脱現象に関する結果に対して，培養中のコロニー内の未分化細胞の領域と逸脱細胞の領域の比増殖速度を合計し，その大小関係を比較することによってコロニー内の逸脱現象を解析した。図 1 に示すように，培養細胞観察装置を用いて継時的にヒト iPS 細胞の自発的に発生する逸脱現象は細胞分裂と未分化から分化状態への転移であるため，の個別コロニー内の未分化細胞の領域と逸脱細胞の領域の面積と増殖速度を指標とする細胞未分化評価を行った。また，コロニー内の全細胞，未分化細胞・逸脱細胞数に変換するために，未分化マーカー (Oct3/4) と細胞核 (DAPI) 蛍光染

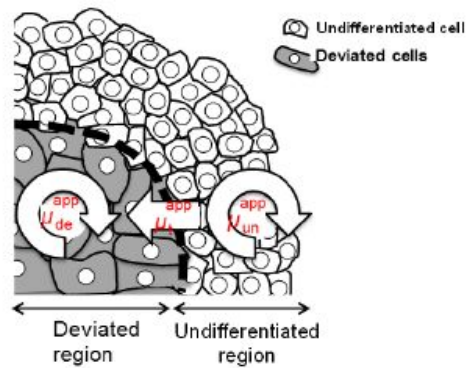


図 1. ヒト iPS 細胞コロニー内の未分化細胞の領域と逸脱細胞の領域の比増殖速度増殖速度的解析。

色から各領域の面積と細胞数の関係式を導いた。培養細胞コロニーの面積と未分化マーカーである Oct3/4 陽性または陰性細胞核との間の相関性を調査し，比増殖速度方程式から得られたコロニー内の未分化と逸脱した領域を算出した。

$$\text{未分化領域: } \mu_{un}^{app} = \frac{1}{n_{un}} \frac{dn_{un}}{dt}$$

$$\text{逸脱した領域: } \mu_{de}^{app} = \frac{1}{n_{de}} \frac{dn_{de}}{dt} - \mu_t^{app}$$

$$\text{未分化から逸脱に変化: } \mu_t^{app} = \mu_{un}^{app} - \frac{1}{n_{un}} \frac{dn_{un}}{dt}$$

$$t = t_1, t = t_1 + 24 \text{ h}$$

(t_1 : 未分化状態から逸脱した時間)

また，培養中のコロニー内の逸脱現象を解明するために細胞遊走 (Rac1)，細胞 - 細胞間接着 (E-cadherin)，細胞死 (Caspase-3) 関連するタンパクの発現を蛍光染色により検討した。

4. 研究成果

4.1 ヒト iPS 細胞のコロニー内における未分化逸脱現象の速度論的解析

ヒト iPS 細胞の培養中の自発的に発生する未分化逸脱現象に着目し，異なるフィーダー

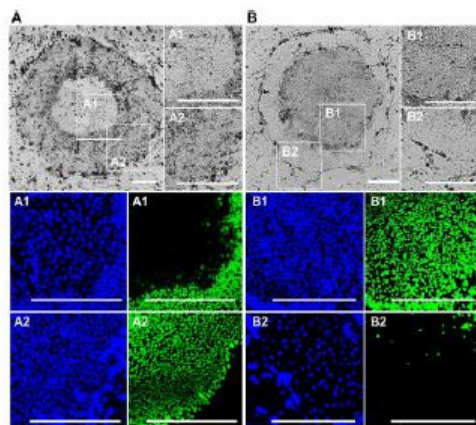


図 2. SNL(A)と MEF(B)フィーダー細胞上での未分化状態から逸脱したヒト iPS 細胞コロニー。細胞核(青)と未分化マーカー Oct3/4 (緑) (Scale bars: 2mm)

上でのヒト iPS 細胞の逸脱現象を評価した。細胞観察装置により各フィーダー細胞上での未分化逸脱したコロニーの挙動を経時的に観察したところ、SNL の条件では、培養 3 日目からコロニー中心部から未分化を逸脱した細胞が自然に生まれ、コロニーの中心から外側に増殖しながら未分化細胞を押し出し、培養中にコロニー内に逸脱した細胞の領域が段々広がっていく様子が観察された。しかし、MEF の条件では、コロニーの周囲部分から脱未分化細胞が発生して、未分化逸脱した細胞の領域が外側に活発な遊走を伴う増殖で広がって行くのが観察された。ヒト iPS 細胞を培養 6 日間行い、代表的な未分化を逸脱したコロニー画像を **図 2** に示す。この代表的なコロニーは、各 SNL、MEF 条件下において、脱未分化コロニーが培養容器の全コロニーの $14 \pm 9\%$ 、 $16 \pm 13\%$ の頻度で生じていた。ヒト iPS 細胞コロニー内の未分化細胞の領域と逸脱細胞の領域の未分化性を検討するために Oct3/4 の蛍光染色を行ったところ逸脱細胞の領域では陰性であることが確認された。

そこで培養 3 日目から 17 時間、各フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞コロニー内の逸脱細胞の領域の面積と増殖速度を指標とする細胞脱分化評価を行ったところ、SNL の条件では 17 時間後の未分化逸脱した領域の面積は 1.5 倍に、MEF の条件では、未分化逸脱した領域の面積は 4 倍に増加し、SNL の条件の比増殖速度は未分化細胞の増殖速度の 3.7 倍であることが分かった (**図 3**)。

各フィーダー細胞条件下での未分化逸脱したコロニー 26 個以上に対し、逸脱細胞の発生前後において未分化細胞の比増殖速度 (μ_{un}^{app}) はほぼ同じレベルだと仮定し、Eq. (2) と (3) から (μ_{un}^{app} , μ_{de}^{app}) を求めた (**図 1**)。その結果、MEF 条件下での逸脱細胞の平均比増殖速度 (μ_{de}^{app}) は $(7.16 \pm 2.60) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ で、SNL 条件下の 1.3 倍高く、SNL 条件下の未分化から逸脱細胞への平均変換速度 (μ_i^{app}) は $(1.53 \pm 0.60) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ で、MEF 条件下の 7.7 倍高いことがわかった。この結果から MEF 条件下

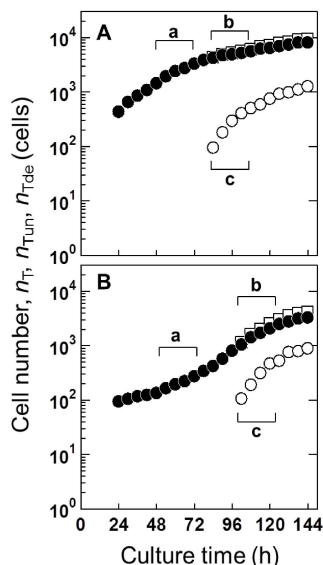


図 3. SNL(A)と MEF(B)フィーダー細胞上での未分化状態から逸脱したヒト iPS 細胞コロニーの速度論的解析。未分化細胞，逸脱細胞，全細胞

では、逸脱領域の拡大には主に逸脱細胞の増殖が大きく影響を与えていることが示唆された。

以上の結果より、MEF フィーダー細胞を用いたヒト iPS 細胞培養では SNL の条件と比べ逸脱細胞の増殖性が高いため、継代を繰り返すことでその逸脱細胞の発生頻度が高くなることが示唆された。以上の結果より、分化細胞は未分化細胞と比べ増殖性が高いため培養中にコロニー内の主となる細胞が未分化細胞から分化細胞へとシフトされ、継代を繰り返すことでその分化細胞の発生頻度が高くなることが示唆された。ヒト iPS 細胞の未分化性を保ったまま継代培養を行うためには、播種時に分化した細胞を継代しないことが重要であると考えられる。

4.2. ヒト iPS 細胞のコロニー内における細胞遊走と細胞-細胞間接着の検討

異なるフィーダー細胞上での未分化逸脱現象を検討するため、培養 6 日間培養を行い細胞間接着タンパクである E-cadherin と細胞死のマーカーである Caspase-3 の蛍光染色を行った。**図 4** に示すように、未分化逸脱したコロニーの場合、培養 3 日目に中心部の核密度が高くなり Caspase-3 の発現が周囲部の細胞と比べ強いことが分かった。これは細胞分裂により細胞密度が高くなったコロニー中心では細胞間接着が強いいため細胞-基質接着能を失ってしまい、細胞死と逸脱細胞が生まれたと考えられる。MEF の条件では培養中に細胞中心と周辺部では細胞死の Caspase-3 の発現は見られなかった。

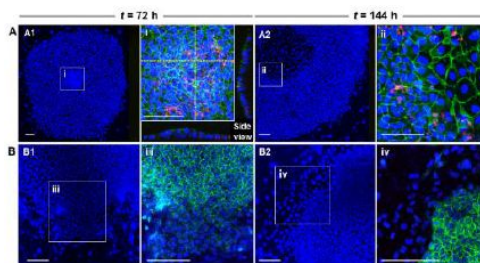


図 4. SNL(A)と MEF(B)フィーダー細胞上での未分化状態から逸脱したヒト iPS 細胞コロニーの E-cadherin (緑)、Caspase-3 (赤)、細胞核 (青) の蛍光染色 (Scale bars: 50 μ m)

さらに、細胞遊走とヒト iPS 細胞の逸脱現象との関連を検討するため、E-cadherin と細胞遊走性の関連タンパクである Rac1 の蛍光染色を行ったところ、MEF の条件で発生した E-cadherin の発現が見られなかった周囲部の逸脱細胞において、Rac1 の発現が強く見られた (**図 5**)。以上の結果より、異なるフィーダー上でのヒト iPS 細胞の増殖と遊走の違いがヒト iPS 細胞の逸脱のコロニー形成パターンに關与することが示唆された。

図 6 に以上の概念図を示す。SNL フィーダーの培養において、コロニーが大きくなると必然的に逸脱現象が生じており、中心部分で圧迫された細胞が一部培養面から剥離する

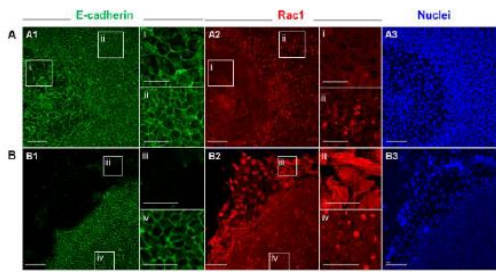


図 5. SNL(A)と MEF(B)フィーダー細胞上での未分化状態から逸脱したヒト iPSC 細胞コロニーの E-cadherin (緑), Rac1 (赤), 細胞核 (青) の蛍光染色 (Scale bars: 50 μ m)

ことで、細胞-基質間接着の劣化し、アポトーシスが引き起こされる。その後、E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着の崩壊により逸脱細胞が発生し、活発な分裂による自己増幅により、逸脱細胞がコロニー内で優勢となることが分かった。一方、MEF フィーダー上では、iPS 細胞の遊走が活発となり、コロニー中心部分での逸脱現象が見られないが、周辺部において、遊走が活発であるため E-カドヘリンを介した細胞-細胞間接着が崩壊し、逸脱細胞が偶発的に発生している現象が見られる。さらに、遊走性を阻害する Rac1 阻害剤の添加は、コロニー周辺部の逸脱細胞の発生を抑制し、反対に中心部にて発生し、SNL フィーダー上と同様の逸脱現象が見られた。以上より、異なるフィーダー上でのヒト iPSC 細胞の遊走性の違いがコロニー中心部または周辺部で逸脱した細胞を発生させることが示唆された。ヒト iPSC 細胞の未分化維持培養手法の開発には、細胞遊走による細胞-細胞間と細胞-基質間接着のバランスを維持させることが重要であると考えられた。

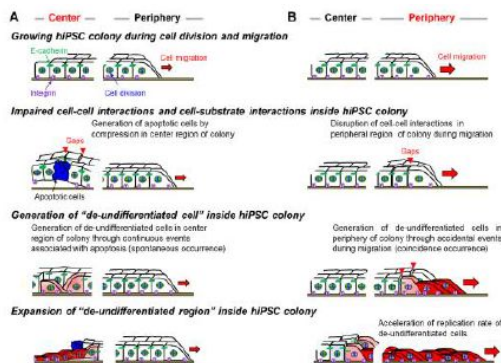


図 6. SNL(A)と MEF(B)フィーダー細胞上でのヒト iPSC 細胞のコロニー内における逸脱現象

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Maintenance of an undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells through migration-dependent regulation of the balance between cell-cell and cell-substrate interactions, J. Biosci.

Bioeng., 査読有, Vol.119, NO.6, pp. 617-622, (2015)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.024

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Maintenance of undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells through cytoskeleton-driven force acting to secreted fibronectin on a dendrimer-immobilized surface, J. Biosci. Bioeng., 査読有, Vol.118, No.6, pp. 716-722, (2014)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.011

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Switching between self-renewal and lineage commitment of human induced pluripotent stem cells via cell-substrate and cell-cell interactions on a dendrimer-immobilized surface, Biomaterials, 査読有, Vol.35, No.22, pp. 5670-5678, (2014)

DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.03.085

Mee-Hae Kim, Eri Masuda and Masahiro Kino-oka, Kinetic analysis of deviation from the undifferentiated state in colonies of human induced pluripotent stem cells on feeder layers, Biotechnol. Bioeng., 査読有, Vol.111, No.6, pp. 1128-1138, (2014)

DOI:10.1002/bit.25188

〔学会発表〕(計 9 件)

東 敬祐, 守隋恵理, 金 美海, 紀ノ岡正博, 細胞接着を考慮した iPSC 細胞の未分化状態からの逸脱現象の解明, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015.3.19-21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), ポスター発表

金 美海, 松原佳史, 紀ノ岡正博, ポツリヌス菌由来のヘマグルチンを用いたヒト iPSC 細胞の未分化を逸脱した細胞の除去, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015.3.19-21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), ポスター発表

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Maintenance of an undifferentiated state of human iPSCs through regulation of migration, 7th World Congress of Preventive and Regenerative Medicine, Nov. 4-7, 2014, Taipei, Taiwan, Poster presentation

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells on a dendrimer-immobilized surface, International Society for Stem Cell

Research 12th Annual Meeting, June 18-21, 2014, Vancouver, Canada, Poster presentation

松原佳史, 増田英里, 伊賀朋世, 金 美海, 紀ノ岡正博, ヒト iPS 細胞の継代培養における未分化状態からの逸脱現象の解明, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013.9.18-20, 広島国際会議場(広島県・広島市), ポスター発表

金 美海, 紀ノ岡正博, デンドリマー培養面を用いたヒト iPS 細胞の継代培養における未分化維持能の解析, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013.9.18-20, 広島国際会議場(広島県・広島市), ポスター発表

守随恵理, 金 美海, 紀ノ岡正博, ヒト幹細胞の遊走阻害による未分化・分化の制御, 化学工学会第 45 回秋季大会, 2013.9.16-18, 岡山大学 津島(東)キャンパス(岡山県・岡山市), ポスター発表

Mee-Hae Kim and Masahiro Kino-oka, Coordination of cell-cell interactions and cell-substrate interactions by altering migration is required for regulating fate decision of human induced pluripotent stem cells, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, June 12-15, 2013, Boston, U.S.A., Poster presentation

Mee-Hae Kim, Eri Masuda and Masahiro Kino-oka, Characterization of derivation from undifferentiation in colonies of human induced pluripotent stem cells based on kinetic analysis, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, June 12-15, 2013, Boston, U.S.A., Poster presentation

〔図書〕(計 1 件)

金 美海, 紀ノ岡正博, 日本バイオマテリアル学会, バイオマテリアル-生体材料-, Vol.31, No.3, pp. 154-157, (2013)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金 美海 (KIM MEE-HAE)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 30506449