

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871141

研究課題名(和文) ソフトマテリアルによる高品質iPS細胞の樹立と維持

研究課題名(英文) Efficacy of soft substrates for iPS cells establishment and culture

研究代表者

樋口 清香 (HIGUCHI, SAYAKA)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00618861

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、マウスiPS細胞に最適な弾性の基質環境を用い、フィーダー細胞を用いない新たなiPS細胞培養法の確立を目指した。

研究の結果、ソフトマテリアル上でiPS細胞は培養可能な事が分かった。更に、2i (GSK3阻害剤、MAP kinase阻害剤)をソフトマテリアル基質と併用し、培養の改良に成功した。また、足場の「弾性」が、細胞の未分化状態維持に関わるメカニズムの解明を目指した。現在、ソフトマテリアル上で培養した際に、未分化維持に寄与するシグナル伝達系を抽出しつつある。そのシグナル伝達の鍵となる分子を人工的に入力し、フィーダー細胞とソフトマテリアル無しにiPS細胞を培養する方法を開発中である。

研究成果の概要(英文)：This decade, using feeder cells has been standard in the culture of iPS cells. However, the condition of feeder cells as an environmental factor directly gives the change to quality of iPS cells. Therefore, I tried to find the new effective-condition for the culture of mouse-iPS cells without feeder cells.

The iPS cells, iPS-MEF-Ng-20D-17, were incubated on the soft substrates, and I found that the soft substrate was effective in the culture. The effect was enhanced by addition of two inhibitors, GSK3 inhibitor and MAP kinase inhibitor. Second, I tried to investigate the mechanism for maintaining of the iPS cells in this culture condition. In my current study by microarray analysis, the key molecules for maintaining of the iPS cells on the soft substrate, is becoming clearer. The culture condition without special substrate, such as feeder and soft substrate, is under developing based on the result of microarray analysis.

研究分野：幹細胞

キーワード：マウスiPS細胞培養 ソフトマテリアル フィーダーフリー

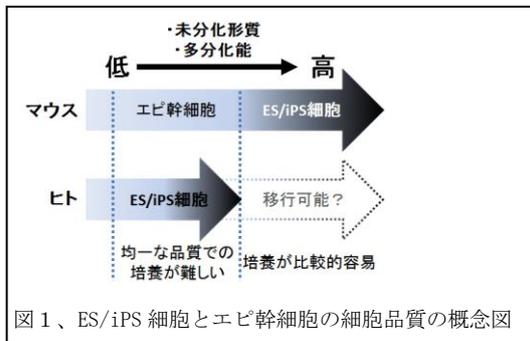
1. 研究開始当初の背景

1) ヒト iPS 細胞の品質管理の重要性

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) で問題視されていた、生命倫理的な問題と拒絶反応を回避でき、生物学・臨床医療・創薬において、大きな貢献が期待されている。しかし、ヒト iPS 細胞は、マウス iPS 細胞と比べて、増殖が遅く、継代効率も低い上、凍結融解後の生存率も低いなど、非常に扱いづらい細胞との報告がある (Hanazono Y. Seikagaku. 83, 11, 1060-3, 2011)。さらに、ヒト iPS 細胞では、初期化 (リプログラミング) される以前の、分化細胞時のエピジェネティックな制御が DNA メチル化状態に残っていたり、X 染色体の不活性化が維持されたりしている。ヒト iPS 細胞は、マウス iPS 細胞に比べて、不均一な性質で、低品質な状態である。

当初、ヒトとマウスにおける iPS/ES 細胞の品質の違いは、動物種における違いであると考えられていた。しかし、近年、発生段階の違いに由来すると考えられている。マウス iPS/ES 細胞の発生段階は、基底状態 (ground state/naïve) と呼ばれる。一方、ヒト iPS/ES 細胞は、マウスのエピ幹細胞の発生段階に相当していると考えられている。ヒト iPS/ES 細胞は、未分化能・多分化能でマウス ES/iPS 細胞に劣っている。

ヒト iPS 細胞を、エピ幹細胞段階から、マウス・ES/iPS 細胞段階に移行することが出来れば、ヒト iPS 細胞は、マウス iPS 細胞と同様に培養しやすい細胞になると考えられている (Hanazono Y. Seikagaku. 83, 11, 1060-3, 2011)。 (図 1)

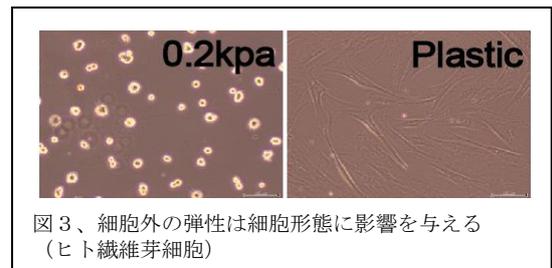
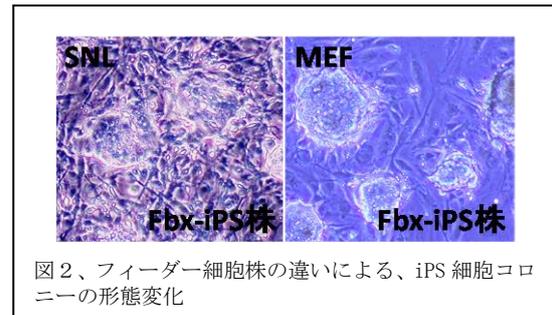


2) 力学刺激が細胞に与える影響

最も一般的に用いられる iPS 細胞培養法は、経験則に従って、継体毎にフィーダー細胞を必要とする。"フィーダー細胞"とは、MEF、SNL など、複数の細胞種の総称である。異なるフィーダー細胞上に播かれた同じ iPS 細胞株は、明らかに形態が異なるが、これまで議論されてこなかった (図 2)。iPS 細胞の品質を同質に保つには、フィーダー細胞を用いない培養法が必要である。興味深いことに、Yue らは、フィーダー細胞を化学固定した状態で使用しても、iPS 細胞の培養が行えると発表した (Yue XS et al., Plos one. 7, 3, e32707, 2012)。これまで、フィーダー細胞は、iPS 細

胞の増殖、未分化能の保持のため、栄養物質を供給していると考えられてきた。しかし、Yue らの研究から、フィーダー細胞は、その生死に関係なく足場としての物理的役割が大きいと考えられる。

近年、様々な細胞種で、細胞外の物理的培養環境が、培養細胞の増殖や分化に影響を与えると報告されている。物理的環境要因は、細胞外の「弾性」、「基質の構成成分」、「広さ」の 3 要因が考えられる。中でも、「弾性」要因は、培養細胞に対して影響力が大きい事を著者自身観察している (図 3)。



2. 研究の目的

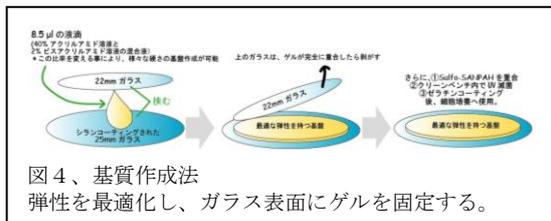
iPS 細胞は、生命倫理的な問題と拒絶反応を回避できる幹細胞として、生物学・創薬・医療分野に、貢献が期待されている。しかし、ヒト由来の iPS 細胞は、常時一定の性質での培養が難しい。「iPS 細胞の品質管理法の確立」は、喫緊の課題である。通常、iPS 細胞培養には、「接着の為の足場細胞、"フィーダー細胞"が必要である。未だメカニズムは明らかでないが、フィーダー細胞が iPS 細胞に与える力学刺激の違いが、iPS 細胞の品質のばらつきを生んでいると考えられる。

本研究では、フィーダー細胞の足場としての力学的役割、「弾性」に着目し、細胞外弾性を iPS 細胞培養に最適化し、フィーダー細胞非存在下での長期安定培養を目的とした。また、iPS 細胞が、細胞外弾性に応答し、その刺激を細胞内部へ伝達し、未分化能を維持するメカニズムを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

足場の力学刺激「弾性」が、iPS 細胞の品質に及ぼす影響を、様々な硬さの弾性基質上で幹細胞を培養し、幹細胞マーカーの発現を基に判断する。弾性の違う基質は、「アクリルアミド」と「ビスアクリルアミド」の配合の違いによって独自に作成する (図 4)。また、

足場の力学刺激「弾性」が、細胞の状態に影響を与えるメカニズムの解明をマイクロアレイ解析などの網羅的遺伝子発現の比較によって目指す。



4. 研究成果

1) ソフトマテリアルを用いた iPS 細胞の樹立

1) - 1

分化細胞から iPS 細胞樹立の試み

iPS generation OSKLN-All-in-one vector (TAKARA) を用いて線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する際、フィーダー細胞の代わりに様々な硬さの基質上で細胞を培養した。OKSLIN vector を導入した線維芽細胞をソフトマテリアル上で培養した所、フィーダー細胞上で培養した時と比べて、早い日数の段階で、細胞形態の変化と幹細胞マーカーの発現が観察された。しかし、多分化能を獲得する段階までの初期化には成功しなかった。(論文発表済み)

1) - 2

品質の悪い iPS 細胞 (Partial iPS 細胞) から高品質 iPS 細胞樹立の試み

iPS 細胞 (Partial iPS 細胞) をソフトマテリアル上で培養し、高品質 iPS 細胞に移行するかを EOS レポーターの発現を指標に、FACS にて解析を行った。解析の結果、品質の悪い iPS 細胞を高品質 iPS 細胞に移行する最適な弾性基質は、発見出来なかった。

2) ソフトマテリアルを用いた iPS 細胞の維持

代表的な幹細胞の未分化マーカーとして知られる nanog が発現すると、GFP の蛍光として観察できる iPS 細胞株 (iPS-MEF-Ng-20D-17, RIKEN Cell BANK) を用いた。iPS 細胞がソフトマテリアル上でも維持・培養できるか観察した。この結果、フィーダー細胞上で培養した時と同様に、柔らかい基質弾性上でも nanog の発現に起因する GFP 発現は維持された (図 5)。更に、培養条件を改良する為、高品質 iPS 細胞培養時に用いられる 2i (GSK3 阻害剤、MAP kinase 阻害剤) を併用した。その結果、nanog の発現は強まり、より未分化で安定した状態で iPS 細胞が維持出来ていると考えられた (図 6)。

次に、足場の力学刺激「弾性」が、細胞の未分化状態維持に関わるメカニズムの解明を

目指した。フィーダー細胞上で培養した iPS 細胞と、ソフトマテリアル上 (0.2kpa) で培養した iPS 細胞の遺伝子発現の比較をマイクロアレイ解析により行った。解析の結果、両者には、6000 を超える遺伝子で 2 倍以上の発現増加が検出され、4000 以上の遺伝子で 2 倍以上の発現減少が検出された。このことから、フィーダー上で培養された細胞と、ソフトマテリアル上で培養された細胞は、両者で nanog の発現量が高く維持されているにも拘らず、その維持のメカニズムは全く同じではないと考えられた。

現在、ソフトマテリアル上で培養した際に明らかに変動し、未分化の維持に寄与するシグナル伝達系を抽出しつつある。そのシグナル伝達の鍵となる分子を人工的に入力する事で、プラスチック培養皿上でもフィーダー細胞無しに iPS 細胞を培養できる方法を開発中である (図 7)。この方法で、維持した iPS 細胞の多分化能が確認でき次第、論文を作成し、速やかに成果を発表したいと考えている。最後に、当研究課題で、最初に目標としていた、「フィーダー細胞を用いない iPS 細胞の培養法の確立」は、紆余曲折を経た今、ソフトマテリアル上で培養した時に入力されるシグナルをプラスチック培養皿上で培養される iPS 細胞に人工的に入力する事により、達成出来そうである。この方法は、フィーダー細胞の準備や、ソフトマテリアルを作製する必要も無く、iPS 細胞培養が簡単に行える。この技術は、今後の iPS 細胞研究へ貢献でき

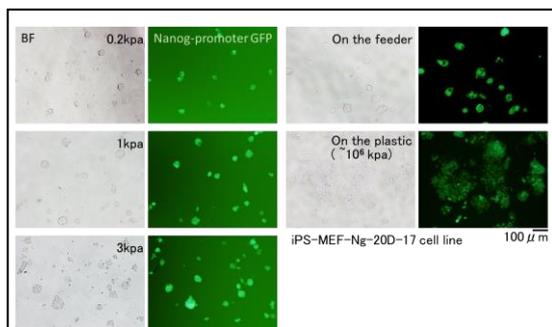


図 5、Nanog の発現はソフトマテリアル上で培養する事で維持できる。一方、プラスチック培養皿上で培養された iPS 細胞は、コロニー形態が扁平になり、nanog の発現が減少する。(ゲル・プラスチック共にゼラチンコート後に使用)

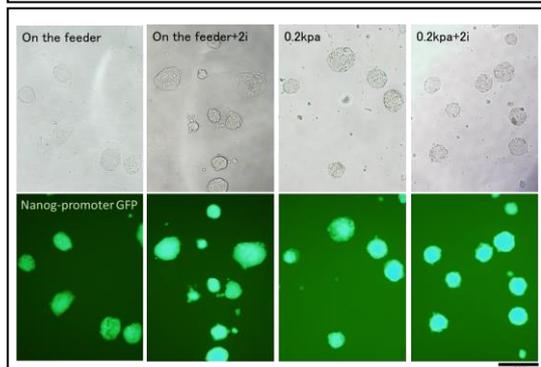
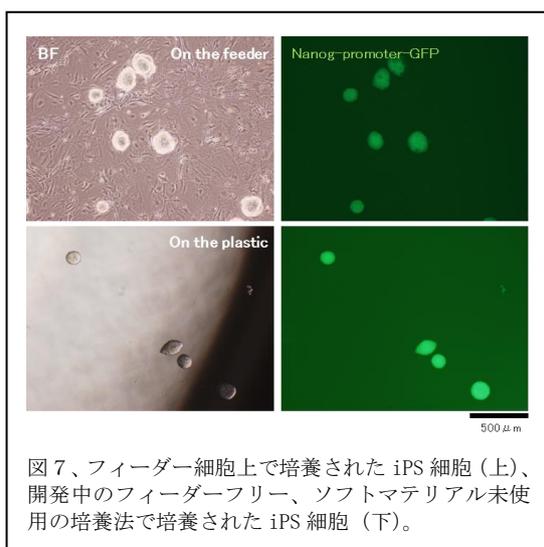


図 6、ソフトマテリアルと 2i の併用。Nanog の発現が 2i を併用する事でより強まった。

ると期待している。



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 1 件) 【査読有】

Higuchi S, Watanabe TM, Kawauchi K, Ichimura T, Fujita H.

Culturing of mouse and human cells on soft substrates promote the expression of stem cell markers.

Journal of Bioscience and Bioengineering. 117(6):749-55. 2014.

DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.11.011.

[その他]

ホームページ等

RIKEN Research

<http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/7786/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 清香 (HIGUCHI SAYAKA)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00618861