

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26289065

研究課題名(和文)「血統書付き」スーパーiPS細胞の選出と培養システムの開発

研究課題名(英文) Developing Single Cell Culture Platform for Human Pluripotent Stem Cells

研究代表者

劉 莉 (Liu, Li)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：50380093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在のiPS細胞作製技術では、複数の初期化遺伝子を導入し、そこから生成してくるコロニーを増殖・培養することによりiPS細胞を得ている。得られるコロニーが単一クローンである保証はなく、テロな集団と考えるべきである。このことは、創薬においては研究の再現性に、再生医療においては安全性に、深刻な影響を与える。本課題は、ナノファイバーとマイクロ加工技術を用いて、初期化操作により得られたiPS細胞コロニーから単一細胞を分離・隔離して分化させる手段を開発することを目的としている。これにより、由来が明確な細胞による基礎実験・創薬研究を可能にする安全な再生医療への道を開拓する。

研究成果の概要(英文)：By using a micro-nano devices, we successfully isolated and culture single cell-derived two novel pluripotent cell subtypes co-existing in the conventional hiPSCs population. Both types can be stably maintained and keep their properties inherited during proliferation. One type holds higher pluripotency, and is more sensitive to the microenvironment. We discovered a serum response factor-based regulation loop, which explained the relevance among cell-matrix adhesion, cell-cell adhesion, pluripotent stem cell morphology and pluripotency. We also found the high cell-matrix adhesion repressed the expression of some pluripotency-related genes, implying that the low-adhesion substrate may be a more suitable substrate for high-pluripotency state cells culture. A mathematical model was constructed and experimentally verified. It helped to provide a mechanistic view on the relationship among adhesion, pluripotent stem cell morphology and pluripotency.

研究分野：幹細胞 組織工学

キーワード：幹細胞 ナノファイバー 多能性能 接着力

1. 研究開始当初の背景

ヒトiPS細胞は再生医療のみならず創薬研究や生命科学および発生メカニズムの研究など多くの科学領域において重要な細胞である。

しかし、現在の初期化技術では、大量に採取した細胞に対して初期化遺伝子を導入し初期化を行うため、以下の問題を有する(Fig. 1) :

1) コロニーの中に、由来の異なる細胞・異なる初期化を受けた細胞など、性質の異なるヘテロな細胞が存在することになり、細胞の由来の追跡が困難である。

2) コロニーの中にがん化等の変異を生じた細胞・不良な細胞が混在している可能性があるが、それを取り除くことは困難である。初期化遺伝子導入の代わりに、化合物を用いてiPS細胞を誘導する技術が成功したことによって、細胞ががん化する可能性が大幅に減少されるとも予想されるが (Deng,et.al., Science, 2013)、化合物によって引き起こされる変異・不良の問題は常に残る。

3) 細胞の品質評価が可能な細胞数が少ないため、優良な細胞系をコロニーから選出することが困難である。

2. 研究の目的

現在のiPS細胞作製技術では、大量に採取した体細胞に対して複数の初期化遺伝子を導入し、そこから生成してくるコロニーを増殖・培養することによりiPS細胞を得ている。従って、得られるコロニーが単一クローンである保証はなく、むしろ由来の異なる細胞が異なる初期化を受けて得られたヘテロな集団と考えるべきである。このことは、創薬においては研究の再現性に、再生医療においては安全性に、深刻な影響を与える。本研究は、ナノファイバー上では単一iPS細胞が増殖できるという申請者らの発見を応用し、マイクロ流体デバイスを用いて、初期化操作により得られたiPS細胞コロニーから単一細胞を分離・隔離して分化させる手段を開発することを目的とし

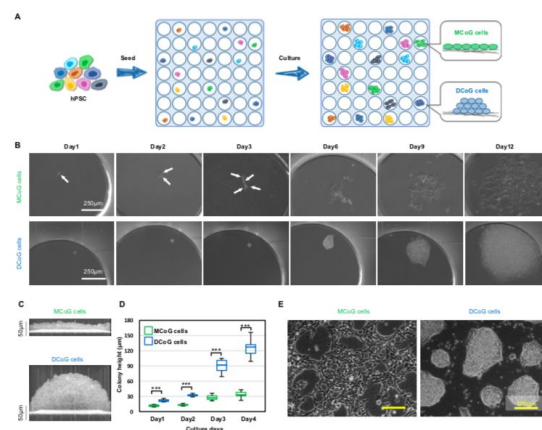
ている。これにより、由来が明確な細胞による基礎実験・創薬研究を可能にするとともに、クローンを大量培養することにより、安全な再生医療への道を開拓する。すなわち、「血統書付き」のヒトiPS細胞および分化細胞の提供を実現する。

3. 研究の方法

本研究は、初期化した細胞塊から単一細胞を分離し、細胞の由来が明確なiPS細胞コロニーの作成および分化細胞の生存環境を見出すために、単一iPS細胞培養システムを開発する。単一iPS細胞の培養・増殖に必須な因子の同定。単一iPS細胞培養から増殖されたクローンを取り出し、細胞分子生物学的に解析することにより、トレーサブルで優良なスーパー細胞を選出する手法の開発。選出された「血統書付き」優良細胞株を、目的細胞へ分化誘導を行う。

4. 研究成果

1) シングル細胞単離と培養デバイスの作製に成功 (Fig.1)。

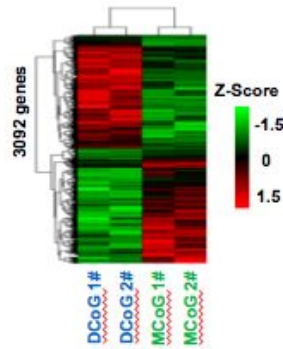


最初年度、元々計画した単一細胞分離と培養するデバイスを用いて実験を実行したら、シングル細胞の単離は成功したが、シングル細胞からコロニーまでの培養成功率は低いため、デバイスを改善して、開放式ゼラチンナノファイバーとマイクロウェルで構成したデバイスで実行した結果、単一細胞の中30%のシングル細胞からコロニーまで培養成功した。驚くこと、これらの細胞株から、明らかに形態

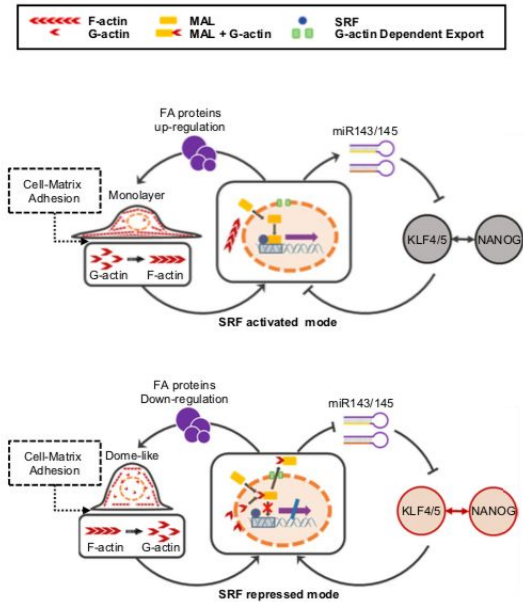
は異なった2つ(Dome-like, Monolayer)細胞タイプを発見した。2つタイプの細胞ともゼラチンナノファイバー上で長期培養した後、多能性能を有することを確認できた。

2) 2タイプの細胞の形態、多能性能、接着性との関係 (Fig.2-3)。

2タイプの細胞は形態以外の違いを解明するため、RNA-Seqを行った。その結果、20000個遺伝子の中、3000以上の遺伝子の発現



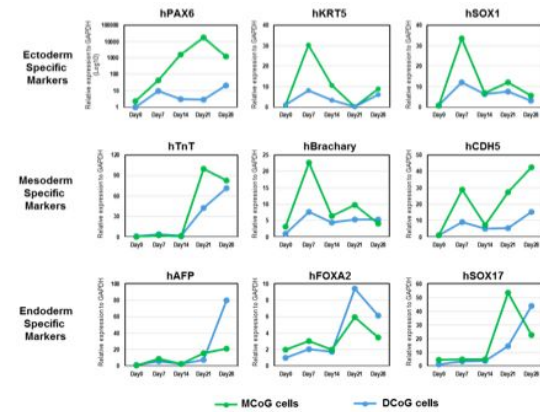
レベルの差があったことを明らかにした。さらに、これらの遺伝子を解析した結果、2種類の細胞の形成は細胞培養する基板の接着状態、多能性能と関与する細胞情報伝達回路との関連することが解明された。



3) 分化能の違い (Fig.4)

さらに、シングルhiPS細胞由来した2種類の細胞の間、多能性能に限らず、分化能も異なる傾向が見られた。それぞれ神経、心筋、肝臓細胞への分化誘導する傾向性があることを確認できた。将来に、本研究の成果を応用し

て、単一iPS細胞株を解析し、その細胞の個性を生かして、目的細胞へ分化誘導させることを目的として、「適職診断」を実現することは可能になる。



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5件)

- (1) Li J., Minami I., Yu L., Tsuji K., Nkajima M., Qiao J., Suzuki M., Shimono K., Nakatsuji N., Kotera H., Liu L.*, Chen Y.*, Extracellular Recordings of Patterned Human Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes on Aligned Fibers. Stem Cell International, 2016, 1-9, 査読あり.
- (2) Li J., Zhang F., Yu L., Fujimoto N., Yoshioka M., Li X., Shi J., Kotera H., Liu L.*, Chen Y.*. Culture Substrates Made of Elastomeric Micro-tripod Arrays for Long-term Expansion of Human Pluripotent Stem Cells J. Materials Chemistry B, 2017, 5, 236-244 査読あり.
- (3) Li J., Minami I., Shiozaki M., Yu L., Yajima S., Miyagawa S., Shiba Y., Morone N., Fukushima S., Yoshioka M., Li S., Qiao J., Li X., Wang L., Kotera H., Nakatsuji N., Sawa Y.*, Chen Y.*, Liu L.*. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue-like Constructs for Repairing the Infarcted Myocardium Stem Cell Reports, 2017, 9, 1546-1559 査読あり
- (4) Liu L., Kamei K., Yoshioka M., Nakajima M., Li J., Fujimoto N., Terada S., Tokunaga Y., Koyama Y., Sato H., Hasegawa K., Nakatsuji N., Chen Y., Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells Biomaterials, 2017, 124, 47-54, 査読あり

- (5) Yu L., Li J., Hong J., Takashima Y., Fujimoto N., Nakajima M., Yamamoto A., Dong X., Dang Y., Hou Y., Yang W., Minami I., Okita K., Tanaka M., Luo C., Tang F., Chen Y., Tang C.*, Kotera H.*, and Liu L.*, Low Cell-Matrix Adhesion Reveals Two Subtypes of Human Pluripotent Stem Cells, Stem Cell Reports, *in press*.

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) Yu. L., Liu L., et. al., Single Cell Culture of Human Pluripotent Stem Cells, International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2015, Stockholm, Sweden,
- (2) Yu. L., Liu L. et. al., Developing Single Cell Culture Platform for Human Pluripotent Stem Cells, The 6th Japan-China-Korea MEMS/NEMS conference, Xi'an, China, 2015
- (3) L. Liu, et. al., ナノファイバーを用いた再生医療への応用, 日本機械学会年次大会 2015, Sapporo, Japan
- (4) Yu. L., Liu L. et. al., Identification of a novel naïve state-like cell type in human pluripotent stem cells population, 第 15 回日本再生医療学会, 2016, Osaka, Japan.
- (5) Liu L., et. al., Low cell-matrix adhesion regulate pluripotent stem cells shape and naïve-related genes expression via serum response factor based signaling. CiRA/ISSCR 2016 International Symposia, 2016, Kyoto, Japan
- (6) Yu. L., Liu L. et. al., Low cell-matrix adhesion microenvironment promote maintain of high-pluripotency state stem cells, 10 Years of iPSCs Cell Symposium, 2016, Berkeley, USA
- (7) Yu L., Liu L., et. al., Down-regulated Cell-Matrix Adhesion Promote Maintain of Naïve-like Human Pluripotent Stem Cells, International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, 2016, San Francisco, USA
- (8) Yu L. Liu L., et. al., International Microprocesses and nanotechnology Conference (MNC), Kyoto, Japan
- (9) Yu. L., Liu L., et. al., Human Pluripotent Stem Cell Clones are Revealed by a Single Cell Culture Platform, Biomedical Engineering Society (BMES) 2017, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：環状心筋細胞塊
発明者：劉 莉、李 俊君
権利者：京都大学
種類：発明
番号：特許 2016-255258,
出願年月日：出願日 2016 年 12 月 28 日,
国内外の別：国内

名称：心筋細胞に分化させるための多能性幹細胞の製造方法
発明者：劉 莉、于 楽謙、李 俊君
権利者：京都大学
種類：発明
番号：特許 2017-202029
出願年月日：出願日 2017 年 10 月 18 日,
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 莉 (LIU Li)

大阪大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究者番号：50380093

(2) 研究分担者

陳 勇 (CHEN Yong)

京都大学物質細胞統合システム拠点 教授
(当時)

研究者番号：70512458

(3) 連携研究者

中辻 憲夫 (NAKATSUJI Norio)

京都大学物質細胞統合システム拠点 教授
(当時)

研究者番号：80237312

連携研究者

小寺 秀俊 (KOTERA Hidetoshi)

京都大学工学研究科 教授 (当時)

研究者番号：20252471

連携研究者

鷲津 正夫 (WASHITSU Masao)

東京大学 工学研究科 教授

研究者番号：10201162