

博士論文（要約）

論文題目

幹細胞分化の時空間的制御に関する研究

川田治良

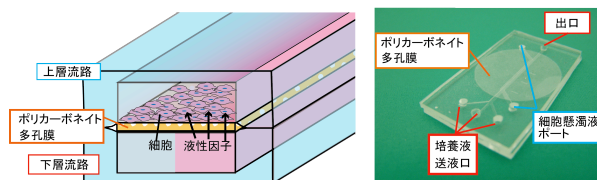
## はじめに

近年、多能性幹細胞、特に胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の研究が世界中で行われている。ES/iPS 細胞は三胚葉系由来の全ての細胞への分化が可能(多分化能)であり、無限増殖能を有する細胞である。この多分化能と無限増殖能を利用することで、再生医療や薬剤スクリーニングへの応用が期待されている。先行研究によって ES/iPS 細胞からいくつかの細胞組織への分化誘導法が示されており、細胞の種類によっては分化誘導するための培養条件が整いつつある。しかしながら、未だに分化現象や自己組織化のメカニズムを明らかにするまでには至っていない。幹細胞研究のように微小スケールで空間的に制御された分化シグナルを細胞に与える必要がある実験では、従来の培養器具内の様に細胞に対して一様な物質分布を作用させるだけの環境では不十分である。そのため、培養環境を制御できる技術、特に分化因子を細胞に対して空間特異的に作用させることができる技術の開発が求められる。

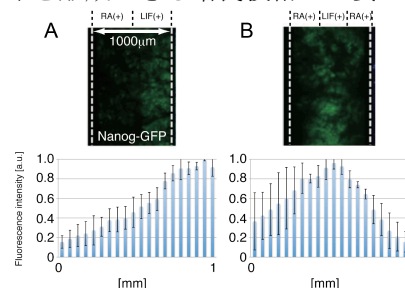
ES/iPS 細胞を培養する手法として、二次元培養と、浮遊培養等によって形成する胚様体を介する三次元培養の二つの手法があり、本研究では主にこの2つのフォーマットで培養されている ES/iPS 細胞に対して部位特異的に異なる物質を作用させることが可能な細胞培養法を確立し、細胞分化の時空間的な制御を試みる。

## 二次元培養での時空間分化制御

細胞培養環境を制御するための技術として、マイクロ流体デバイスを利用した細胞培養法が提案されてきた。マイクロスケールの流路内では流体の挙動が層流となるので、流量制御により物質分布を制御することができる。そのため、マイクロ流路内に細胞を播種し、異なる因子を含む培養液から成る多層流を形成させることで、部位特異的な物質分布が形成され、細胞に対して特異的な物質分布を作用させることができる。しかしながら、マイクロ流体デバイス内に播種した細胞に直接流れを当てると、細胞死の誘導や物理的な刺激により分化状態が変化することが明らかになっている。そのためマイクロ流路内で細胞培養を行う際には流れによる細胞へのダメージを軽減し、さらに長時間安定して部位特異的な物質分布を形成できる培養技術が必要となる。



**Figure1** 上下層流路とその間の多孔膜から構成される二次元培養での分化制御デバイス。上層流路に播種された細胞は下層流路から上層流路に輸送された物質に曝露される。デバイスはPDMS製、多孔膜はポリカーボネイト製のものを使用。

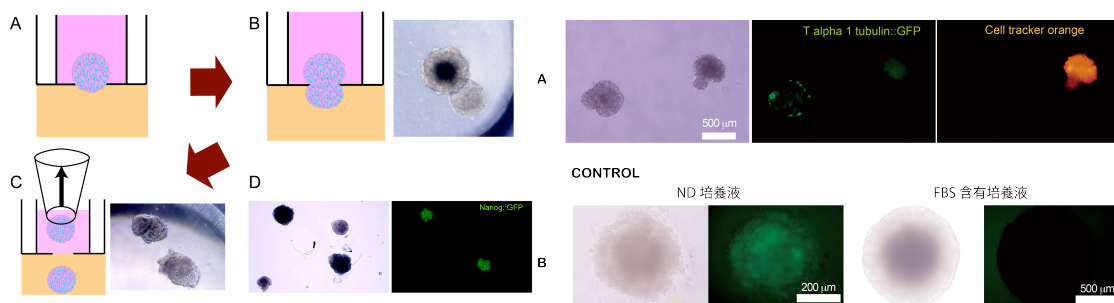


**Figure2** (A) Rac 含有培養液と LIF 含有培養液を流し、下層流路に二層流を形成させたところ、部位特異的に分化誘導できた。(B)下層流路内に三層流を形成することで、層流パターンに応じて異なるパターンで分化状態を誘導できた。

二次元培養されている細胞の物質分布を制御するデバイスとして、Figure1 に示すように、ポリカーボネイト製の多孔膜によって仕切られた、PDMS 製の幅 1mm 高さ 200 $\mu$ m の上下層の流路から構成されるデバイスを開発した。実際の培養ではまず、本デバイスの上層流路に細胞を播種し多孔膜上に接着させた後、下層流路に異なる因子を含む培養液を送液する。そうすると下層流路内に多層流のパターンに対応した部位特異的な物質分布が形成され、多孔膜の孔を通過し上層流路へ輸送された因子の分布を多孔膜上の細胞に対して作用させることができる。実験ではマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17 細胞株、未分化時に未分化マーカーの Nanog のレポーターとして GFP が発現する細胞株) を本デバイスに播種し、下層流路に未分化因子である LIF (Leukemia Inhibitory Factor、白血病抑制因子) と分化因子である Rac (Ratinoic Acid、レチノイン酸) をそれぞれ含む培養液を同じ流量で送液した。送液 5 日目に蛍光観察を行ったところ、Rac に曝露した部位の GFP の蛍光が弱くなり、LIF 側の細胞は強い蛍光を発している (Figure2 A)。これは流路内の細胞が部位特異的に未分化状態と分化状態へ誘導されたことを示している。次に、下層流路の両サイドに Rac 含有培養液を送液し、その間の中央に LIF 含有培養液を送液し、三層流を形成させたところ、上層流路内の中央付近の細胞を未分化状態に維持し、両サイドの細胞を分化状態へ誘導することができた (Figure2 B)。これらの結果から、下層流路内の送液パターンによって上層流路内の細胞の分化状態を空間的に制御できることを示した。

### 三次元培養での空間的分化制御

胚様体に対して部位特異的に異なる分化状態を誘導する手法として、先行研究では流路内で胚様体の一部を接着させてから多層流に曝露することで分化因子を部位特異的に作用させる手法や、拡散によって形成される物質分布を胚様体に作用させる手法が提案されている。胚様体に対して部位特異的に分化誘導するためには二つの要件を満たす必要があり、それは(1)胚様体を接着させずに同じ場所に固定可能、(2)胚様体が大きくなっても同じ部位に因子を作用させることが可能、この二点である。これらの要件を満たす新しい手法として、底面に孔を有する薄膜を張ったインサートをウェルに導入する手法を開発した。



**Figure3** (A)胚様体はインサート内の孔上に固定した後、しばらく培養すると(B)分節型胚様体を形成する。(C)分節型胚様体を取り出す時は、膜の上下でスフェロイドを分けて取り出すことができる。(D)インサートとウェルに LIF 含・不含培養液を設定してマウス iPS 細胞由来胚様体を培養すると、分化・未分化状態のスフェロイドをそれぞれ誘導できた。

**Figure4** 胚様体への部位得意的神経分化誘導実験。(A)インサートとウェルに ND 培養液と FBS 含有培養液をそれぞれ設定し、六日目に CTO をインサートに入れて染色した。胚様体を取り出すと、ND 培養液に曝露した部位から神経マーカー(GFP 蛍光)が確認できる。FBS 含有培養液に曝露した部位は CTO の蛍光が確認できた。(B)コントロール実験結果。

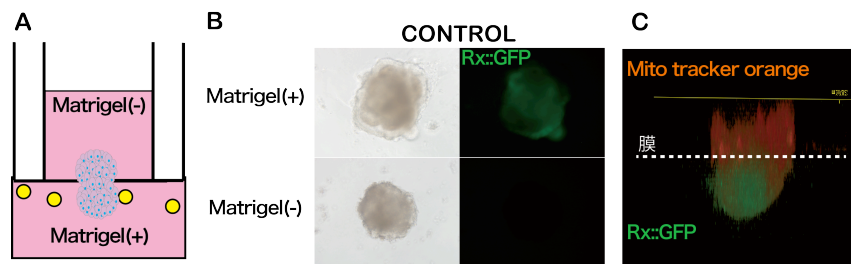
その膜は直径 200 $\mu$ m の一つの孔を有しており、インサート内に胚様体と培養液を入れると静水圧によりインサート側からウェル側へ流れが発生し、その流れによって孔付近まで輸送された胚様体は孔上に固定される(Figure3 A). 固定された後は、インサートとウェルに異なる因子を含む培養液を設定することで、胚様体を部位特異的に異なる物質に曝すことができる。この手法を使用すると膜孔の上下で細胞が増殖し、培養された胚様体は分節型の形状になることが分かっており、これを分節型胚様体(Articulated EB、Art-EB)と名付けた(Figure3 B). 数日間培養した後、ディッシュ等へ移して観察することが可能である(Figure3 C). 実際に、iPS 細胞(前の実験と同様の iPS 細胞株)由来胚様体を使用し実験を行った。96 ウェルプレート内で胚様体を形成後、インサート内に胚様体を移し、インサート内に LIF 含有培養液を、ウェル内に LIF 不含培養液を設定した。インサート内で4日間培養した後に孔の上下でスフェロイドを引き離し、ディッシュに移して観察したところ、GFP の蛍光が強いスフェロイドと蛍光が消失しているスフェロイドを確認できた。これは一つの胚様体の指定した部位が分化・未分化状態に誘導されたことを示している(Figure3 D).

次に、ES 細胞株 (T $\alpha$ -1 tubulin::GFP mES 細胞株、神経分化した際に GFP が発現する細胞株) 由来の胚様体に対して部位特異的に神経分化を誘導する実験を行った。本実験ではインサート内に FBS 含有培養液を、ウェル内に KSR・Rac 含有培養液 (neural Differentiation 培養液、ND 培養液) を設定し培養を行った。培養6日目にインサート内に cell tracker orange(CTO) を滴下し、孔上のスフェロイドだけを染色してからディッシュに移して蛍光観察を行った。CTO で染色されているスフェロイドが FBS 含有培養液に曝露していた部位であり、染色されていない部位が ND 培養液に曝露していた部位だと判断できる。FBS 含有培養液に曝露していた部位は GFP の蛍光が弱く、ND 培養液に曝露していた部位は GFP の蛍光が強い。コントロール実験としてウェルプレート内でそれぞれの培養液で胚様体を培養したところ、分節型胚様体の結果と同様の結果であった。以上よりインサートとウェルの培養システムを利用することで一つの胚様体に対して部位特異的に神経分化を誘導できたことがわかった。

次に、胚様体において部位特異的眼胞分化の誘導を試みた。ES 細胞株 (Rx-GFP K/I EB5 細胞株、網膜前駆細胞に分化した際に GFP が発現する細胞株) 由来の胚様体をインサート内で培養し、インサートとウェル内にマトリゲル不含・含有培養液を設定して培養を行った(Figure5 A). コントロール実験として、96 ウェルプレート内でそれぞれの培養液を用いて培養したところ、マトリゲル含有培養液で培養した際には Rx::GFP の発現が観察できた。(Figure5 B). 実験では培養7日目に Mito tracker orange(MTO)でインサート内のスフェロイドを染色した後に、インサート内の Art-EB を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、膜孔の下に形成されたスフェロイドから強い Rx::GFP の蛍光を観測することができた(Figure5 C). これは部位特異的に網



膜前駆細胞を誘導できたことを示している。



**Figure5** 胚様体に体する部位特異的眼胞分化誘導実験(A) インサートとウェルにマトリゲル不含、含有培養液を設定して培養を行った． (B) 96 ウェルプレート内はマトリゲルを含む培養液で培養すると、網膜前駆細胞マーカーである Rx が発現する． (C)培養 7 日目にインサート側のスフェロイドを MTO で染色した後に共焦点レーザー顕微鏡でインサート内の Art-EB を観察すると、膜孔の下で Rx::GFP が強く発現している．

### まとめ

本研究では、二次元および三次元のフォーマットで培養された ES/iPS 細胞を部位特異的に異なる物質に曝露可能な培養手法を開発した．これらの手法を実際にマウス ES/iPS 細胞の分化誘導に適用したところ、二次元培養では層流のパターニングによって分化-未分化状態を空間的に制御でき、また分化因子のパターンを時間的に変化させることで時間的にも異なる細胞の挙動を誘導することが確認できた．三次元培養では、インサートとウェルから構成される培養システムを利用することで胚様体に対して指定した場所に分化状態と神経分化状態、さらに網膜前駆細胞に分化したスフェロイドを誘導することに成功した．

これらから、二次元および三次元で培養された ES/iPS 細胞を部位特異的に異なる物質に曝露する技術により、空間的に分化状態を誘導できることを確認できた．この分化制御技術により、分化現象のさらなる解析や、ディッシュでは分化誘導が不可能であった細胞組織を誘導することができる．さらに患者由来の細胞等を利用して体内と類似した高次組織を形成し、そのような組織を薬剤スクリーニングなどへ応用することが期待できる．