
ヒト ES/iPS 細胞に適した環境を創出する デバイスの開発に成功

—創薬や再生医療の更なる発展のカギに—

京都大学（総長：山極壽一）物質—細胞統合システム拠点（iCeMS=アイセムス）の陳勇（チェン・ヨン）特定拠点教授、亀井謙一郎（かめい・けんいちろう）特定准教授らの研究グループは、ヒトES/iPS細胞に適した非常に小さな3次元空間を創りだすデバイスの開発に、世界で初めて成功しました。この研究成果は、ヒトES/iPS細胞^{*1}から機能的な組織の作製法の開発につながると期待されます。

ヒトES/iPS細胞は再生医療や創薬などで活躍する細胞として期待されています。その一方で従来から使用されている2次元（平面）細胞培養では、目的の細胞機能を獲得することは困難でした。これは、ヒトの体の中における細胞を取り巻く3次元的な環境を従来法では作り出せなかったことが原因に挙げられます。

そこで今回の研究では、半導体分野などで実用化されている微細加工技術を基にした「マイクロ流体デバイス^{*2}」と、温度に応じて「ゲル」↔「液体」と変化することができるヒドロゲル^{*3}に着目しました。これらを用いて、細胞を取り巻く3次元的な環境を人工的に創りだし、ヒトES/iPS細胞の培養や実験を行うことができます。

本成果により、ヒトES/iPS細胞を3次元的に培養することによって、より機能的な組織細胞を作製できるようになり、より正確な創薬や再生医療の発展に寄与できることが期待されます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金（若手研究（A）研究代表 亀井謙一郎、課題番号23681028；挑戦的萌芽研究 研究代表 亀井謙一郎、課題番号24656502）、テルモ生命科学芸術財団（特定研究助成、研究代表 亀井謙一郎）、文部科学省 WPIプログラムの支援を受けて行われました。

本成果は2016年10月24日に独科学誌「Advanced Healthcare Materials（アドバンスドヘルスケアマテリアルズ）」で公開されました。

1. 背景

ヒトES/iPS細胞は、再生医療、細胞移植治療、創薬などに応用・実用化が期待されている細胞で、世界中の研究者がその実用化へ向けて研究を進めています。実用化へ向けて、この細胞を目的に応じて自在にコントロールすることが非常に重要ですが、一方で、それが難しい細胞でもあります。そこで、この問題を解決する実験法の確立が重要となっています。

この問題点の一つとして従来からの細胞培養法が挙げられます。長年行われている細胞培養法では、細胞培養フラスコやディッシュなどを使用していますが、これらは実験者にとって操作しやすいものの、細胞自身に適したものではありません。それは、細胞が本来あるべき環境とは異なるからです。

私たちの体において、細胞はそれを取り巻く環境があって、始めてその機能を発揮することが知られています。これを「細胞外微小環境」といいます（図1）。この環境は、非常に小さい3次元的な空間においてガス分子、成長因子^{*4}、細胞外マトリックス^{*5}、硬さ・圧力、などの様々な因子で構成されています。細胞の大きさは約10マイクロメートル（1/100000メートル）ですが、従来の細胞培養法で使用されているフラスコなどは数センチメートルの大きさであるため、小さな空間を取り扱うには不向きです。

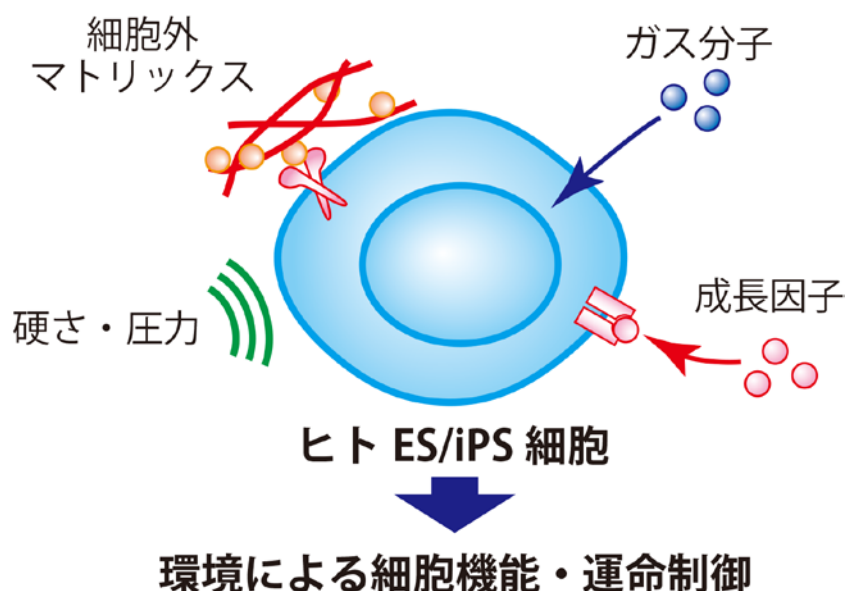
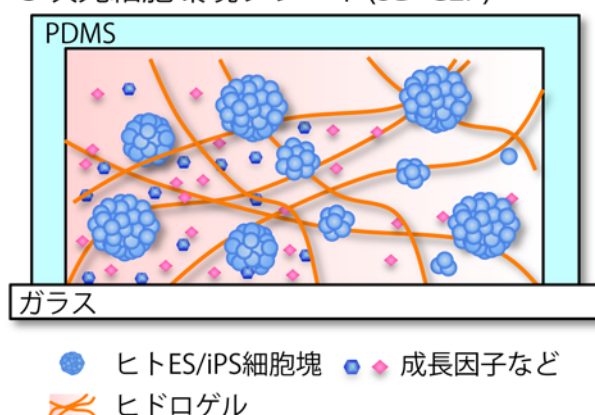


図1 細胞外微小環境による細胞の機能・運命制御。この環境を人工的に創出できれば、私達が自在にヒトES/iPS細胞を制御できるようになります。

そこで本研究では、より生体内に近い環境を作り出すために「マイクロ流体デバイス」に着目しました。このデバイスは元々非常に小さい液滴を扱うのに適した技術であり、これまでに化学合成や分離などへ応用されていました。近年では、このデバイスを細胞生物学に応用する試みが盛んに行われています。つまり、このデバイスを用いることで、環境に関する因子を制御できるようになるからです。しかし、従来のマイクロ流体デバイスでは、細胞をデバイス内の平面的な基材上に培養しているだけであり、本当の意味での3次元培養ではありませんでした。

そこで本研究では、この課題を克服するためにヒドロゲルを応用し、マイクロ流体デバイス内でヒトES/iPS細胞に適した3次元的な環境を創出することに目的としました。

3次元細胞環境プレート(3D-CEP)



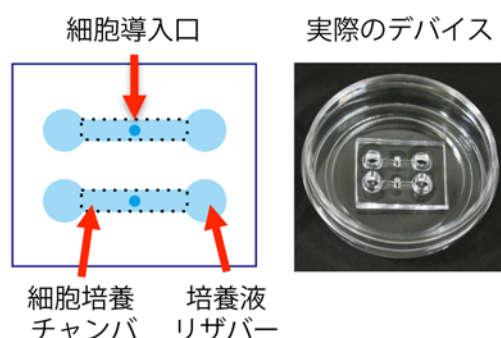
本研究で開発したマイクロ流体デバイスの利点

- 非常に小さい空間（数百マイクロメートル）を作製
- 細胞外微小環境因子を厳密制御
- 操作が容易

図 2 本研究で開発したマイクロ流体デバイスの概念図とその利点。マイクロ流体デバイスとヒドロゲルを組み合わせることによって、細胞外微小環境因子を3次元的に厳密制御できるようになります。このデバイスを私たちは「3次元細胞環境プレート(3D-CEP)」と名付けました。

2. 研究内容と成果

本研究では、ヒトES/iPS細胞に適した3次元的な細胞外微小環境を創出することを可能にするマイクロ流体デバイスの開発に成功しました。このマイクロ流体デバイスは、従来の複雑で特殊な装置を必要とするデバイスではなく、極めてシンプルに、多くの生物系の研究室でも実験が可能なデザインにしました(図 3)。また、本研究で開発した培養法と従来法における細胞の挙動の違いを明らかにするために、



細胞の表現型解析^{*6}や網羅的遺伝子発現解析^{*7}を行いました。

図 3 本研究で開発したマイクロ流体デバイス 3D-CEP のデザインと、実物の写真。一つのデバイスに付き、2つのマイクロ流路(細胞培養チャンバ)を設置しています。その中央から細胞とヒドロゲルを導入します。各チャンバの端には培養に必要な十分な培養液を保存できるリザーバーを設置しています。

まず、3次元細胞培養を確立するために、細胞外基質として熱相転移ヒドロゲルポリマー

(poly(*N*-isopropylacrylamide)- β -poly(ethylene glycol) (PNIPAAm- β -PEG)) を使用しました(図 4)。

このポリマーと細胞培養液を混ぜることで、ゲル中で3次元的にヒトES/iPS細胞の培養ができました(図

5)。また、このポリマーは可逆的に相転移（ゲル↔液体）することから、培養後にデバイスを氷上に置くことで、細胞のダメージなく回収できます。

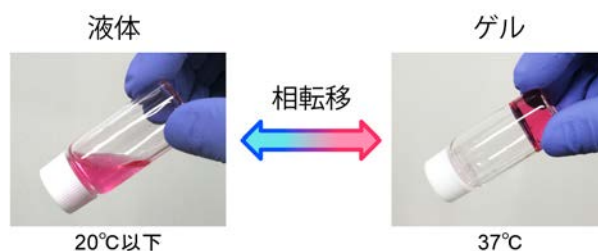


図 4 本研究で使用した熱相転移ヒドロゲル (poly(N-isopropylacrylamide)- β -poly(ethylene glycol) (PNIPAAm- β -PEG))。生体適合性が高く、細胞とその培養液を混ぜたゲルの状態での培養ができます。また、培養後にゲルから細胞を回収することも容易です。

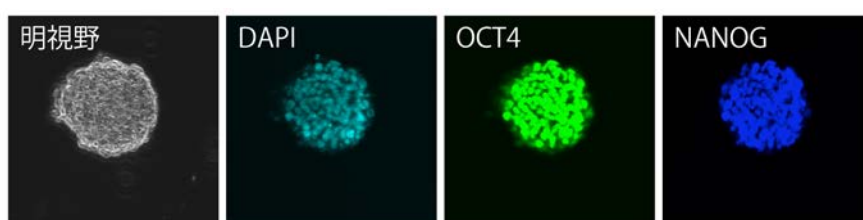
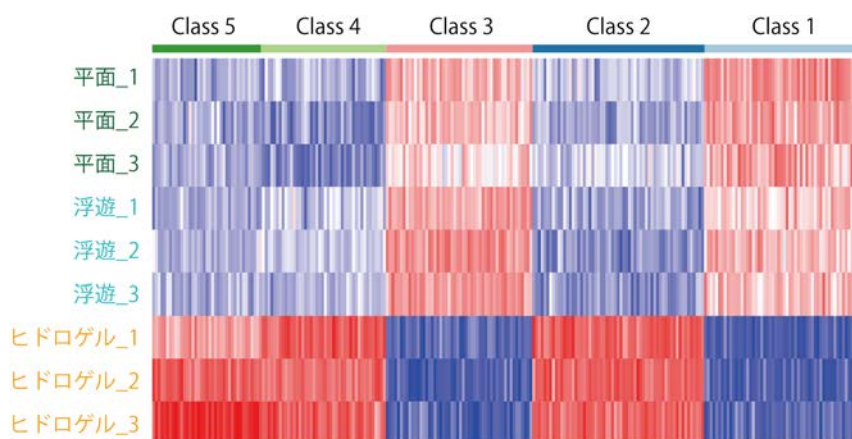


図 5 3D-CEP 内で 3 次元培養したヒト ES 細胞の顕微鏡写真。OCT4 と NANOG で免疫細胞染色を行い、培養した細胞の未分化性を確認しました。DAPI は細胞核染色。

次に、従来の細胞培養法（平面培養、浮遊培養）と新規 3 次元培養法で培養した細胞との違いを明らかにするために、細胞の機能解析や遺伝子発現解析を行いました（図 6）。その結果、細胞表現型としての変化はほとんど確認できませんでしたが、各培養法に特異的な遺伝子発現パターンを見出すことができました。



環境に応じて変化する遺伝子群を同定

図 6 3D-CEP 内で 3 次元培養したヒト ES 細胞 (ヒドロゲル) と、従来の細胞培養法 (平面、浮遊) で培養した細胞内における遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析^{*8}。特に顕著に違いが確認できるものだけを同定。

3. 今後の展開

本成果では、ヒト ES/iPS 細胞の新しい 3 次元培養法として、これまで生体外では作製することが難しかった細胞外微小環境を創出できるマイクロ流体デバイスを開発することに成功しました。今後、ヒト ES/iPS 細胞を始めとする細胞の機能を厳密に制御している生体内の制御機構の解明や、組織工学や再生医療の発展に貢献することが期待されます。

また、本研究で開発したデバイスは、創薬スクリーニング（創薬時に、目的の効果を得られる化合物を選択する過程）にも応用することが可能です。これまでの創薬スクリーニングにおける 2 次元培養細胞アッセイ（評価法）ではなく、より機能的な 3 次元培養細胞アッセイを行うことで、薬剤候補物質に対するより生体に近い細胞応答を評価することが可能になります。

さらに、この細胞外微小環境は、がん幹細胞においても非常に重要です。近年、細胞外微小環境はがん幹細胞形成・維持、抗がん剤への抵抗性や、がんの再発に関与していることが示唆されています。本研究で開発した 3 次元培養法は、がん幹細胞研究にも応用可能であり、新しい抗がん剤の開発にも役立つと期待されます。

現在、本研究で開発したマイクロ流体デバイス、3D-CEPの市販化を目指しています。創薬・診断における有用性を示すために、クレオ・バイオサイエンスなどとの共同研究によりハイスループット^{*9}な 3D-CEPを開発しています（図 7）。

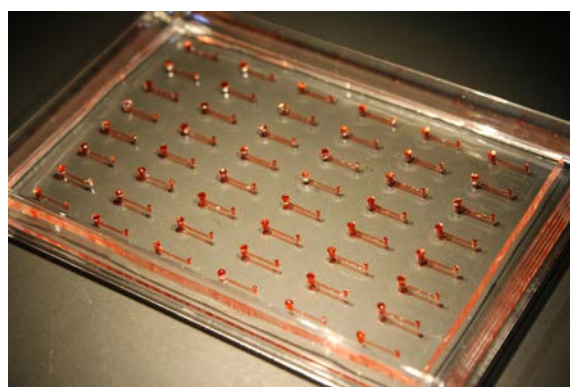


図 7 現在、共同開発により試作中のCEP^{3D}。

4. 用語解説

※1 ヒトES/iPS細胞：ヒト由来の胚性幹細胞（embryonic stem cell）と人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）の略。生体外における無限回の自己複製能と、あらゆる組織細胞へと分化が可能な、特徴的な性質も持っている。そのため、再生医療や創薬への実用化が期待されている。ヒトiPS細胞は、本学山中教授、iPS細胞研究所所長によって開発され、その誘導機構の発見から、2012年にジョン・ガードン ケンブリッジ大学名誉教授と共にノーベル賞が授与された。

-
- ※2 **マイクロ流体デバイス**：微細加工技術を応用して作製されたデバイス。化学物質の合成や分離などで利用されるだけでなく、微小空間における物理現象を研究するためにも使用される。近年では、極微量のサンプルなどから遺伝子増幅・解析が可能なデバイスなども開発されている。
 - ※3 **ヒドロゲル**：ポリマー中に水分子を含有したゲル。ゼラチンや寒天などが代表的なヒドロゲルであるが、近年では創傷治療や組織工学への応用研究の発展が著しい。
 - ※4 **成長因子**：生体内において、細胞の増殖や分化などの機能制御に関わるタンパク質群の総称である。
 - ※5 **細胞外マトリックス**：生体内において、細胞の外にあるタンパク質や構造体のことであり、細胞外微小環境を構成する因子の一つである。コラーゲンやラミニンなどが代表的な細胞外マトリックスタンパクである。
 - ※6 **細胞表現型解析**：細胞の表現型とは、実際に現れた細胞の性質のことである。細胞の形や、動き、分子発現などを総合的に考慮して解析する。
 - ※7 **網羅的遺伝子発現解析**：細胞内の全遺伝子発現量を測定・解析すること。
 - ※8 **マイクロアレイ解析**：多数のDNA断片を高密度で基板上に集積し、細胞内の遺伝子発現量などを測定、解析すること。
 - ※9 **ハイスループット**：時間、経費、労働力を軽減するために、大量なサンプル・実験量を効率良くできるように、ロボットなどを用いて高速、かつ並列的に実験を行うこと。

5. 論文タイトル・著者

“Characterization of phenotypic and transcriptional differences in human pluripotent stem cells under two- and three-dimensional culture conditions”

Ken-ichiro Kamei*, Yoshie Koyama, Yumie Tokunaga, Yasumasa Mashimo, Momoko Yoshioka, Christopher Fockenber, Rowland Mosbergen, Othmar Korn, Christine Wells, and Yong Chen*

Advanced Healthcare Materials | DOI: 10.1002/adhm.201600893

*は本研究全般に関する責任著者

6. iCeMS について

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点 (WPI) プログラム」に平成 19 年度に採択された拠点です。iCeMS では、生物学、物理学、化学の分野を超えて新しい学問を作り、その学問を社会に還元することを目標に活動している日本で唯一の研究所です。その新しい学問からは、汚水や空気の浄化といった環境問題の解決、脳の若返りといった医療に役立つ可能性を秘めたとてつもないアイデアが次々と生まれています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/>

7. 世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) について

WPI は、平成 19 年度から開始された文部科学省の事業です。WPI では、世界トップレベルの研究に取り組むことはもちろんのこと、従来の大学のシステムでは成しえない研究組織・研究環境・事務体制の国

際化を目指しています。これらは短期間で実現できるものではないため、10年という実施期間が設けられており、各拠点は今まで様々な取り組みを行ってきました。その結果、拠点長のリーダーシップのもと、拠点内の公用語を英語としたり、研究者の外国人比率30%を達成するなど先進的な取り組みを行っているほか、現在までに、採択拠点からノーベル賞受賞者を2名（山中伸弥先生、梶田隆章先生）輩出するなど、高い成果を挙げています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <https://www.jsps.go.jp/wpi/>