
ヒト多能性幹細胞に適した環境を見出す ナノハイブリッドデバイスの開発に成功

ーナノテクノロジーの創薬・再生医療への新展開ー

京都大学物質－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) iCeMS 特定准教授、眞下泰正 (ましも・やすまさ) 研究員 (現 東京工業大学生命理工学研究院 助教) らの研究グループは、多種類の細胞環境を集積した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 細胞から機能的な組織を作製するプロセス開発を大きく加速するものと期待されます。

ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞や iPS 細胞など) *¹ 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。しかし、目的の組織細胞や機能を獲得するには、解決すべき課題が多いのが現状です。本研究では細胞を取り巻く環境に関する課題に着目しました。

ヒトの体内において、細胞は取り巻く環境 (細胞外環境) によって機能や運命が制御されています。細胞外環境はガス分子や圧力など大変多くの因子によって成り立っており、目的の細胞にとって好条件の培養環境を見つけるためには、これらの因子を組み合わせる様々な細胞外環境を実際に再現し、試験してみる必要があります。その一方で、平面的で、ミリメートル以上というスケールの大きな従来の細胞培養フラスコでは、本来の環境を創出することはできませんでした。

本研究では、ナノ・マイクロ加工技術を基にした「マイクロ流体デバイス *²」と「ナノファイバー *³」に着目しました。マイクロ流体デバイスやナノファイバーは、細胞外環境を構成する「細胞間相互作用」や「細胞足場」を、従来の細胞培養ではできないような微細なスケールで創り出すことができます。その一方で、今までこれらは独自技術として別々に開発されていました。本研究では、世界で初めてこの 2 つの技術を統合し、従来法では実現できなかった、多様な細胞環境を一枚のプレート上に創り出すことに成功しました。

本成果では実際に、同一プレート上に再現した異なる環境同士を比較し、その中でヒト ES 細胞が未分化を維持したまま増殖するのに適した環境を見出しました。ヒト ES/iPS 細胞や機能的な組織細胞を獲得するために最適な環境・条件を効率よく探し出すことが可能となり、今後、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。

本成果は 2017 年 3 月 8 日 (日本時間 9 日午前) に独科学誌「Small (スモール)」で公開されました。

1. 背景

ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、再生医療、細胞移植治療、創薬などへの実用化が期待されています。その実用化には、ヒト ES/iPS 細胞から目的の細胞・組織を自在にかつ高効率に獲得することが非常に重要です。現状の課題の一つとして従来からの細胞培養法からの脱却が挙げられます。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します。これを「細胞外環境^{※4}」といいます（図1）。この環境は、非常に小さい3次元的な空間であり、ガス分子、成長因子^{※5}、細胞外マトリックス（ECM）^{※6}、硬さ・圧力、などの様々な因子で構成されています。細胞・組織によってこれらの構成因子の組み合わせは無数に存在し、目的とする細胞・組織を作るには様々な組合せを試験する必要があります。しかしながら、従来の細胞培養法においては、この細胞外環境を創出することは困難であり、よって応用するために知見も圧倒的に不足していました。

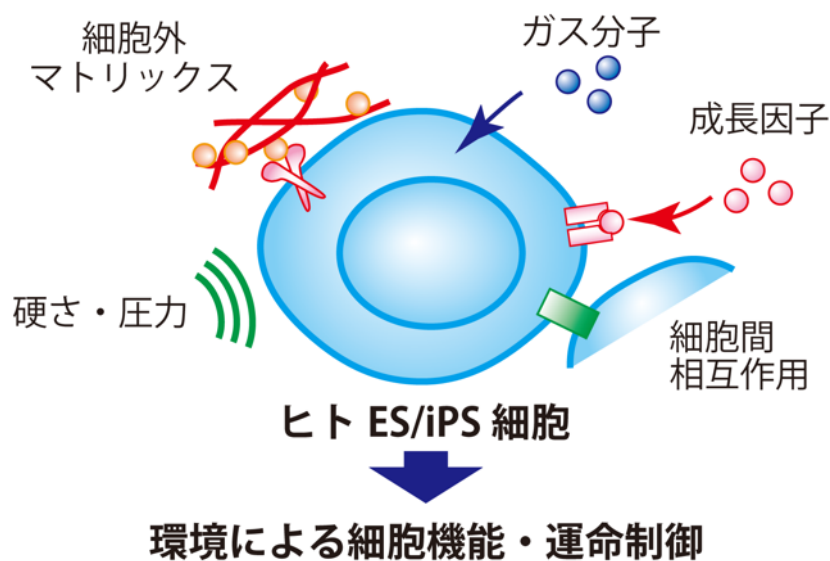


図 1 細胞外環境による細胞の機能・運命制御。この環境を人工的に創出できれば、より自在なヒト ES/iPS 細胞の制御が可能になる。

そこで本研究では、生体内に近い環境を作りだせる「マイクロ流体デバイス」と「ナノファイバー」に着目しました。マイクロ流体デバイスは非常に小さい液滴を扱うのに適した技術です（図2）。近年ではこのデバイスを用いた液性の環境因子や細胞間相互作用の操作ができるようになってきました。

世界初のヒトES/iPS培養デバイス（2009）

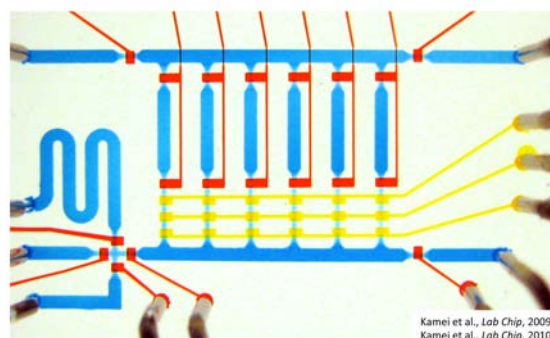


図 2 2009年に発表した世界初のヒトES/iPS細胞培養・アッセイ用マイクロ流体デバイス（亀井；RSC誌 *Lab Chip* より改変）。この時点では、細胞外マトリックスをデバイス内で作製することは困難であった。

また、ナノファイバー（図3）は直径ナノメートルスケールの繊維状の構造体の総称です。体内の細胞外マトリックス（ECM）は3次元ナノファイバー構造を持っています。エレクトロスピニング法というナノファイバー作製技術は、人工ECMの作成を可能にします。

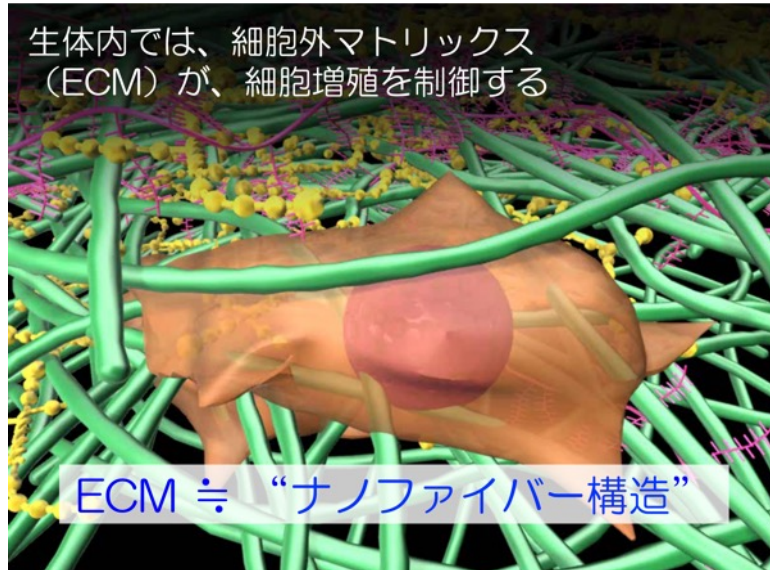


図 3 私達の体の中における細胞足場（細胞外マトリックス；ECM。図中では緑で示されている。）はナノファイバー状の構造で、細胞の増殖や機能を厳密に制御している。

複雑な細胞外環境を人工的に作り出し細胞本来の機能を獲得するためには、上記のような複数の技術の利点を融合する必要があります。しかし今までは、これらの技術は個別に開発されており、また複数の技術を融合するための手法も開発されていませんでした。

2. 研究内容と成果

そこで、本研究ではマイクロ流体デバイスとナノファイバーの技術とその利点を融合したハイブリッドデバイスを開発しました。それを、MACME アレイ (Multiplex Artificial Cellular MicroEnvironment array、参考訳：複合的な人工細胞外微小環境の群列) と名付けました（図4）。このデバイスには48個の細胞培養チャンバ（微小空間）を設置し、マイクロ流路による細胞の空間・密度制御機構と、ナノファイバーによる材料や密度などの異なる細胞足場を組合せて搭載しています。よって、多様性のある細胞外環境を一つのデバイスの中に作りだすことができます（図5）。

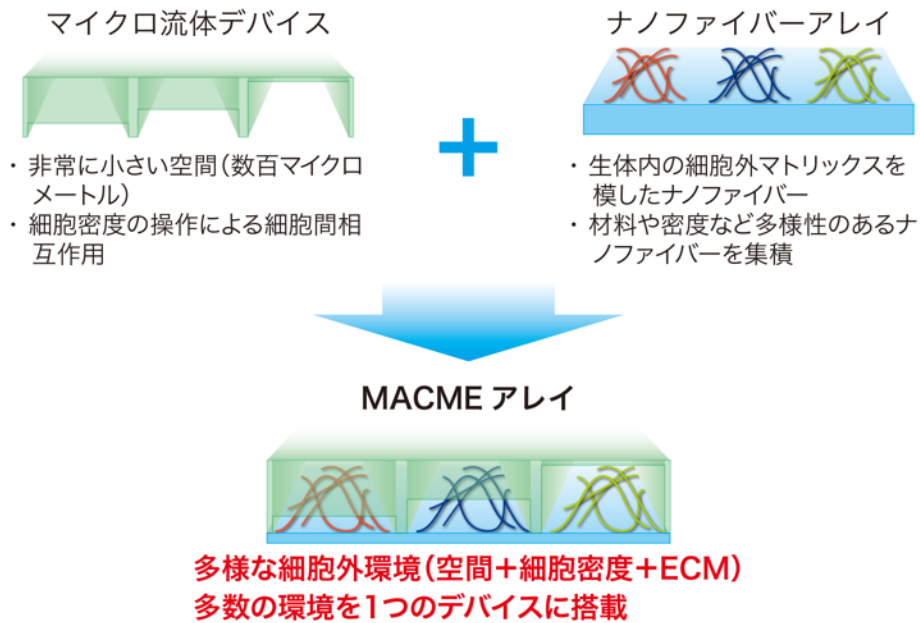


図 4 本研究で開発したマイクロ流体デバイスとナノファイバーのハイブリットデバイスである MACME アレイ。各技術の利点を融合し、細胞外環境の多様性を一つのデバイス内に創出した。

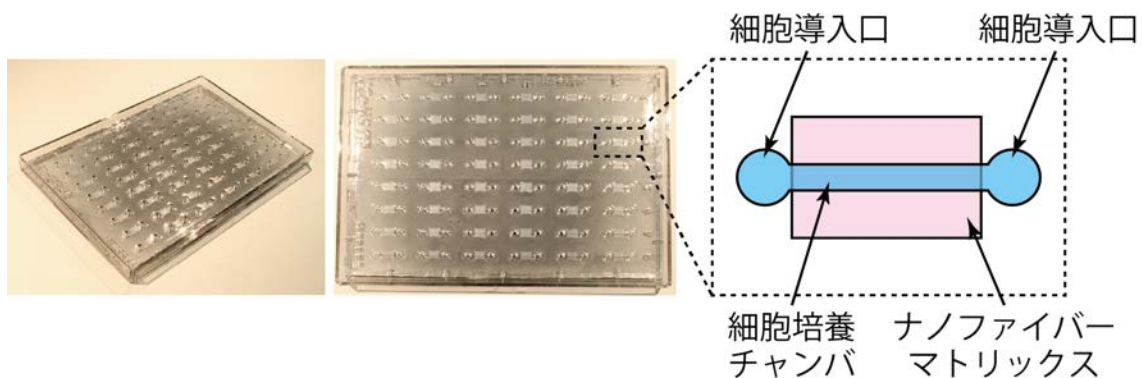


図 5 本研究で開発した MACME アレイの実物写真と、そのうちの一つの細胞培養チャンバ。一つのアレイに付き、48 個のマイクロ流路（細胞培養チャンバ）を設置している。両端の細胞導入口から細胞や培地を導入できる。細胞培養チャンバ内にはナノファイバーが設置されている。プレートのサイズは、通常の細胞培養実験に一般的に用いられる 96 ウェル（96 穴）と同じ設計である。

また、このデバイスは通常の生物系の実験室でも馴染みのある 96 ウェルプレートに準拠してデザインしてあります。よって特別な機械などを準備する必要がなく、極めてシンプルに実験を行え、特別な技術など必要ありません（図 6）。

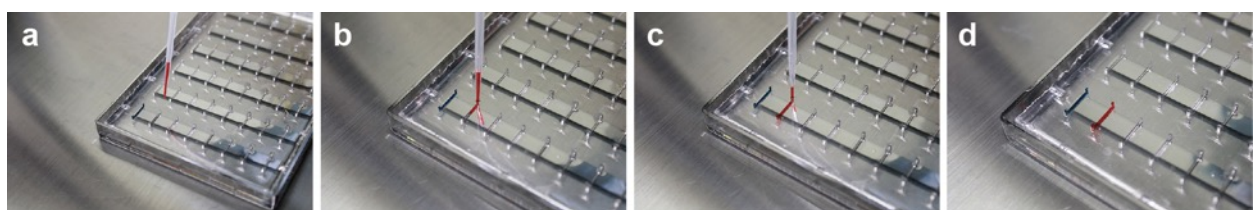


図 6 本研究で開発した MACME アレイの操作。生物・化学実験でよく使用されるマイクロピペットを用いて細胞や培養液・染色液を導入することができる。

本研究ではさらに、多様な細胞環境の中から目的の細胞機能を発揮することができるものを見つけ出す方法も開発しました。この方法は細胞を蛍光顕微鏡観察して得られた画像と、それを用いて画像処理・統計処理を行い、細胞表現型^{*7}を決定します(図6)。本研究では、ヒト ES 細胞が未分化を維持したまま増殖するために最も適する細胞外環境を同定するため、細胞挙動マーカーとして、細胞内の OCT4 (未分化維持)、Annexin V (自己細胞死)、EdU (細胞増殖) などの物質を蛍光染色し、画像解析によって各マーカーの発現量を評価し、高 OCT4、低 Annexin V、高 EdU を示す環境を目的のものとして同定した。

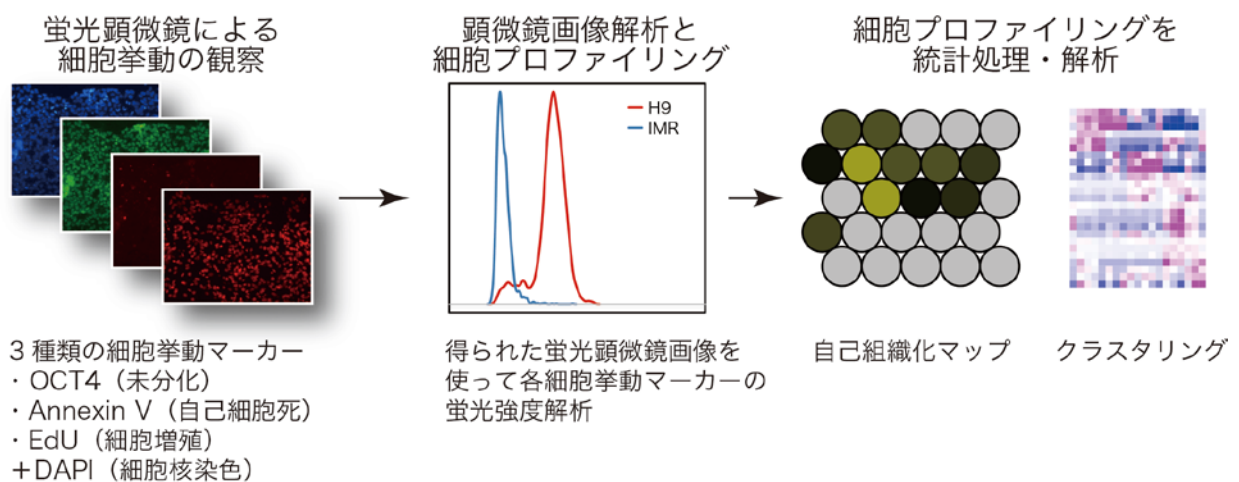


図 7 本研究で開発した細胞表現型解析法。MACME アレイ内で培養した細胞がどのように各細胞挙動マーカーを発現しているか、また環境による変化を解析するために、デバイス内で細胞染色を行った。得られた画像を使って各マーカーの発現量を測定し、それらを統計解析することによって、目的の細胞機能を発揮する環境を同定した。本研究では、ヒト ES 細胞の未分化維持に最も適する細胞外環境を同定した。

3. 今後の展開

本成果では、ヒト ES/iPS 細胞の細胞外微小環境を創出できるナノファイバーとマイクロ流体デバイスを組み合わせたデバイスを世界で初めて開発し、細胞にとって最適な環境を多様なサンプルから効率的に同定することに成功しました。今後このデバイスを用いて、ヒト ES/iPS 細胞から目的組織へと分化誘導するための最適な細胞外環境を同定できると期待され、組織工学や再生医療の発展に貢献できると期待されます。

また、本研究で開発したデバイスは、創薬にも応用することが可能です。これまで、創薬における候補薬剤の同定には、平面培養された細胞が使用されてきましたが、そのような細胞は本来の機能を発揮していないことが明らかになっていました。より正確な薬効評価や薬剤の安全性評価を行うためには、より機

能的な細胞が必要とされており、それに適した環境を与えることができる培養・実験系が求められてきました。本研究で開発したデバイスを用いることによって、上記の問題点は解決され、より正確な薬剤評価を行うことができるようになるだけでなく、コストの削減にも大きく寄与できることが期待されます。

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の形成・維持や、抗がん剤への抵抗性、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。

4. 用語解説

- ※1 **ヒト多能性幹細胞**：ヒト由来の胚性幹細胞（embryonic stem cell; ESC）と人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell; iPSC）の総称。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 **ナノファイバー**：直径が1～500ナノメートル程度の繊維状の構造体の総称。合成ポリマーや生体分子（コラーゲンやゼラチン）などを用いて作製することができる。既に、フィルターなどにも使用されているが、近年細胞足場として着目され始めている。
- ※4 **細胞外環境**：生体内において細胞を取り巻く環境であり、細胞の運命や機能を厳密に制御している。構成因子として、成長因子・細胞外マトリックス・細胞間相互作用などが挙げられる。従来の細胞培養法では、この細胞外微小環境を人工的に創出することが困難であり、その知見も不足していた。
- ※5 **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。
- ※6 **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。
- ※7 **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。

5. 研究プロジェクトについて

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；研究活動スタート支援 研究代表 眞下泰正、課題番号25886006）、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。

6. 論文タイトル・著者

“Microfluidic-nanofiber hybrid array for screening of cellular microenvironments”

Ken-ichiro Kamei*, Yasumasa Mashimo, Momoko Yoshioka, Yumie Tokunaga, Christopher Fockenber,
Shiho Terada, Yoshie Koyama, Minako Nakajima, Teiko Shibata-Seki, Li Liu, Toshihiro Akaike, Eiry
Kobatake, Siew-Eng How, Motonari Uesugi, and Yong Chen*

Small | DOI: 10.1002/sml.201603104

*は本研究全般に関する責任著者

7. 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/>

8. 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、各拠点はこれ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/>