

ゼラチンナノファイバー培養基材を用いて ヒト iPS 細胞から多能性能が高い細胞種の単離に成功 —高品質な iPS 細胞の供給に期待—

概要

京都大学工学研究科の劉莉 特定准教授（COI）（兼：高等研究院 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS＝アイセムス）連携准教授：研究当時、現：大阪大学大学院医学系研究科特任准教授）、京都大学工学研究科の小寺秀俊 教授（研究当時、現：理化学研究所 理事）、于楽謙 同博士課程学生（研究当時、現：米国テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター研究員）、iPS 細胞研究所 沖田圭介講師、北京大学生物定量センター 湯超教授らの研究グループは、ゼラチンナノファイバー（GNF）技術¹とマイクロ加工技術を融合して、シングルヒト iPS 細胞を単離・培養する基盤的なシステムを開発し、世界で初めてヒト iPS 細胞から多能性能が高いサブタイプ細胞の単離と培養に成功しました。今後このシングル細胞単離・培養システムを用いて、不均一な細胞集団から単一クローン²を樹立し、それぞれ細胞固有の個性を生かして、分化指向性が揃った高品質な iPS 細胞の提供を目指します。

本研究は、2018 年 6 月 29 日に米国の科学誌「Stem Cell Reports」のオンライン版で公開されました。

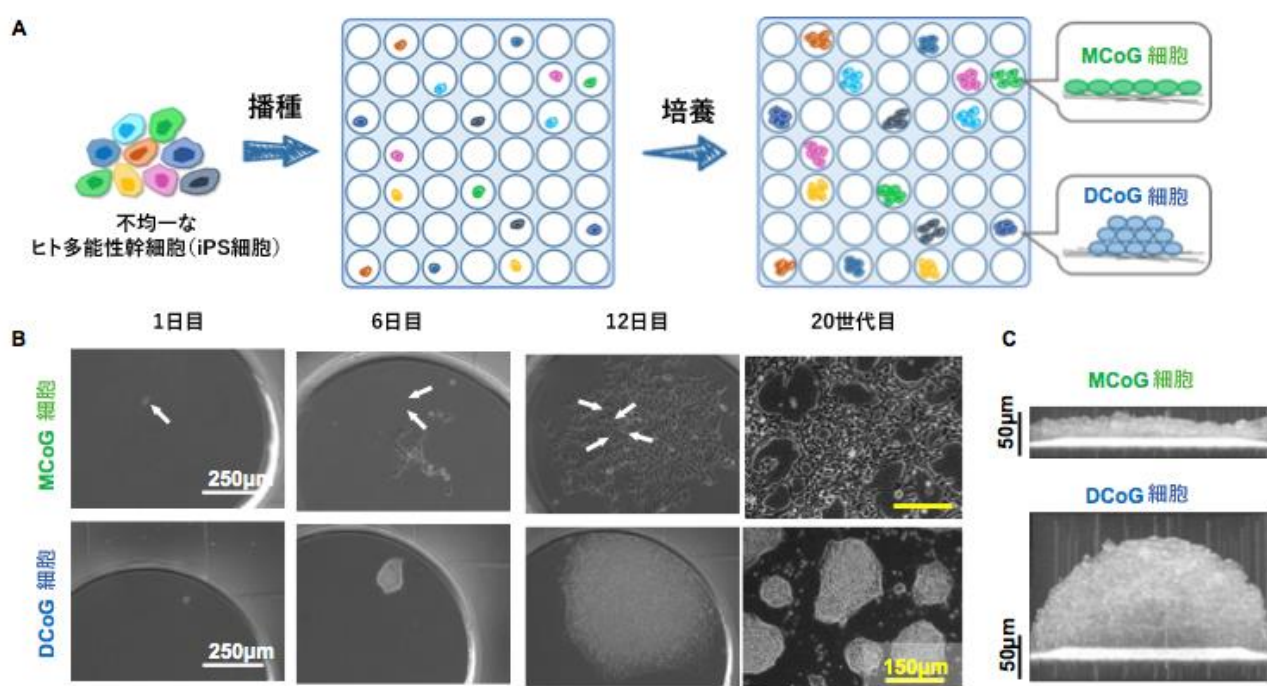


図 1：シングル細胞単離・培養システムの構築に成功

(A) 不均一なヒト多能性幹細胞（iPS 細胞）集団からのシングル細胞単離・培養システムの概念図。(B) シングル細胞に由来する iPS 細胞から 2 種のサブタイプの細胞を単離しました。ゼラチンナノファイバー上での長期培養後も、2 種のサブタイプ細胞の形態と多能性が維持されていることを確認しました。(C) 2 種のサブタイプの細胞コロニーの断面図。

1. 背景

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、生成された初期化コロニー（細胞の集団）を、ラミニンなどの通常の細胞足場上で増殖・培養することにより iPS 細胞を得ています。したがって、得られるコロニーが単クローンである保証はなく、由来の異なる細胞が異なる初期化を受けて得られた不均一な集団として存在する場合があります。このような不均一な iPS 細胞集団では各細胞の分化指向性にバラつきがあり、目的細胞への分化効率が低い、誘導効率が不安定などの問題がありました。これは、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対して深刻な影響を与えます。そこで本研究では、不均一な iPS 細胞コロニーを単細胞に分け、性質を保ったまま培養して適切な単クローンを選別することで、分化指向性が揃った同質な iPS 細胞を得る技術の開発を目指しました。

2. 研究手法・成果

(1) ヒトシングル iPS 細胞を単離・培養するシステムの開発

劉莉特定准教授らの研究グループは、既に、独自で開発したゼラチンナノファイバー（GNF）足場材料の上で、ヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）を長期培養することに成功していました。本研究では、この技術を生かし、マイクロ加工技術で作製したマイクロウェル³を用いて、シングルヒト iPS 細胞を分離・培養する基盤的なシステムの開発に成功しました（図 1）。このシステムを用いて、ヒト iPS 細胞の中に元々混在していた 2 種のサブタイプを単離することができました。また、ゼラチンナノファイバーは細胞培養基材として、多能性が高いヒト iPS のサブタイプ細胞の培養に適していることが判明しました。この単離した 2 種類のサブタイプ細胞について、その形態からそれぞれ MCoG 細胞（Monolayer colony on GNF：単層の構造を保つ細胞）と DCoG 細胞（Dome-like colony on GNF：ドーム状多層の構造を保つ細胞）と名付けました（図 2）。

(2) 2 種のサブタイプ細胞の形態、多能性能、培養基材との接着能に関連するメカニズムの解明

2 種のサブタイプ細胞の個性を解析した結果、形態、多能性能、培養基材との接着能などが明らかに異なりました。そこで、この 2 種のサブタイプ細胞について遺伝子発現を解析したところ、3,000 以上の遺伝子において発現レベルが明らかに異なることが分かりました。また、2 種のサブタイプ細胞の間で発現の異なる遺伝子を分析すると、2 種のサブタイプ細胞の形態の違いは、細胞の接着性に関連する可能性の高いことが示唆されました。さらに、このメカニズムを解析した結果、転写因子 SRF (Serum Response Factor) を介した細胞内情報伝達回路が、2 種のサブタイプ細胞の形態、多能性能、接着性能に強く関与していることが解明されました（図 3）。

(3) 2 種のサブタイプ細胞の分化能の差

2 種のサブタイプ細胞の分化能の差を調べたところ、多能性能が高い DCoG 細胞では、内胚層と関係するマーカー遺伝子の発現が高く、MCoG 細胞では、外・中胚層のマーカー遺伝子の発現が高いことが判明しました（図 4）。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で開発したシングルヒト iPS 細胞を単離・培養するシステムを用いることで、臨床用または創薬用の幹細胞を応用する前に、単細胞レベルでのスクリーニングと各細胞の本来の性質を保持したままでの培養が可能となります。さらに、それぞれの細胞分化指向性の解析、つまり iPS 細胞に対する「適性診断」を行うこと

で高効率な分化誘導を実現できます。今後は、再生医療の現場で、均一で高品質な臨床グレードの初期化細胞を提供することを目指します。さらに、この技術は多能性幹細胞だけではなく、他の臓器に由来する細胞への応用も期待できます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、文部科学省「科学研究費補助金」と文部科学省・科学技術振興機構による支援プログラム「センター・オブ・イノベーション（COI）プログラム」の「活力ある生涯のための Last 5X イノベーション」拠点の支援によって行われました。本拠点は、文部科学省・科学技術振興機構「革新的イノベーション創出プログラム(COI STREAM)」の採択を受け、京都大学を中核機関として 40 社以上の企業が参画した産学連携の開発拠点です。

<用語解説>

1. ゼラチンナノファイバー：ゼラチンを材料として作製された、ナノメートルの繊維状の構造体。
2. クローン：同一の起源を持ち、均一な遺伝情報を持つ核酸、細胞、個体の集団。
3. マイクロウェル：多数の微細なくぼみ（ウェル）が付いた板状の実験・検査器具。各くぼみで細胞を培養するなど、生化学実験や臨床検査などに用いられる。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Low Cell-Matrix Adhesion Reveals Two Subtypes of Human Pluripotent Stem Cells

著者：Leqian Yu, Junjun Li, Jiayin Hong, Yasuhiro Takashima, Nanae Fujimoto, Minako Nakajima, Akihisa Yamamoto, Xiaofeng Dong, Yujiao Dang, Yu Hou, Wei Yang, Itsunari Minami, Keisuke Okita, Motomu Tanaka, Chunxiong Luo, Fuchou Tang, Yong Chen, Chao Tang*, Hidetoshi Kotera* and Li Liu*

* 本研究に関する責任著者

掲載誌：Stem Cell Reports

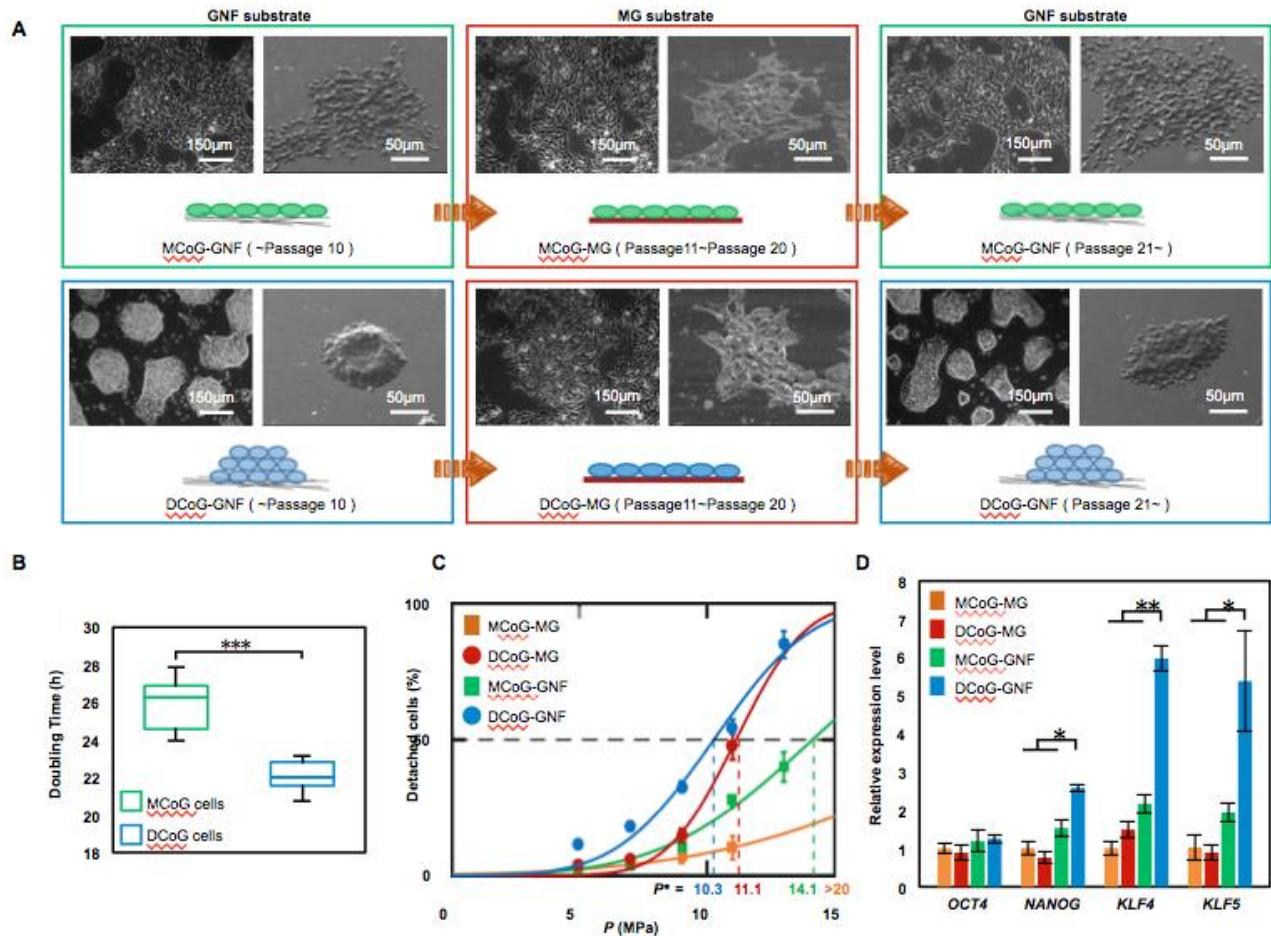


図 2： ヒト iPS 細胞から単離された 2 種のサブタイプ細胞間の個性の違い

(A) DCoG 細胞は培養基材にセンシティブである特性が見られました。接着性の強い基材上では、DCoG 細胞の形態は MCoG 細胞と同様の形態を示しますが、Dome-like の形態はゼラチンナノファイバー上しか現れません。(B) DCoG 細胞は増殖率が MCoG より高い。(C) DCoG 細胞は MCoG 細胞より、培養基材との接着性が低い。(D) ゼラチンナノファイバー上では、MCoG 細胞より DCoG 細胞の多能性が高い。

