

2015年度 生物工学奨励賞（照井賞） 受賞



幹細胞の足場タンパク発現制御に基づく分化誘導プロセスの開発

金 美海



Development of culture process for stem cell differentiation through regulation of Rho family signaling

Mee-Hae Kim (Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871) Seibutsu-kogaku 94: 117-123, 2016.

はじめに

近年、ヒト胚性幹細胞（ES細胞）に加え、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の樹立が報告され、再生医療の移植材や創薬応用の薬剤応答ツールとして産業化に大きく貢献することが期待されている¹⁾。いずれの産業分野においても、細胞増幅培養および組織化培養において、増幅により細胞量を十分に確保し、目的細胞へと分化誘導する工程が重要となる^{2,3)}。そのため、最近では、ニッチと呼ばれる個々の幹細胞に固有な細胞外環境の設計が必要と認識されており、これが、増殖能力、分化能力を左右するもっとも重要な環境因子の一つであることが知られている³⁻⁸⁾。これまでの細胞外環境設計による幹細胞の操作技術は、液性因子添加による外因性シグナル誘発による分化誘導が主体であったが、近年、細胞挙動を介した内因性シグナリング誘発による分化誘導が、新たな手法として注目されている^{7,9-20)}。

筆者は、これまで、細胞挙動特性制御とそれに基づく培養プロセスの開発に取り組んできた。研究内容の概要を図1に示す。細胞・組織などの反応場を提供する空間を対象とし、「ヒト組織の成り立ちを理解し、育む技術を構築・利用する」ことに興味を持ち、生物プロセスの観点から、育む技術を構築・利用することを目指してきた。細胞内での遺伝子発現・タンパク生成現象を解明する研究領域の知識を基に、単細胞（マイクロレベル）、細胞集塊（メソレベル）、組織（マクロレベル）、臓器（メ

ガレベル）と発生レベルの異なる一連の培養工学プラットフォームにおける反応場としての培養フォーマットと解析技術としての解析フォーマットの両者について、時空間的かつ細胞集団な不均一性を考慮した現象解明を目指してきた。一方、オフィスの業務効率を上げるための道具やその職場の環境づくりの取組み事例を参考に、ハードとソフト両面からの「役に立つ道具作り」に取り組んでおり、近年、細胞・組織などの反応場を設計するための「細胞挙動を操作する道具作り」にまで概念の幅を広げ、新しい視点に立った培養手法を考案してきた。このような取組みを通じて、ヒト培養細胞を用いた組織再構築のための培養方法の確立および生産プロセスの開発を進め、特に、多分化能を有するヒト幹細胞の未分化/分化制御技術の構築を提案してきた。これらの研究は、場の設計から細胞挙動特性を制御することにより、未分化/分化制御の初発段階において重要な細胞接着や細胞骨格形成の内因性シグナルを操るものであり、従来の手法とは異なる新規な分化制御手法と考えている。

本稿では、これまでに筆者が実施してきた研究成果の中から、「細胞の挙動を操作する細胞外環境場の設計」における場と細胞挙動の関係について示し、その制御を目的としたデンドリマー培養面の設計について紹介する。さらに、「幹細胞の挙動制御に基づく内因性シグナルの誘発を介した分化方向性の制御」について概説する。最後に、「幹細胞の未分化/分化制御のための培養プロセスの開発」における細胞機能制御を可能とする培養プ

著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（助教） E-mail: mh-kim@bio.eng.osaka-u.ac.jp

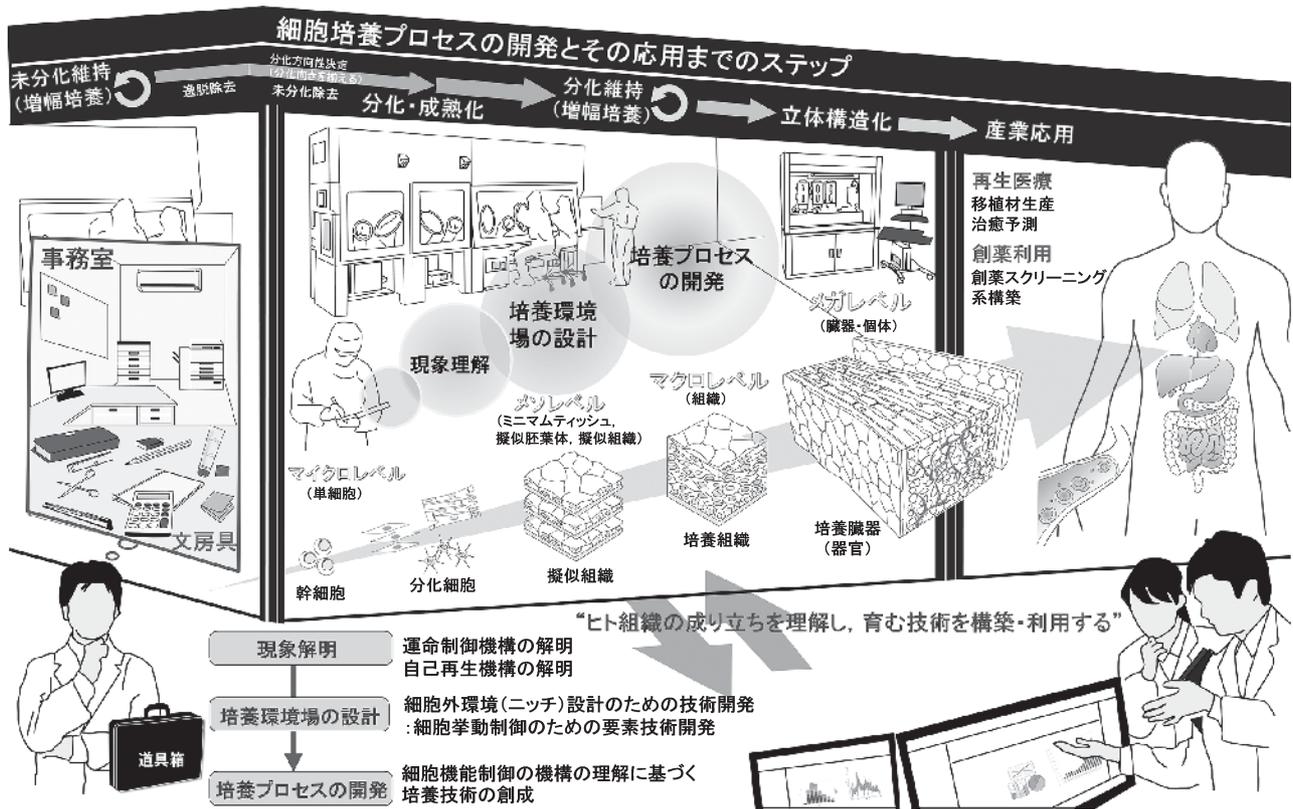


図1. 研究の全体概要図

プロセスへの展開事例について報告する。

細胞の挙動を操作する細胞外環境場の設計

幹細胞をはじめとする種々の細胞は、細胞を取り巻く環境の変化（外乱）によって大きな影響を受ける^{3,4)}。細胞外環境の変化は、内因性シグナル誘発に影響を与え、細胞特性を変化させることが可能である。筆者は、これまで、培養工学的観点から細胞挙動を支配する細胞外環境の設計を目指し、細胞外環境の培養フォーマット構築と細胞機能発現の仕組みについて検討してきた⁹⁻²⁰⁾。細胞は主に三つの挙動（細胞-基質間接着、細胞-細胞間接着、細胞遊走）からなり、それらの相互作用を介して周辺環境を認識していると考えている（図2）。細胞は、培養基材表面に直接接着するのではなく、基質として基材表面に吸着した接着タンパク質との相互作用により基材表面へ接着し、細胞内骨格形成を構築し、シグナル応答することが知られている¹⁶⁾。そのため多くの培養面設計では、アニオン性を示す細胞表層および培地中の接着タンパク質に対し、基材表面はカチオン性とすることが多い。これは、培養容器内への細胞播種後、細胞およびタンパク質の基材表面への静電的吸着を促進し、細胞伸展時における足場形成の迅速な構築、結果として、増殖シグナルの誘発へとつながる。特に、血清中に含まれる

接着タンパク質の一つであるフィブロネクチンの場合、多量体を形成して繊維化することで、安定した接着がなされる²¹⁾。さらに、培養中、細胞自身によって分泌されたフィブロネクチンが線維性細胞外マトリックスとして集積すると、インテグリンの細胞表面における密集が局所的に促進され、接着斑が形成される^{17,22)}。この接着斑を起点として細胞骨格の一つであるアクチンフィラメント（F-アクチン）が細胞内で伸展し、細胞分裂などに関係する細胞内シグナルを促進する。このシグナル伝達過程において、細胞は、細胞外マトリックスの変化に応じて、接着斑に局在化するタンパク質の種類やリン酸化状態を変化させることでその機能を変化させることが知られている。これらのインテグリンを介する細胞の接着での細胞内タンパク質のチロシンリン酸化とそれに続くMAPキナーゼ、PI3キナーゼ、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質の活性化が細胞機能制御に関与していることが明らかにされてきた。

また、培養中の細胞は単独で存在しているわけではなく、お互いに接着し、情報のやり取りをしている^{23,24)}。細胞分化や組織構築には、これらの細胞同士の接触における相互作用が深く関与している。代表的な細胞間接着因子の一つであるカドヘリンは、細胞骨格のアクチンフィラメントに連結し、細胞内シグナル伝達に関与する

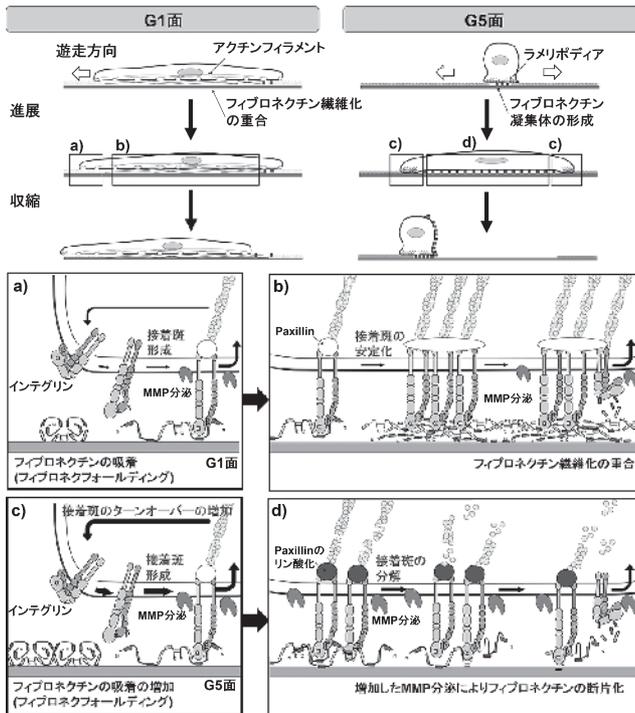


図3. デンドリマー培養面での細胞挙動変化における細胞外マトリックスと細胞間の相互作用

与える影響について着目し、デンドリマー面上での細胞挙動と細胞外マトリックス間について検討した¹⁷⁾。世代数1のデンドリマー面 (G1面) 上でヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養を行ったところ、長く伸びた形態の細胞が多く観察された (図3)。また、世代数の増加とともに、その伸展が阻止され、丸い形態の細胞の頻度が高くなることがわかった。特に、世代数5のデンドリマー面 (G5面) に対し、遊走が活性化され、細胞が丸い形態から一端伸展し紡錘形となった後、急激に丸い形態に戻るダイナミックな形態変化が見られた。さらに、ポリスチレン面 (PS面) とG1面上で培養を行った場合には、繊維状に重合したフィブロネクチンが見られるのに対し、G5面上では、重合したフィブロネクチン繊維が、分解され断片化していることが確認された。その際、フィブロネクチンの重合・集積を抑制する膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の発現が高いことがわかった。また、G5面上での細胞は、細胞接着斑の構成タンパクである paxillin のチロシンリン酸化が亢進されていることが確認され、細胞接着斑の更新が促進されることにより、細胞遊走が活性化されたことが示唆された。これらの結果から、培養面を変化させることで、MMP活性が変化し、フィブロネクチンの状態が変化し、細胞接着と遊走に変化をもたらすことが示唆された。これらのG1面上で培養した細胞はすべて筋系細胞に特異的な desmin 陽性を示し、部分的ではあるが平滑筋細胞

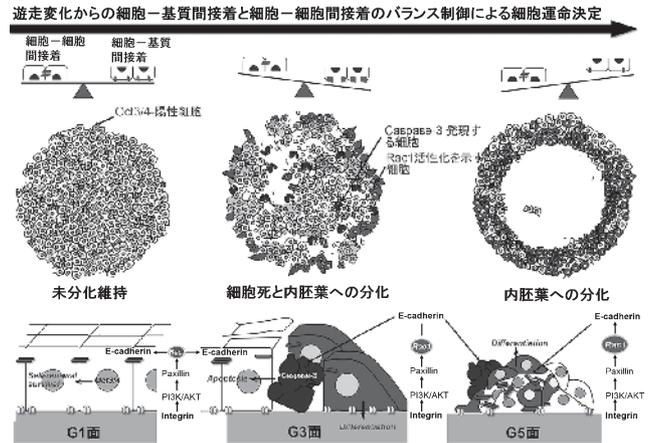


図4. 細胞遊走変化からの細胞-基質間と細胞-細胞間接着のバランス制御による細胞運命決定

に特異的な α -smooth muscle actin が陽性であることが確認できた。さらに、G5面上で形成された細胞集塊では、心筋特異的の marker である cardiac troponin T (cTnT) 陽性の細胞が存在していることが確認され、本培養面が間葉系幹細胞から筋系細胞への分化に有効な内因性シグナリングを誘発できる培養面であることが示された。

さらに、本培養面をヒト iPS 細胞培養に適用したところ、G1面においては、細胞同士の接着を維持しながら徐々に増殖している様子が多く見られ、同心円状に広がるコロニーを形成できる最適な条件と考えられた (図4)¹²⁾。しかし、世代数の増加によってコロニー内の細胞遊走性が促進され、細胞間結合力が培養面上での細胞接着力を上回ることでコロニーの周辺部に細胞同士が集合・凝集化していくことが確認された。各培養面上で形成されたコロニーの未分化/分化状態を検討したところ、G1面上では Oct3/4, Nanog, SSEA4, Tra1-60 のなどの未分化マーカーの発現が維持されているのに対し、G5面上で形成されたコロニーでは内胚葉の分化マーカーである GATA4 が発現していることが確認できた。ヒト iPS 細胞の未分化状態の維持は細胞-基質間と細胞-細胞間接着のバランスの維持が重要であり、遊走によってこのバランスが変化することで内胚葉への分化に向かった変化が始まることがわかった。以上の結果より、三つの挙動のバランスとその未分化/分化制御の機序を理解・利用して、細胞運命を制御するための新規なアプローチを提案できると考えられた。

幹細胞の未分化/分化の制御のための 培養プロセスの開発

近年の再生医学研究の発展に伴って、筆者は、発生生物学の知識と培養工学のセンスの融合を目指し、研究を

展開してきた。幹細胞からの多様な細胞が分化誘導される過程は、図5に示すように、「ワディントン地形」(Waddington's landscape)と呼ばれる概念図で表現されることが多い²⁵⁾。この図においては、幹細胞を「球」、細胞外環境を「地形(分化誘導を引き起こす場)」とし、下流に行くほど溝の数が増える坂道を球が転がる様子で、細胞の分化誘導が表現されることが多い。山の頂上に存在する幹細胞は、窪みの中でその未分化性を安定的に維持するが、ある一定以上のエネルギー(刺激)を受けると、丘を乗り越え、山を転がり下るかごとく、自発的に種々の分化細胞へ誘導される。また、分化の方向性は、分岐点においては小さなエネルギーで制御できるものの、一度高低差の大きな溝に入るとその分化方向性の転換には大きなエネルギーを必要とする。よって、目的とする分化誘導を達成するには、分岐点における分化制御が望ましい。これまでの多くの分化誘導法では、分化誘導因子を培地中に添加し、長期間の細胞培養にて、目的の分化細胞を得てきたが、その分化効率が低く、再現性に乏しいため、均質な分化細胞群を安定して得ることが難しいことなどが課題であった。その主な原因は、細胞不均質性や培養環境内において位置的不均一性が存在し、さらに多方向かつ段階的に進行する分化誘導過程が、局所の細胞間コミュニケーション、分裂、遊走などの種々の細胞挙動を伴っているからと考えられる。これらの課題の克服には、一連の生物学的現象を生物学的、環境的にヘテロな集団と捉え、培養工学的アプローチにて、培養フォーマットと解析フォーマット両者の技術を構築しつつ、分化方向性が定まる起点(図5における分岐点)にて、エネルギーを与え、誘導を進行させる方法論の確立が不可欠と考えられる。

筆者は方法論の一つとして、細胞の挙動を操作するための場の設計とそれに基づく新たな培養手法を提案してきた^{26,27)}。間葉系幹細胞やiPS細胞に対しては、分化誘導の初発段階において、細胞-基質間接着の程度を変化

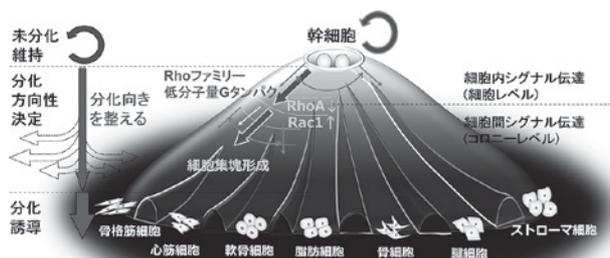


図5. 生命の発生現象を表す「ワディントン地形」に基づいた細胞運命制御

させる足場設計により、細胞骨格形成の内因性シグナルを制御し、目的とする未分化/分化状態への方向性を揃え、さらに、分化方向性の揃った細胞群に対し、液性の増殖因子や分化誘導因子を添加することで、安定した未分化/分化細胞の形成を目指している。本手法は、個々の細胞に対し、細胞-基質間接着と細胞-細胞間接着を考慮しつつ、未分化/分化制御の機序を理解・利用して、未分化/分化制御システムを実現するものと考えられる。以下では、代表的な幹細胞の未分化/分化制御手法の開発について紹介する。

iPS細胞・ES細胞培養における未分化維持 ヒトiPS細胞の未分化を維持しつつ細胞数を増幅することを目指した増幅培養において、SNLフィーダー細胞を用いた培養では、コロニー中心部に「未分化状態から逸脱」する現象が多くみられる²⁸⁾。この逸脱現象は、コロニー内の細胞遊走、細胞-基質間接着、細胞-細胞間接着の三つのバランスの崩壊により発生する^{12,29)}。そこで、細胞の遊走と細胞接着機構の相互作用に着目し、iPS細胞の未分化維持のためのデンドリマー培養面の設計へ応用した^{12,13)}。G1面がiPS細胞の未分化維持に及ぼす影響を検討したところ、細胞遊走およびコロニー形態を制御することが可能になり、足場タンパクであるRac1の細胞内局在化を制御することで細胞間接着と細胞-基質間接着のバランスを変化させ、内因性シグナルを誘発、未分化状態を自発的に維持可能であることが確認された。さらに、長期間継代後もOct3/4, Nanog, SSEA4, Tra1-60の未分化マーカーが高発現し、広く用いられているゼラチン培養面と同等の未分化能を維持できることがわかった。さらに、世代数4のデンドリマー面(G4面)にマウスES細胞を培養したところ、細胞内骨格であるストレスファイバーの形成が阻止され、形成されたES細胞のコロニーすべてがアルカリ性ホスファターゼ活性陽性でRex1, Oct3/4, Nanogの遺伝子の発現維持も確認されたことから、未分化状態が維持できることが示された¹⁰⁾。以上、デンドリマー培養面により細胞遊走およびコロニー形態を制御することが可能になり、iPS細胞やES細胞の長期間の未分化維持基材として有効であることを示した。

間葉系幹細胞培養における分化方向性の制御 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養においては、デンドリマーの世代数を変化させた培養面上で細胞骨格形成変化を通じた細胞内シグナル伝達が生じ、細胞形態や形状が細胞未分化/分化状態と密接に関係していることを明らかにした¹⁴⁻¹⁷⁾。PS面上で培養を行った場合には、未分化状態を維持したままであるが、デンドリマー面においては、世代数の増加とともに、丸い形態を示す細胞の頻度が高

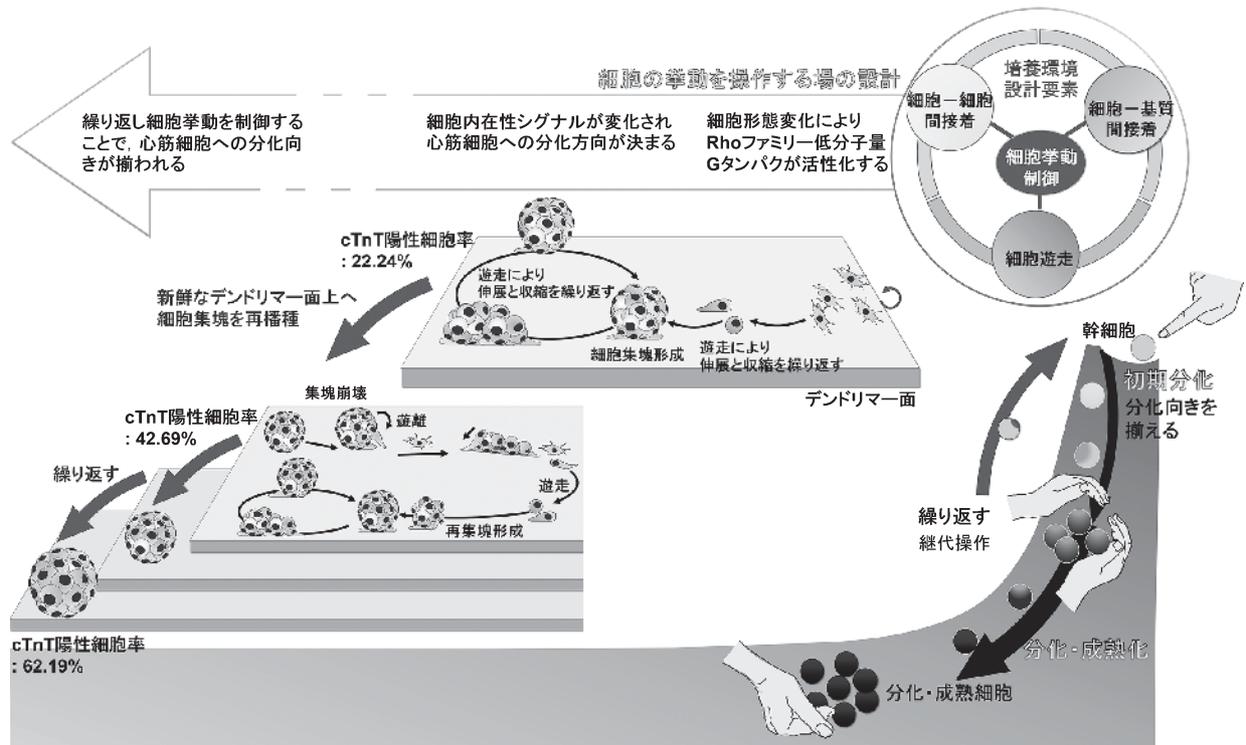


図6. デンドリマー面を用いた細胞挙動制御による心筋分化方向性の制御

くなり、特に、細胞骨格形成においては、G5面にて、ストレスファイバーの形成が阻害されることが確認された(図6)。また、足場形成タンパク質の蛍光染色法やタンパク質発現解析から、PS面に比べ、G1面で、Rac1の活性化が確認された。さらに、G1面での細胞に比べ、G5面では、細胞全体においてRhoA発現が低下したが、細胞の進行方向ではRac1が活性化し、培養面上を遊走しながら、伸張と収縮を繰り返す、その後細胞集塊を形成することを見いだした。さらに、その細胞は、cTnTに対し陽性細胞となり、心筋細胞への分化に関与する内在性シグナリングを誘発していることが示唆された。また、得られた細胞集塊を、再度、新鮮なデンドリマー培養面上へ播種すると、細胞集塊が培養面へ伸展し、細胞が集塊から遊離、遊走、再集塊形成を経て、cTnT陽性細胞率が上昇することを見いだした。

以上、細胞形態ならびに遊走挙動を積極的に制御することは、細胞接着にかかわるインテグリンやカドヘリンのシグナル変化を導くことで、細胞の増殖促進/分化制御を実現できると考えられ、初期運命決定過程での細胞挙動に依存した現象に関する新たな知見は、細胞の未分化/分化制御のための細胞外環境設計の創出やその方法論を提供するものと期待している。

おわりに

筆者は、細胞の運命を決定する「挙動」の機構を解明し、その制御を目的とした細胞外環境場の設計に取り込んできた。細胞の挙動を制御が可能なデンドリマー面を設計することで細胞骨格を変化させ、内因的なシグナルを誘発し、これを制御することにより単一な分化方向性の誘導を実現することができた。本培養面による内在的かつ自発的な分化誘導は増殖を伴っており、「育みながら分化誘導し、分化の方向性を整える」新たな手法であると考えられる。これらの研究により、幹細胞の未分化/分化制御などの「しくみ」を解明し、さらにその仕組みを利用した培養プロセスの開発の展開が可能になる。さらに、分化方向性が整えられた細胞群に対し、従来の液性因子による分化誘導を併用することで、均質で分化効率の高い細胞群を得る培養技術になると期待される。

謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物プロセスシステム工学領域および大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域にて遂行されました。多大なご指導、ご鞭撻を賜りました紀ノ岡正博先生(大阪大学大学院工学研究科教授)、田谷正仁先生(大阪大学大学院基礎工学研究科教授)に心より深く感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、細胞-基質間の構築にご助言いただきました川瀬雅也(長浜

バイオ大学教授), 八木清仁 (大阪大学大学院薬学研究科教授)をはじめ, とともに研究を行った大阪大学における所属研究グループのスタッフ・学生の皆様に心より感謝申し上げます。最後に, 私を研究の道へと導いてくださった尹世億先生 (全北大学名誉教授) に心より感謝を深く感謝申し上げます。

本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費, 科学技術振興機構 (JST), 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) からの助成を受けて行われました。

文 献

- 1) Takahashi, K. and Yamadaka, S.: *Cell*, **126**, 663–676 (2006).
- 2) Osakada, F., Ikeda, H., Sasai, Y., and Takahashi, M.: *Nat. Protoc.*, **4**, 811–824 (2009).
- 3) Metallo, C. M., Mohr, J. C., Detzel, C. J., de Pablo, J. J., Van Wie, B. J., and Palecek, S. P.: *Biotechnol. Prog.*, **23**, 18–23 (2007).
- 4) Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G.: *Cell*, **116**, 769–778 (2003).
- 5) Hubbell, J. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 551–558 (2003).
- 6) Watt, F. M. and Hogan, B. L.: *Science*, **287**, 1427–1430 (2000).
- 7) McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., and Chen, C. S.: *Dev. Cell*, **6**, 483–495 (2004).
- 8) Huang, S. and Ingber, D. E.: *Exp. Cell Res.*, **261**, 91–103 (2000).
- 9) Kim, M.-H., Kino-oka, M., and Taya, M.: *Biotechnol. Adv.*, **28**, 7–16 (2010).
- 10) Mashayekhan, S., Kim, M.-H., Miyazaki, S., Tashiro, F., Kino-oka, M., Taya, M., and Miyazaki, J.: *Biomaterials*, **29**, 4236–4243 (2008).
- 11) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Morinaga, Y., Sawada, Y., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 196–205 (2009).
- 12) Kim, M.-H. and Kino-oka, M.: *Biomaterials*, **35**, 5670–5678 (2014).
- 13) Kim, M.-H. and Kino-oka, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 716–722 (2014).
- 14) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 55–61 (2010).
- 15) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Maruyama, N., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: *Biomaterials*, **31**, 7666–7677 (2010).
- 16) Kim, M.-H., Ogawa, Y., Yamada, K., Taya, M., and Kino-oka, M.: *Biochem. Eng. J.*, **84**, 53–58 (2014).
- 17) Ogawa, Y., Kim, M.-H., and Kino-oka, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, (in press).
- 18) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 192–199 (2007).
- 19) Kim, M.-H., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 319–326 (2008).
- 20) Kino-oka, M., Morinaga, Y., Kim, M.-H., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *Biomaterials*, **28**, 1680–1688 (2007).
- 21) Baneyx, G., Baugh, L., and Vogel, V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5139–5143 (2002).
- 22) Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 56–68 (2005).
- 23) Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M., and Nakagawa, M.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 591–596 (1999).
- 24) Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R. R., Ueno, Y., Zheng, Y. W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., and Taniguchi, H.: *Nature*, **499**, 481–484 (2013).
- 25) Enver, T., Pera, M., Peterson, C., and Andrews, P. W.: *Cell Stem Cell*, **8**, 387–397 (2009).
- 26) 金 美海, 紀ノ岡正博: 医学のあゆみ, **233**, 1176–1180 (2011).
- 27) 金 美海, 紀ノ岡正博: 日本医学館, バイオマテリアル-生体材料, **31**, 154–157 (2013).
- 28) 古江-楠田美保: *Tiss. Cult. Res. Commun.*, **27**, 139–147 (2008).
- 29) Kim, M.-H., Masuda, E., and Kino-oka, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 1128–1138 (2014).