

THE CHEMICAL TIMES

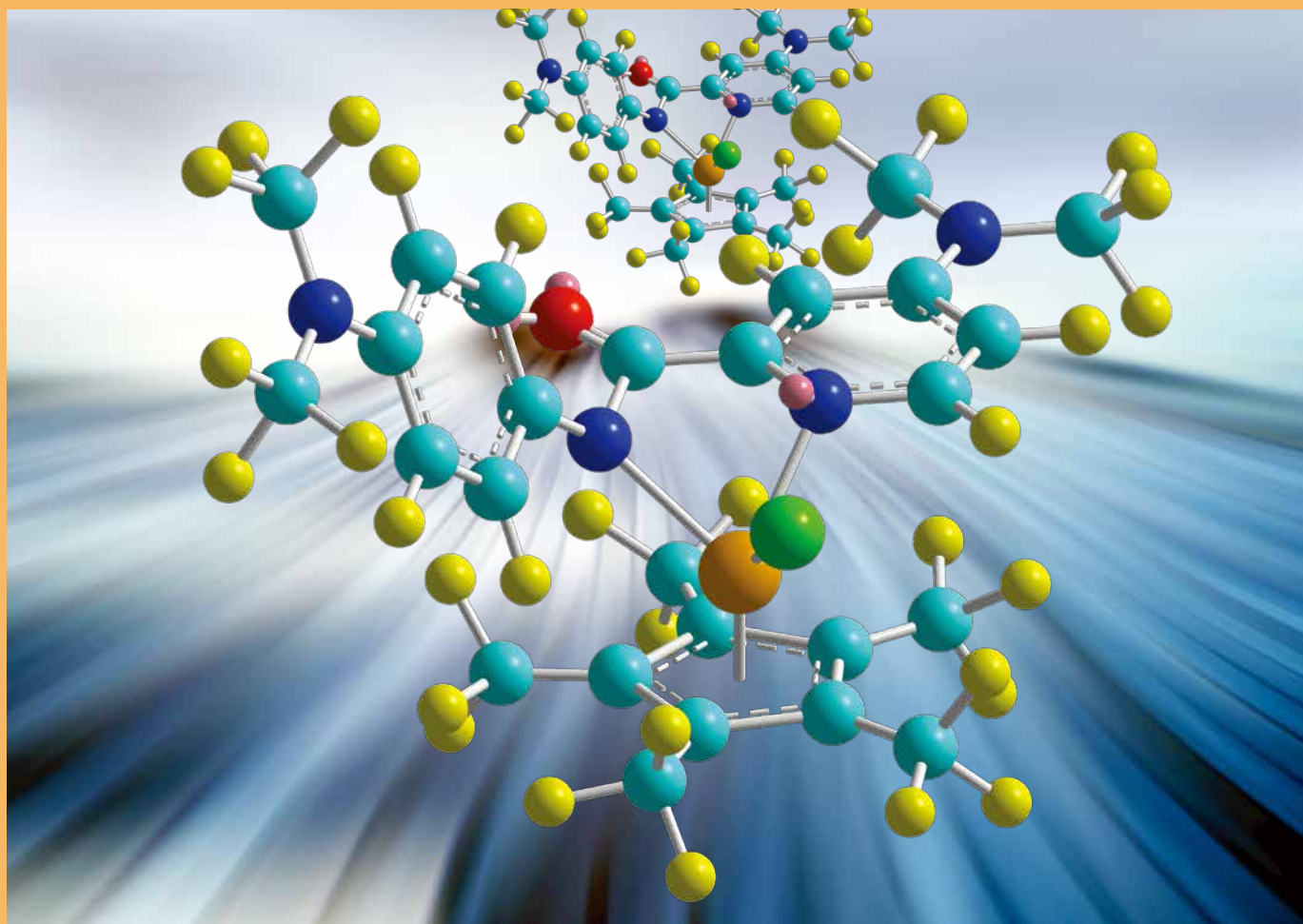
2016 No.3 (通巻241号)

ISSN 0285-2446

特集

再生医療

- 昆虫に学ぶ器官再生 ————— 板東 哲哉 濱田 良真 奥村 美紗 02
坂東 優希 大内 淑代
- 応用利用に向けた低分子化合物によるヒトiPS細胞の培養 ————— 池田 達彦 07
長谷川 光一
- ヒトiPS細胞の分化誘導プロセスにおける細胞の構造構築段階の重要性 ————— 大貫 喜嗣 12
黒澤 尋
- 細胞シート工学研究の基礎と医療への発展 ————— 関谷 佐智子 17
清水 達也
- トピックス ad-MEDビトリゲル®とその創薬, 化学物質安全性試験への応用 ——— 山口 宏之 22



昆虫に学ぶ器官再生

Molecular basis of insect leg regeneration.

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 助教 **板東 哲哉**

Tetsuya Bando (Assistant Professor)

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 博士研究員 **濱田 良真**

Yoshimasa Hamada (Postdoctoral fellow)

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

岡山大学 医学部医学科 医学科学生 **奥村 美紗**

Misa Okumura (Undergraduate student)

Faculty of Medicine, Okayama University Medical School

岡山大学 医学部医学科 医学科学生 **坂東 優希**

Yuki Bando (Undergraduate student)

Faculty of Medicine, Okayama University Medical School

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 教授 **大内 淑代**

Hideyo Ohuchi (Professor)

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



キーワード

再生芽、位置情報、エピジェネティック制御

01 | はじめに

ヒトは事故や怪我などで手足を失うと再生することはできず、義肢に頼る生活を余儀なくされる。ES細胞やiPS細胞などの幹細胞から特定の細胞を作り出して機能を補う再生医療の基礎研究と臨床応用は日進月歩で進んでいるが、現在の再生医療技術では複数種の細胞が立体的な構造を形成する手足のような器官を再生させることは未だ実現できておらず、失った体の組織や器官を再生することは人類の夢となっている。ヒトに限らずマウスやニワトリなど哺乳類や鳥類の再生能は低く、既存の実験モデル動物を用いた器官再生の基礎研究には困難が伴う。

しかしながら実験室の外に目を向けると、器官再生能の高い生物が多数存在することに気づく。トカゲは、敵に襲われると尻尾を自切し、その後に元通りに再生することができる。両生類の再生能が非常に高いことはよく知られており、イモリやサンショウウオは手足や尻尾、脳や心臓の一部すら再生できる。扁形動物のプラナリアに至っては、小さく切られた断片から体全体を再生することが可能である¹⁾。昆虫類では、蛹期を経ずに成虫へと成長する不完全変態昆虫類の幼虫が非常に高い再生能を有している。ゴキブリを用いた器官再生の形態学的解析が1970年代に精力的に行われていたが、分子生物学的な解析が行われないままに研究が途絶えてしまっていた²⁾。我々は、亜熱帯に

生息するフタホシコオロギを再生モデル昆虫とし、脚再生過程に働く分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

02 | コオロギの脚再生過程

フタホシコオロギ(以下、コオロギ)はペットショップから安価で購入できる(図1A)。卵から孵化した幼虫は8回の脱皮を経て約1ヶ月で成虫となる^{3),4)}。脚再生の実験には、体長約5mmの3齢幼虫を使用する⁵⁾。コオロギのゲノムサイズは約1.7Gb、遺伝

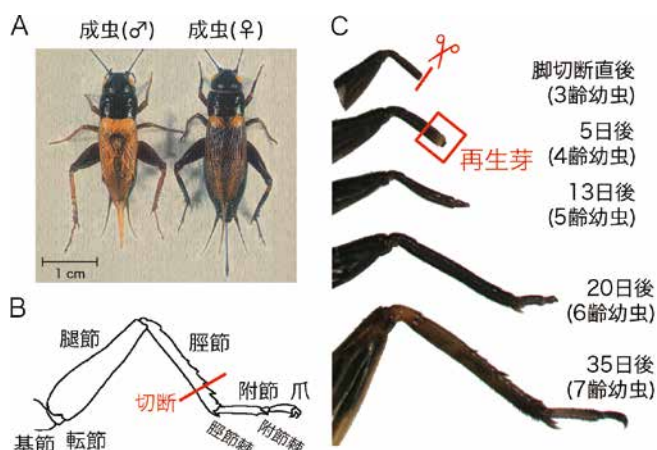


図1 再生モデル昆虫コオロギの脚再生過程

子数は約20,000と推定されている。幼虫および成虫のさまざまな組織に対して*in situ* hybridization法を用いた遺伝子の発現解析が可能であり、またRNA干渉法(RNAi)による遺伝子機能阻害、piggy/Bacトランスポゾンを用いた遺伝子導入、人工酵素ZFN、TALEN、CRISPR/Casによるゲノム編集などを応用することで、器官再生を遺伝子レベルで解析することができる^{6), 7)}。

コオロギの脚は、体幹部に近い側から基節、転節、腿節、脛節、附節、爪に分かれている。後脚の脛節は背側に数対の棘が、遠位端に6本の脛節棘が形成される。附節はさらに3つの脚節に分かれており、附節第1節には附節棘が形成される(図1B)。コオロギの脚を脛節の中ほどで切断すると、以下の4つのステップを経て失われた部分が再生される。(1)創傷治癒:切断面が瘡蓋で覆われた後、傷上皮が傷口を塞ぐ。(2)再生芽形成:脚の遠位端において、再生芽が形成される。再生芽細胞は分化細胞が脱分化した細胞で、幹細胞と同様に高い増殖能と多分化能を持つ細胞であり、再生する組織の元となる。(3)位置情報の認識:既存の組織の位置情報と遠位端に形成された再生芽の位置情報を元に、失われた部分が認識される。(4)再パターン形成:再生芽においてパターン形成遺伝子が再発現し、失われた部分のみが再生芽細胞から分化して再構築される^{8), 9)}。これらのステップを経て、約2週間で元通りの形態と機能を有する脚が再生する(図1C, 図2)。以下にコオロギ脚再生の各ステップの分子メカニズムを概説する。

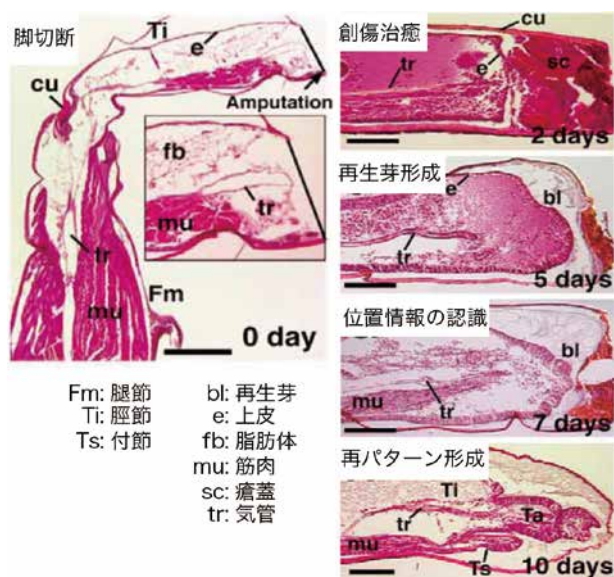


図2 脚再生過程の組織学的解析(文献 8)を一部改編)

2.1. 創傷治癒

ヒトと同様に昆虫も体が傷つくと瘡蓋が形成されるが、昆虫は脊椎動物とは異なり開放血管系であるため血球成分は異なっている。ショウジョウバエを用いた研究から、瘡蓋の形成にはプロフェノールオキシダーゼカスケードによる血漿成分の凝固が必要であることが分かっている。傷を受けた上皮細胞ではJNKやERKが活性化し、転写因子Grainy headの働きにより上皮細胞が移動して傷口を閉鎖することも明らかにされている¹⁰⁾。コオロギの創傷治癒についてはまだほとんど分かっていないが、同様の分子メカニズムで瘡蓋や傷上皮の形成が起これと考えている。

2.2. 再生芽形成

器官再生において最も重要なステップが再生芽の形成である。再生芽は、傷上皮の直下、既存の組織の遠位端に形成される組織で、幹細胞と同様の高い増殖能と多分化能を有する再生芽細胞の塊である。再生芽には気管や筋肉が無く細胞の密度が高いため、既存の組織との判別は容易である。分化した細胞がIPS細胞のように脱分化を起こして再生芽細胞になると考えられており、速やかに細胞増殖を繰り返して再生芽を形成したのち、適切な時期に細胞増殖を停止し様々な細胞へと分化することで、失った組織を再生させる。

再生芽形成にはたらく分子メカニズムを明らかにするため、切断後24時間のコオロギの脚ならびに未切断の脚からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて比較トランスクリプトーム解析を行った。再生脚では、免疫や幹細胞の増殖に関わるJak/STATシグナル因子や、腫瘍形成の抑制にはたらくHippoシグナル因子の発現上昇が見られた。再生芽形成におけるこれらシグナル経路の役割を明らかにするため、RNAiを用いてシグナル因子の機能低下実験を行った。Jak/STATシグナルを構成するインターロイキン受容体Domeless (Dome)、ヤヌスキナーゼHopscotch (Hop)、転写因子Statに対してRNAiを行うと、*hop*^{RNAi}個体では附節が小さく再生したが、*dome*^{RNAi}個体と*Stat*^{RNAi}個体では再生が全く起こらなかった(図3A)。*Stat*^{RNAi}個体では、細胞分裂の進行に必須なサイクリンEの発現が半減していたことから、再生芽細胞の細胞増殖が低下して再生が阻害されたと考えられる(図3B)。またJak/STATシグナルの活性を抑制するSocs2やSocs5に対してRNAiを行うと、再生脚におけるサイクリンEの発現は上昇し、再生脚は正常脚よりも長くなった(図3A, B)。これらの結果からJak/STATシグナルは再生芽の細胞増殖を活性化する、再生に必須のシグナル経路といえる¹¹⁾。また、Hippoシグナルを構成するセリンスレオニンキナーゼWarts (Wts)や、Hippoシグナルの上流ではたらくプロトカドヘリンFatやDachsous (Ds)に対してRNAiを行うと再生芽領

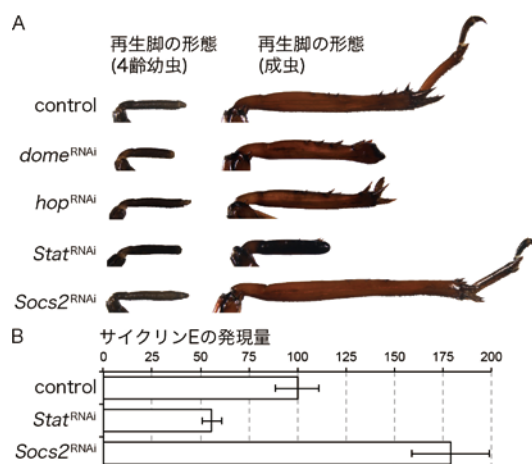


図3 Jak/STATシグナルによる再生芽形成の制御(文献 11)を一部改編)

域が肥大し(図4A)、再生芽での細胞分裂が増加した(図4B)。FatやDsとHippoシグナルを中継する非典型ミオシンDachs (D)や、Hippoシグナルにより抑制的に制御される転写コアクチベーターYorkie (Yki)に対してRNAiを行うことで、*fat*^{RNAi}、*ds*^{RNAi}や*wts*^{RNAi}による再生芽の肥大は抑えられた(図4A)。これらの結果から、Hippoシグナルは再生芽細胞の増殖を抑制するために必要であることが分かった¹²⁾。

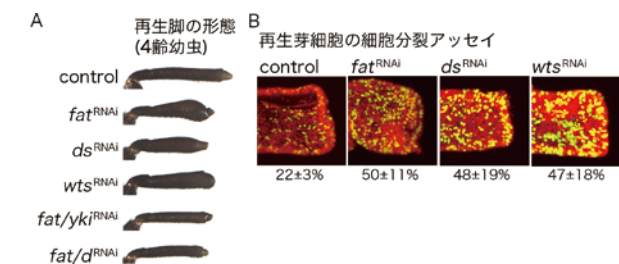


図4 Hippoシグナルによる再生芽形成の制御(文献 12)を一部改編

既存の組織の分化した細胞が脱分化する過程を制御する分子メカニズムは未だ不明な点が多い。分化した細胞では、特定の細胞系譜で発現する遺伝子の発現はオンに、不必要な遺伝子の発現はオフに制御されており、遺伝子発現のオンオフはエピジェネティックな機構により制御されると考えられている。実際、ヒトiPS細胞においても、ヒストンH3のメチル化状態がiPS細胞への脱分化の効率に影響することが分かっている。前述のコオロギ再生脚の比較トランスクリプトーム解析においてもヒストンの修飾酵素の発現が変化していることから、再生芽細胞への脱分化にエピジェネティックな機構が働いているのは確からしいが、詳細な分子メカニズムは未解明である。また近年、カエルの尾部再生やアホロートルの四肢再生において、切断に伴って傷害部位に遊走してくるマクロファージが再生に重要な働きをすることが報告された。コオロギの脚再生においてもマクロファージによる炎症と脚再生の関係が明らかになりつつある(板東、未発表)。

2.3. 位置情報の認識

切断された脚の遠位端に再生芽が形成される。再生芽の細胞は、既存の組織の位置情報を認識し、組織の失われた部分のみを再生させる。生物における位置情報とは、組織などの細胞集団の中でそれぞれの細胞が持つ空間的な場所の情報を指す概念である。発生過程においては前後、背腹、左右の3軸に沿って形成されるモルフォゲンの濃度勾配やホメオボックス遺伝子の発現などにより規定されると考えられている。器官再生においては、1970年代にFrenchらによるゴキブリの脚の移植実験から遠近軸方向と円周方向の位置情報の概念が提唱された²⁾。Bryantらは、イモリの四肢再生においても同様の位置情報の概念が適用できることを見出したが、位置情報の分子実体は未解明のままである。

コオロギを用いてFrenchらと同様の4種類の移植実験を行った。(1)脛節を近位で切断したホストに、脛節を遠位で切断したグラフトを移植すると、脛節の中位部分が欠失した脚になる。欠失した中位部分は数回の脱皮の後に挿入再生された(図5, 挿入再生)。(2)脛節を遠位で切断したホストに、脛節を近位で切断したグラフトを移植すると、中位部分が重複した長い脚になる。移植したコオロギを飼育すると、重複する中位部分がホストとグラフトの間にさらに逆向きに挿入再生され、より長い脚になった(図5, 逆挿入再生)。(3)腿節を中位で切断したホストに、脛節を中位で切断したグラフトを移植すると、腿節に脛節が直接繋がった脚になる。移植したコオロギを飼育し続けても、腿節や脛節の長さには変化はなく関節が再生されることはなかった。(4)右脛節を中位で切断したホストに、左脛節を中位で切断したグラフトを背腹軸の方向を揃えて移植すると、右脚に左脚が繋がった脚になる。移植したコオロギを飼育すると、グラフト

の移植部位から、前側と後側に過剰な脚が形成された(過剰肢形成)。これらの移植実験の結果から、コオロギの脚にも遠近軸方向や円周方向に沿った位置情報があること、移植により位置情報の不連続が発生した場合は連続性を回復するよう最短で位置情報を挿入するように挿入再生が起こること、各脚節の位置情報は等価であること、が示唆された^{8), 13)}。



図5 遠近軸方向の位置情報と挿入再生

器官再生において位置情報を担う分子は、遠近軸方向または円周方向に濃度勾配を形成し、各脚節に繰り返して同じパターンで発現する、と期待される。位置情報を担う分子の候補として、我々はHippoシグナルの上流ではたらくプロトカドヘリンFatとDsおよび非典型ミオシンDに着目した。胚の肢芽と再生脚においてfatは近位から中位にかけて、dsとdは遠位から濃度勾配を形成し、各脚節で繰り返して同じパターンで発現した。そこでRNAiを用いてこれら遺伝子の発現を低下させたコオロギで移植実験を行うと、挿入再生や逆挿入再生が起こらなかった(図6A)。挿入再生や逆挿入再生は位置情報の不連続が生じたときに起こることから、RNAiによりfat, ds, dの発現が低下したコオロギでは位置情報が保持されていないと考えられた。位置情報が保持されていない脚を切断した場合、どの位置で切断されたか、どの部分を再生するべきかが認識されないため、

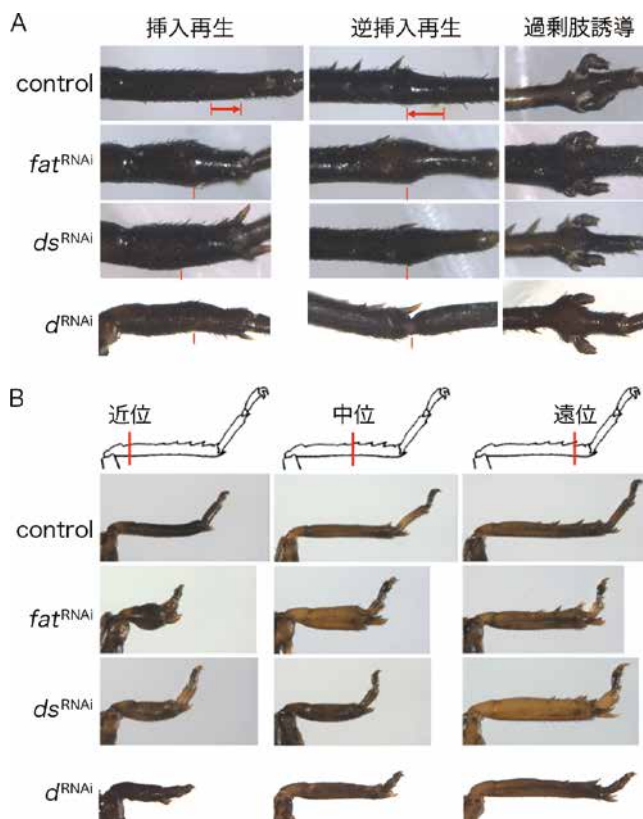


図6 Fatを介した位置情報の認識(文献 12)を一部改編

器官再生が正常に起こらずに切断位置に対応した短い再生脚になると推測される。そこでRNAiにより*fat*, *ds*, *d*の発現を低下させたコオロギの脚の脛節を近位、中位、遠位で別々に切断して再生脚の長さを比較した(図6B)。*fat*などの機能を低下させたコオロギの再生脚の長さをコントロール個体の再生脚の長さと比較すると、予想した通りに、遠位で切断した脚はやや短く、近位で切断した脚はより短く再生した。我々は*Fat*, *Ds*, *D*が位置情報を担う分子の候補と考えており^{12), 14)}、コオロギ以外の再生可能動物での検証が待たれる。興味深いことに、*Fat*と*Ds*の細胞内ドメインに結合する2本鎖RNA結合タンパク質*Lowfat* (*Lft*)は、遠近軸方向の器官再生の際には位置情報の認識に必要であるが、挿入再生や逆挿入再生の際には必要でないことが分かっており¹⁵⁾、コオロギが再生過程に応じて異なる位置情報の分子メカニズムを利用している可能性が示唆されている。

Hippoシグナルの上流ではたらくアクチン結合タンパク質*Expanded* (*Ex*)と*Merlin* (*Mer*)は、Hippoシグナルを活性化させることで細胞増殖を抑制する。RNAiにより*ex*や*Mer*の発現を低下させたコオロギでは、再生芽と既存の組織において細胞分裂が亢進し、再生脚はもとの脚よりも長く再生した。また*ex*^{RNAi}や*Mer*^{RNAi}個体の脚を用いて移植実験を行うと、逆挿入再生のパターンが異常になり、過剰肢の形成が起こらなかった。野生型個体で見られる逆挿入再生ではより遠位の位置情報を有するグラフトからのみ逆挿入再生を起こすが、*ex*^{RNAi}や*Mer*^{RNAi}ではホストとグラフトの両側で細胞増殖が過剰になり両側から挿入再生を起こしていた¹²⁾。脊椎動物の*Ex*や*Mer*のホモログは接触阻害(contact-dependent inhibition of cell proliferation)の制御に必要であることが知られている。コオロギの再生脚で逆挿入再生が起こる際の細胞増殖の方向性は、*Ex*や*Mer*を介した接触阻害のメカニズムにより制御されているのかもしれない。*ex*^{RNAi}や*Mer*^{RNAi}により過剰肢形成が抑制されるメカニズムは未解明である。*ex*^{RNAi}や*Mer*^{RNAi}個体の再生脚では細胞分裂が亢進していたため、細胞増殖能の低下による過剰肢の形成不全とは考えにくい。*Ex*や*Mer*が円周方向の位置情報を担う分子メカニズムと関連している可能性を検討している。

2.4. 再パターン形成

脚の先端に形成された再生芽の細胞は、脚の位置情報を認識し、失われた部分のみを再生させるため様々な細胞へと再分化して器官を再形成する。再パターン形成は発生過程の繰り返しと考えられており、発生過程にはたらく遺伝子の発現が再活性化されて器官を再形成すると考えられる。コオロギ肢芽発生の初期にはWntシグナル、TGF- β シグナル、Shhシグナルのリガンドである*wingless* (*wg*), *decapentaplegic* (*dpp*), *hedgehog* (*hh*)がそれぞれ肢芽の腹側、背側、後側で発現する。再生過程においても再生芽で*wg*, *dpp*, *hh*が肢芽と同様のパターンで発現し^{8), 9)}、*wg*と*dpp*の発現が接する再生芽の遠位端から*Epidermal growth factor receptor* (*Egfr*)の発現が誘導される¹⁶⁾。また*wg*や*dpp*の発現を受けて、再生芽の予定附節領域で*Distal-less* (*Dll*)、予定脛節と予定附節第1節領域で*dachshund* (*dac*)が発現する(図7A)。コオロギにおいて β カテニンをコードする*armadillo* (*arm*)に対するRNAiを行うとWntシグナルが不活性化されて器官再生が起こらず¹³⁾、



図7
脚パターン形成遺伝子群による再パターン形成の制御
(文献 8), 16), 9), 17) を一部改編)

Egfr^{RNAi}を行うと脚の遠位端が再生しなかった¹⁶⁾。脚パターン形成遺伝子*Dll*や*dac*に対するRNAiでは、*Dll*^{RNAi}では脚の遠位側が再生せず*dac*^{RNAi}では脛節の遠位側と附節の近位側が再生しなかった(図7C)¹⁷⁾。これらの遺伝子に対するRNAiの表現型は、ショウジョウバエの相同遺伝子の変異体において観察される肢芽形成異常の表現型とよく類似しており、再生過程における再パターン形成が発生の繰り返しであることが分かる。

未切断の脚では*wg*や*Egfr*は発現していないが、切断後の再生芽では*wg*や*Egfr*の発現が再活性化される^{13), 16)}。再生過程における遺伝子発現の再活性化の分子メカニズムを解析するため、再生脚で高発現するエピジェネティック因子に着目した¹¹⁾。遺伝子の発現はクロマチンの状態に強く依存し、クロマチンが凝集したヘテロクロマチン状態では遺伝子は発現せず、クロマチンが弛緩したユークロマチン状態に移行することで遺伝子発現が可能となる。クロマチンの状態はDNAのメチル化やヒストンの化学修飾により制御されるが、昆虫ではDNAのメチル化はほとんど使われていないため、ヒストンのメチル化とアセチル化を介したクロマチン状態制御が遺伝子発現の中心的な役割を担っている。なかでもヒストンH3の27番目のリジン残基のメチル化(ヒストンH3K27me3)はヘテロクロマチン化を誘導し、脱メチル化することでユークロマチン化を誘導して遺伝子発現を活性化できる。昆虫ではEnhancer of zeste (*E(z)*)がヒストンH3K27をメチル化し、UtxがヒストンH3K27me3を脱メチル化する酵素であり、未切断の脚と比較してコオロギの再生脚では*E(z)*と*Utx*はそれぞれ2.2倍と8.9倍に発現上昇していた¹¹⁾。再生脚におけるヒストンH3K27me3は*E(z)*^{RNAi}により低下し、*Utx*^{RNAi}により亢進した(図8A)。*E(z)*^{RNAi}個体の脚を脛節で切断して再生過程を観察すると、脛節の失われた部分と附節およ

び爪が再生され、脛節と附節の間に過剰な脛節が挿入再生された(図8B)。 $E(z)^{RNAi}$ の再生脚では脚パターン形成遺伝子 dac が強く発現する領域が遠位側に拡大していた。 dac 発現の異所的な再活性化により過剰な脛節形成が誘導されたと考えられる。また Utx^{RNAi} 個体の再生脚では、附節において関節の形成が抑制された(図8B)。 Utx^{RNAi} の再生脚では附節中位において脚パターン形成遺伝子 $Egfr$ の発現が再活性化されず、 $Egfr$ 発現の低下により関節形成が阻害されたと考えられる¹⁸⁾。再生芽においてはヒストンH3K4やH3K9を修飾するエピジェネティック因子群の発現も変化しており¹¹⁾、多くの遺伝子の再発現がエピジェネティックな制御を受けていると示唆されている。脚再生における $E(z)^{RNAi}$ や Utx^{RNAi} の表現型は、胚発生における $E(z)^{RNAi}$ や Utx^{RNAi} の表現型とは異なっており^{18), 19)}、ヒストンH3K27me3によりエピジェネティックに制御される標的遺伝子が脚再生と肢芽発生では一部異なっているのかもしれない。今後より詳細な解析に期待が持たれる。

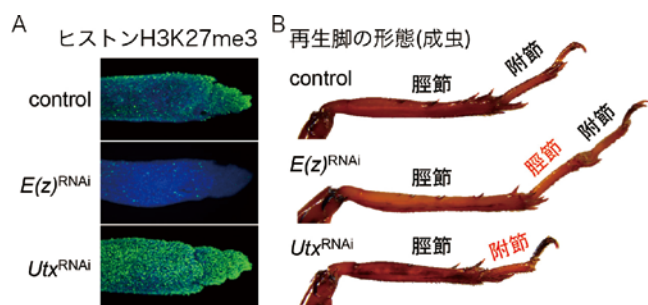


図8 ヒストンH3K27のメチル化を介した再パターン形成の制御 (文献 18)を一部改編)

03 | おわりに

コオロギを再生モデル昆虫とし、脚再生過程を経時的に遺伝子レベルで解析することで、器官再生を制御する普遍的な分子メカニズムを明らかにしてきた(図9A, B)。再生芽形成に重要

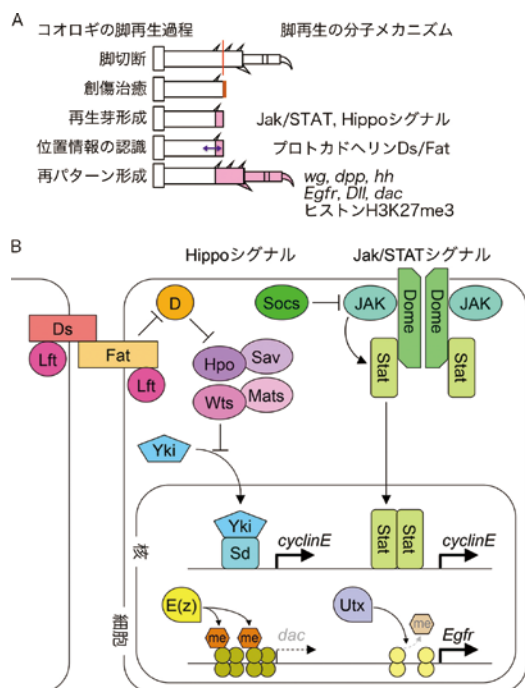


図9 器官再生を制御する分子メカニズム

なJak/STATシグナルやHippoシグナルは、脊椎動物においても細胞増殖を制御する重要なシグナル経路として知られており、再生芽細胞の再分化にはたらくヒストンH3K27メチル化制御因子 $E(z)$ と Utx はiPS細胞の分化においても重要なはたらきをすることが明らかになりつつある。昆虫からヒトへの進化には3億年以上の隔たりがあるが、発生に重要な分子メカニズムは普遍的に保存されており、昆虫で分かったことの多くはヒトへも応用できる。再生モデル昆虫から学んだ器官再生の分子メカニズムが、ヒトの器官再生を実現する一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) K. Agata, T. Inoue, Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals. *Dev. Growth Differ.* **54**, 143–152 (2012).
- 2) V. French, P. J. Bryant, S. V. Bryant, Pattern regulation in epimorphic fields. *Science*. **193**, 969–981 (1976).
- 3) T. Mito, S. Noji, The Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*: An Emerging Model for Developmental and Regeneration Studies. *CSH Protoc.* **2008**, 331–346 (2008).
- 4) N. Niwa, M. Saitoh, H. Ohuchi, H. Yoshioka, S. Noji, Correlation between Distal-less expression patterns and structures of appendages in development of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Sci.* **14**, 115–125 (1997).
- 5) Y. Inoue, T. Mito, K. Miyawaki, K. Matsushima, Y. Shinmyo, T. A. Heanue, G. Mardone, H. Ohuchi, S. Noji, Correlation of expression patterns of homothorax, dachshund, and Distal-less with the proximodistal segmentation of the cricket leg bud. *Mech. Dev.* **113**, 141–148 (2002).
- 6) T. Nakamura, M. Yoshizaki, S. Ogawa, H. Okamoto, Y. Shinmyo, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji, T. Mito, Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr. Biol.* **20**, 1641–1647 (2010).
- 7) T. Watanabe, H. Ochiai, T. Sakuma, H. W. Horch, N. Hamaguchi, T. Nakamura, T. Bando, H. Ohuchi, T. Yamamoto, S. Noji, T. Mito, Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat. Commun.* **3**, 1017 (2012).
- 8) T. Mito, Y. Inoue, S. Kimura, K. Miyawaki, N. Niwa, Y. Shinmyo, H. Ohuchi, S. Noji, Involvement of hedgehog, wingless, and dpp in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model. *Mech. Dev.* **114**, 27–35 (2002).
- 9) T. Nakamura, T. Mito, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji, Dissecting insect leg regeneration through RNA interference. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 64–72 (2008).
- 10) S. Wang, V. Tsarouhas, N. Xylourgidis, N. Sabri, K. Tiklova, N. Nautiyal, M. Gallo, C. Samakovlis, The tyrosine kinase stitcher activates Rainy head and epidermal wound healing in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **11**, 890–895 (2009).
- 11) T. Bando, Y. Ishimaru, T. Kida, Y. Hamada, Y. Matsuoka, T. Nakamura, H. Ohuchi, S. Noji, T. Mito, Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. **140**, 959–964 (2013).
- 12) T. Bando, T. Mito, Y. Maeda, T. Nakamura, F. Ito, T. Watanabe, H. Ohuchi, S. Noji, Regulation of leg size and shape by the Dachshund/Fat signalling pathway during regeneration. *Development*. **136**, 2235–2245 (2009).
- 13) T. Nakamura, T. Mito, Y. Tanaka, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji, Involvement of canonical Wnt/Wingless signaling in the determination of the positional values within the leg segment of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev. Growth Differ.* **49**, 79–88 (2007).
- 14) T. Bando, T. Mito, T. Nakamura, H. Ohuchi, S. Noji, Regulation of leg size and shape: Involvement of the Dachshund-fat signaling pathway. *Dev. Dyn.* **240**, 1028–1041 (2011).
- 15) T. Bando, Y. Hamada, K. Kurita, T. Nakamura, T. Mito, H. Ohuchi, S. Noji, Lowfat, a mammalian Lix1 homologue, regulates leg size and growth under the Dachshund/Fat signaling pathway during tissue regeneration. *Dev. Dyn.* **240**, 1440–1453 (2011).
- 16) T. Nakamura, T. Mito, K. Miyawaki, H. Ohuchi, S. Noji, EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Dev. Biol.* **319**, 46–55 (2008).
- 17) Y. Ishimaru, T. Nakamura, T. Bando, Y. Matsuoka, H. Ohuchi, S. Noji, T. Mito, Involvement of dachshund and Distal-less in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration. *Sci. Rep.* **5**, 8387 (2015).
- 18) Y. Hamada, T. Bando, T. Nakamura, Y. Ishimaru, T. Mito, S. Noji, K. Tomioka, H. Ohuchi, Leg regeneration is epigenetically regulated by histone H3K27 methylation in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. **142**, 2916–2927 (2015).
- 19) Y. Matsuoka, T. Bando, T. Watanabe, Y. Ishimaru, S. Noji, A. Popadić, T. Mito, Short germ insects utilize both the ancestral and derived mode of Polycomb group-mediated epigenetic silencing of Hox genes. *Biol. Open*. **4**, 702–709 (2015).

応用利用に向けた 低分子化合物によるヒトiPS細胞の培養

iPS cells cultivation with small molecules for application.

京都大学 物質—細胞統合システム拠点 研究員 **池田 達彦**
Tatsuhiko Ikeda, Ph.D. (Researcher)
Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University

京都大学 物質—細胞統合システム拠点 特定拠点講師 **長谷川 光一**
Kouichi Hasegawa, Ph.D. (Junior Associate Professor)
Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University



キーワード

iPS, small molecules, cultivation

01 | はじめに

1981年にEvansらによって、はじめて多能性幹細胞である胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞) がマウスから樹立されて以来¹⁾、研究環境は大きく変化した。多能性幹細胞そのものに関する様々な研究が行われたのはもちろんのことであるが、ES細胞を用いることでキメラ胚の作製が可能となり、これによって様々な種類のノックアウトマウスが作製されることとなった。ES細胞から作られた様々な培養細胞や病態モデルマウス等は今日でも多くの研究に用いられ、疾患の原因解明や治療薬の開発に貢献している。さらに、1998年にはThomsonらによって、ヒトにおいてもES細胞が樹立され²⁾、研究がますます加速することとなった一方で、ES細胞の作製には生命の萌芽たる初期胚が必要となるとの考えから、倫理上の問題に対する議論が持ち上がり、いくつかの国においては、ES細胞の作製が禁止されることとなった。そのような状況の中、2006年に山中らがOct4, Sox2, Klf4, c-Mycの4つの遺伝子を導入することで体細胞を初期化し、誘導型多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞) を作製することに成功した³⁾。これによって、倫理上の問題に縛られることなく多様なヒト多能性幹細胞すなわちiPS細胞を作製・研究することが可能となり、疾患の原因解明や治療薬の開発に加えて再生医療の分野においても研究が加速することとなった。

こうしてヒトiPS細胞を用いた研究が基礎研究から応用利用へと発展する中で、その培養方法の研究・開発がますます重要になってきている。すなわち、iPS細胞を作製・維持できることはもちろんであるが、より安全なiPS細胞を大量かつ安定的に供給できる培養方法の開発が求められているのである。本稿では、応用利用の観点からヒトiPS細胞の培養方法について概説する。

02 | ヒトES細胞/iPS細胞の培養方法

当初ヒトES細胞の培養は牛胎仔血清を添加した培地で、マウス胎仔由来の線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts: MEF) をフィーダー細胞として、ES細胞とフィーダー細胞との共培養系で培養されていた。しかしながら、牛胎仔血清や線維芽細胞のロットが変わるとうまく培養できない場合がある等、培養方法としては非常に不安定なものであった。そこで、フィーダー細胞や血清から供給される成分の中からヒトES細胞の多能性の維持に寄与する成分を突き止め、安定的な培養方法を開発することが求められた。

先行するマウスES細胞の研究においては、マウスES細胞の多能性の維持にサイトカインの一種である白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) が重要な役割を果たしていることが解明され、LIFの添加によって培養が安定することが明らかとなっていた。さらに近年、MAPKシグナルパスウェイが分化を誘導すること、wntシグナルパスウェイが多能性の維持に関与していることが明らかとなり、MAPK阻害剤およびwntシグナルにおいて抑制的に働いているGSK3の阻害剤を添加することで無血清培地での培養が確立されている⁴⁾。

一方、ヒトES細胞においては、LIFの添加は多能性の維持に寄与しておらず、線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2: FGF2) やトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGFβ) スーパーファミリーのアクチビンなどからのシグナルによって多能性が維持され、マウスと同様には培養できないことが分かっていた。

このことから、現在もなお、ヒトES細胞/iPS細胞の培養は一般的にはフィーダー細胞としてMEFを用い、血清代替 (KnockOut™ Serum Replacement: KSR) およびFGF2を添加した培地で行われることが多い。一方で、フィーダー細胞を用いずマトリゲル等を基底膜マトリックスとして用いるフィー

ダーフリー培地も多数開発されている⁵⁾⁻⁷⁾。その一部を例として挙げると、mTeSR1やEssential8等がよく使われているほか、国内においてはStemFit AK03Nもよく使用されているようである。しかしながら、いずれも高価であるうえ、これらにおいてもFGF2等の増殖因子が添加されており、こうしたタンパク質の安定性が培養の安定性にも影響を与える場合があるため、応用利用のためにはより安価で安定性の高い完全合成培地の開発が望まれている。また、基底膜マトリックスはフィーダーフリー培地で接着培養する際の細胞の足場となる重要な成分で、マトリゲル、ビトロネクチン、ラミニン等がよく用いられているが、継代の際には細胞と基底膜マトリックスとを解離させる必要がある。その方法としてはタンパク質分解酵素を用いる方法が一般的であるが、EDTAを加えたPBSを用いる方法⁶⁾やカルシウムイオンを添加したPBSを用いる方法⁸⁾等もあり、培地の種類や細胞の種類に合わせて適切な方法を選択する必要がある。

03 | naïve状態とprimed状態

さて、前項においてマウスES/iPS細胞とヒトES/iPS細胞では多能性の維持機構が異なっていることを記したが、マウスやラット等のげっ歯類由来のES/iPS細胞とその他の哺乳類由来のES/iPS細胞では様々な特性が異なっている。当初これらの違いは種特異的な差であると思われていたが、マウスの着床直後の胚からもヒトES/iPS細胞様の細胞が樹立できることが報告され^{9), 10)}、現在では多能性幹細胞の未分化の度合いの違いによるものと考えられており、マウスやラットES細胞様のより未分化な状態はnaïve状態、ヒトES細胞やヒトiPS細胞等のやや分化の進んだ状態はprimed状態と名付けられた¹¹⁾。

naïveとprimedの差を表す特徴としては、まずコロニーの外観が挙げられる。naïveの幹細胞はやや厚みのある重層的なドーム状のコロニーを形成するのに対して、primedの幹細胞は薄く平らなコロニーを形成する。また、継代の際にトリプシン処理によって細胞塊を単一細胞にまでばらしてしまうと、primedでは生存率が大きく低下するのに対して、naïveでは高い確率で生存できることが知られている。次にエピジェネティックな特徴としてX染色体の不活性化が挙げられる。ヒトを含む哺乳類のX染色体はメスの場合は分化が始まるとすぐに1本が不活性化されることが知られているが、わずかに分化が進んだ状態であるprimedの幹細胞でも同様に不活性化が起こる。これに対して、naïveの幹細胞ではX染色体の不活性化は起きていない。同様に、分化とともに進むことが知られているヒストンやDNAのメチル化修飾においても両者には違いがある。発生に関わる遺伝子のプロモーター領域に結合しているヒストンH3の27番目のリジン残基におけるトリメチル化(H3K27me3)はnaïveではほとんど蓄積されていないのに対して、primedではH3K27me3の蓄積がみられ、全体的なDNAのメチル化についてもprimedでは促進されている¹²⁾。これらのことから、naïveがより未分化な状態であることが改めて伺える。また、naïveとprimedではエネルギー代謝も異なっている。naïveの幹細胞ではミトコンドリアの活性が高く、TCAサイクルや酸化的リン酸化によるエネルギー代謝が活性化しており、酸素の消費量も多くなっているが、primedの幹細胞で

は解糖系がエネルギー代謝の中心となっており、酸素呼吸によるエネルギー代謝は活性化していない。これは非常に興味深い現象で、発生の最初期であるnaïveでは酸素呼吸によってエネルギーを作り出しているにも関わらず、ほんのわずかに分化の進んだprimedでは発酵によってエネルギーを作り出しており、やがて分化が進むと再び酸素呼吸によるエネルギー代謝へと戻っていくのである。当然のことながら、エネルギー効率の良い酸素呼吸を行っているnaïveの幹細胞はprimedよりも増殖速度は速い。さらに、両者にはキメラ胚の形成能にも差がある。naïveの幹細胞はキメラ胚を形成することが可能であるが、primedの幹細胞ではキメラ胚の形成は非常に困難である。

通常のヒトiPS細胞はprimed状態であり、細胞の継代時には、単細胞に解離せずに細胞塊での継代が必要であり、継代効率は作業者に依存する所も多い。ヒトiPS細胞の応用利用を考えた場合、継代効率は非常に重要な要素であることから、ヒトにおけるnaïve幹細胞の作出は近年の大きなテーマの一つであった。naïveから少し分化の進んだ状態がprimedであることから、マウス等ではnaïveの幹細胞はprimedの培養条件で培養することで容易にprimedへと変化するが、ヒトiPS細胞をprimedからnaïveへと変化することは容易ではなかった。最初に作製されたヒトnaïve ESC/iPSCはOct4とKlf4、又はKlf4とKlf2を一時的に強発現させ、MAPKの一種であるERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、LIFとフォルスコリンを加えた培地で培養することで、作製・維持が可能であった¹³⁾。つまり、遺伝子導入に依存していた。しかしその後、様々な方法・培養条件でヒトnaïve ESC/iPSCが作製されるようになり、現在では上記の2つの阻害剤に加えて、さらにいくつかの阻害剤や成長促進因子を添加することで、Oct4やKlf4等の一過的な強発現を伴うことなくprimedからnaïveへの移行が可能となっている。これによって、ヒトES/iPS細胞を高増殖で、解離継代が容易な培養が可能となった。

	naïve	primed
多能性の維持	LIFシグナルに依存	FGF、アクチビンシグナルに依存
コロニー形状	ドーム状で重層的	平面的
単一細胞での生存性(継代時)	高	低
X染色体の不活性化	なし	あり
発生関連遺伝子のプロモーター領域におけるH3K27me3の蓄積	低	高
DNAのメチル化	低	高
呼吸	酸素呼吸	発酵
増殖速度	速い	遅い
キメラ胚の形成	容易	困難

表1 naïveとprimedの特徴^{11), 12)}

04 | 培養条件による細胞の状態の変化

ヒトnaïve iPS細胞が作製されたことを先に述べたが、厳密にはそれらの細胞がnaïveの状態にあるかどうかは断定でき

ない。なぜなら、naïveであることを示す重要な要素の一つがキメラ胚の形成能だからである。ヒトiPS細胞においてはキメラ胚を作って確かめるといわけにはいかない。前述のヒトnaïve iPS細胞はキメラ胚形成能以外のnaïveの特徴を持つ幹細胞ということになる。ヒトnaïve iPS細胞は未だに確立された技術ではなく、キメラ胚形成能といった評価法が適用できないため、作製方法によってヒトnaïve iPS細胞には多くのバリエーションが存在する。作製方法としては、当初作製されたように2種類の阻害剤とLIFを培地に加えるとともに、Oct4やKlf4等の一過的な強発現によってnaïveへと移行させる方法や、ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤にさらに骨形成タンパク質(BMP)シグナル阻害剤を加えLIFを添加した培地でOct4やKlf4等の一過的な強発現を伴わずにnaïveへと移行させる方法、さらにこれらを発展させて、複数のMAPK阻害剤を加える方法等がある。もちろん、いずれのnaïve iPS細胞においてもドーム状のコロニー形成やLIFシグナル依存的な多能性維持等のnaïveであることを示す特徴は持っているが、遺伝子の発現量を網羅的に解析するトランスクリプトーム解析等の高分解能を有する解析方法を用いると非常に多くのバリエーションが存在することがわかる。

実際にいくつかのRNA-seqデータ¹⁴⁾⁻¹⁹⁾を用いてトランスクリプトーム解析を行うと、naïve ES/iPS細胞の中にもややprimedに近い遺伝子発現パターンを持つものと大きく異なる遺伝子発現パターンを持つものが存在している。筆者も公開されているRNA-seqデータを用いて解析を行ったところ、Theunissenらの作製したnaïve ES細胞とTakahimaらの作製したnaïve ES細胞が特にprimedと異なる遺伝子発現パターンを有していることが確認できた(図1)。

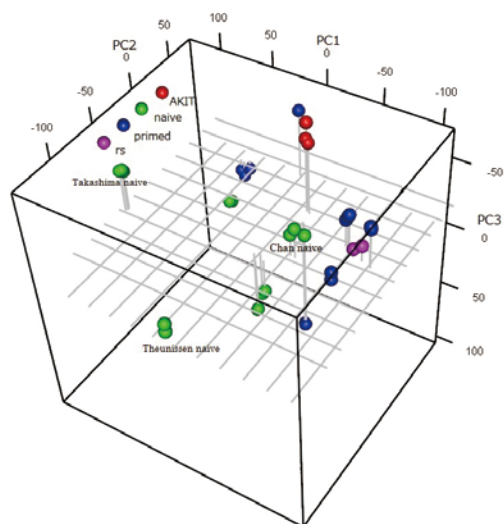


図1 様々なnaïve、primed、rs幹細胞の主成分分析
AKITは筆者らのグループが作製した新しい培地で培養したES細胞。左側にnaïveのクラスターが、右側にprimedのクラスターが形成されている。rsはprimedの一部であることが確認できる。

同様の結果は他の論文でも報告されており²⁰⁾、現時点では彼ら2グループのnaïve ESCがよりnaïveらしい状態にあるのだろうと思われる。

逆に、primedに属する細胞でありながら、naïveに近い遺伝子発現パターンを持つものも見出された。筆者らのグループが作製したFGF2等の増殖因子を含まない新しい培地で培養したES/iPS細胞である。この培地で培養されたES/iPS細胞は平

面的なコロニーを形成し、継代時にトリプシンを用いて単一細胞にすると生存率が著しく低下する等のprimedの特徴を有していたが、naïveにおいて多能性維持に関わる遺伝子のうちの一つであるTbx3の発現量が上昇していた他、他の培養条件で培養した場合と詳細に比較したところ、発現量に変動の見られた遺伝子のパターンがある種のnaïve ES/iPS細胞のものとよく似ているという結果が得られた(図2)。

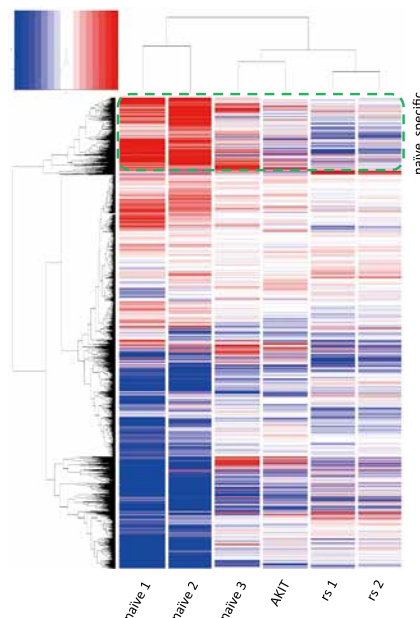


図2 様々なnaïve、rs幹細胞およびAKIT培養ES細胞の発現変動遺伝子のヒートマップ primedの細胞と比較して発現変動のあった遺伝子について、その変動パターンをヒートマップを用いて比較した。緑の点線で囲んだ遺伝子群がnaïveに特異的な遺伝子群であると思われる。また、AKIT培養ES細胞の発現変動パターンはnaïve3と似ていることが確認できる。

このことと、培養条件を変えることで遺伝子の一過的な強発現を伴わずにprimedからnaïveへと移行させることができることを併せて考えると、naïveとprimedの間にはある程度の可逆的な連続性があるのかもしれない。

さらに、従来のprimedやnaïveとは異なる特徴を有する新しい状態が見つかってきている。その一つが領域選択型多能性幹細胞(region-selective pluripotent stem cell: rsPSC)である¹⁹⁾。この多能性幹細胞はマウスのエピブラストをFGF2とwnt阻害剤であるIWR1を添加した培地で培養することで得られた。このrsPSCは基本的にはprimedの特徴を有していたが、単一細胞での継代に対する耐性や、やや早い増殖速度を示した他、特殊なキメラ胚形成能を有していた。すなわち、マウスエピブラストの後極側に移植した場合にのみ生着し、キメラ胚を形成したのである。同様に、FGF2とIWR1を添加した培地でヒトES細胞を培養したところヒトrsPSCが得られ、これをマウスエピブラストの後極側に移植したところ生着し、三胚葉のいずれにも寄与していたことから、rsPSCには異種間キメラ形成能があることが示された。

このように、ヒト多能性幹細胞の未分化状態には様々な状態が存在し、細胞の遺伝的背景や組織的背景、樹立時の遺伝子改変だけではなく、培養方法によって大きく特徴が変化することが示されてきた。このことは目的にあわせて最適な培養方法を選択、あるいは開発する必要があることを示している。例えば、遺伝子改変を行うのであれば、単一細胞から効率よく増殖するnaïveやrsが適しているし、短期間で多量の細胞を必要とする

のであれば、naïveやrsの増殖速度の速さも魅力的だろう。その一方で、naïveやrsを作製・維持するための培地は高価であり、長期培養下でのゲノムの安定性が低いことも報告されている²¹⁾。また、前述のStemFitやE8では、細胞はnaïveと同等の増殖も可能である。このため、現在まで、特別な理由がなければ従来のprimedの培養方法を選択することが無難である。

05 | 応用利用に向けた培養方法の開発

では、応用利用に適した培養方法とはどのようなものだろうか。それはまず高品質で安価に安定供給が可能な培養方法でなければならない。高品質であるということは、分化した細胞や死細胞がほとんど含まれていないことはもちろんだが、ロット間の差がなく、同一の処理に対して同一の応答性が維持されている必要がある。安定供給を行うためには発酵工学という回分培養や流加培養あるいは連続培養のような大容量での培養が必要となる。これらを満たし、市場に広く供給するためには培地成分に高価なものを使用しない等のコストカットも必要となる。

まず高品質を実現するためには、現在の培養方法に存在する不安定性の原因を取り除く必要がある。ヒトiPS細胞の培養における不安定性の最大の要因は生物由来の成分である。フィーダー細胞を用いる培養方法ではフィーダー細胞の状態がヒトiPS細胞の状態に影響を与えるし、フィーダーフリー培地においても添加されているシグナルタンパク質の安定性の影響を受けることになる。さらに、再生医療への活用においては、安全性の観点から動物由来成分を含まない(Xenoフリー)培地であることも要求される。そこで重要な役割を果たすのが生理活性をもつ低分子化合物である。naïveやrsPSCの作製・維持にもERK1/2阻害剤やGSK3阻害剤、wnt阻害剤といった低分子化合物が用いられているが(表2)、このような低分子化合物は細胞内のシグナル分子や細胞表面のレセプターに結合することで、シグナルを遮断したり強化したりする作用がある。これら低分子化合物を組み合わせることで、培地中から不安定なタンパク質を取り除き、安定的な培地を作製することができると期待される。実際に、筆者らのグループにおいて低分子化合物を組み合わせることでFGF2等の増殖因子を含まない、全く新しいフィーダーフリー・Xenoフリー培地の作製に成功しており、今

後さらなる改良を進めることで、タンパク質を全く添加しない完全合成培地の開発を目指したい。

完全合成培地の開発は、均質で安定供給可能な大容量の培養を行うためにも重要である。現在一般的に行われているプレート上での平面的な培養では空間当たりの培養効率が悪い上に、培地交換にも多くのコストがかかる。そこで大容量のタンク質で3次元的に培養することが求められるが、当然のことながらヒトiPS細胞の培養には細胞間接着によるシグナル伝達も重要であるため、単一細胞ではなく一定の大きさの細胞塊を維持しながら培養液中を浮遊させる(浮遊培養)必要がある。こうした条件を満たすためには、浮遊培養に適した完全合成培地を調製しなければならない。この点についても、筆者らのグループは、2種類のポリマーを利用することで、ヒトiPS細胞にストレスを与えることのない全く新しい浮遊培養系を開発している。現在はこの浮遊培養系と、完全合成培地の開発を通して、新たな安価な培養系の開発に着手している。

また、再生医療への応用を考える場合には、これらの安価で安定した培養法に加えて、培養方法によるエピジェネティックな変化やゲノム不安定性にも注意が必要となる。iPS細胞においてはその初期化の過程においてエピジェネティックな状態は完全には初期化されていないことが知られているが、このことが分化後の組織を生体へ移植した際にどのような影響を及ぼすのかは不明である。さらに、他の培養細胞同様、iPS細胞を長く継代していると遺伝子が損傷を受け突然変異が生じたり、エピジェネティックな変化が生じることがある。こうした変化が生じた細胞を再生医療に用いることは出来ないので、こうした変化が起こりにくい培養条件についての検討が今後の大きな課題の一つである。

ここまではヒトiPS細胞を高品質で安価に安定供給する場合に必要な培養条件を示した。しかし、培養されたiPS細胞をどのように利用するかによって、その後の要求される培養条件は異なってくる(図3)。例えば、角膜等に分化させ患者に移植を行うことを目的とする場合であれば、大量培養の必要性は低くなり高い安全性が求められることから、均質性の高い浮遊培養よりも小スケールで個別に管理できる従来のプレート上での接着培養や特殊なメンブレン上での培養の方が適していると思われる。この場合においては、ヒトiPS細胞を播種する基底膜マトリックスに何を用いるかも重要な選択となる。前述のように

培養方法・培地		基質	動物由来成分	増殖因子	低分子化合物
primed	KSR + MEF	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	FGF2およびMEF細胞発現物質	
	TeSR1 ⁵⁾	ラミニン	Xenoフリー	FGF2, TGFβ 他	
	Essential8 ⁶⁾	ビトロネクチン	Xenoフリー	FGF2, TGFβ	
	StemFit AK03N ⁷⁾	ラミニン	Xenoフリー	FGF2 他	
naïve	2iL ¹³⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	LIFおよびMEF細胞発現物質	ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、フォルスコリン
	t2iL+G6 ¹⁷⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	LIF、FGF2およびMEF細胞発現物質	ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、PKC阻害剤
	5i/L/A ¹⁸⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	LIF、FGF2、アクチビン	ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、ROCK阻害剤、BRAF阻害剤、SRC阻害剤
rs ¹⁹⁾		ゼラチンおよびMEF細胞発現基質又はマトリゲル	含む	FGF2	IWR1

表2 主な培養方法・培地とその特徴

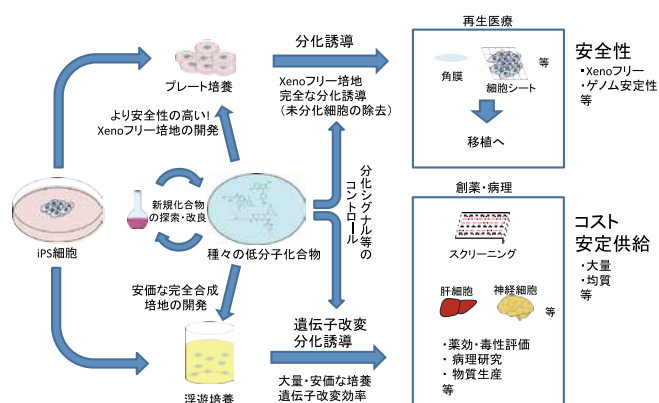


図3 応用利用と培養条件 iPS細胞を応用利用する場合には、その目的にあわせて培養方法を開発・選択が必要である。再生医療への応用を目的とする場合には(上段)、高い安全性が要求される。創薬研究や病理研究などへの応用を目的とする場合には(下段)、コストの低さや、安定供給体制がより重要となる。いずれの場合においても生理活性を持つ低分子化合物を用いることで培地から高価で不安定なタンパク質を取り除き、安全で安価な培養方法が開発できる他、シグナルのコントロールによるnaiveやrsPSCの作製・維持および分化誘導などにおいても重要であり、今後様々な生理活性を持つ低分子化合物が開発されることで、多くの問題が解決できるものと期待される。

基底膜マトリックスの種類によっては増殖速度や継代の効率、分化効率が変化するほか、生体に移植した際に残留していると激しい免疫応答(拒絶反応)を起こす場合もあることにも注意が必要である。一方で、創薬における候補化合物のスクリーニングや薬効・毒性評価への応用を目的とする場合には、Xenoフリー培地であることは必須ではなくなり、コストの低さや安定供給体制といった要素がより重要となる。また、病態モデルの作製や病理研究に利用する場合には遺伝子改変が必要になる場合もあり、このような場合には遺伝子改変効率が高いと思われるnaiveやrsPSCを作製・維持する培地を選択することも考慮しなければならない。

06 | おわりに

ヒトES/iPS細胞の様々な特徴とその特徴を引き出す、あるいは変化させる培養条件について概説した。しかしながら、ヒトES/iPS細胞においてその状態を維持するためのシグナル経路については完全には明らかになっておらず、また、既知である領域においてもそのシグナルを遮断又は増幅することができる生理活性を持つ低分子化合物が網羅されているわけではない。今後、ヒトiPS細胞の基礎的研究の進展と並行して、新たに生理活性を持つ低分子化合物が発見・合成されることでより応用利用に適した培養方法が開発されていくものと期待したい。

参考文献

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819), 154-6 (1981).
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**(5391), 1145-7 (1998).
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4), 663-76 (2006).
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**(7194), 519-23 (2008).
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchem ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA,

Thomson JA. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**(2), 185-7 (2006).

- Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**(5), 424-9 (2011).
- Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **4**, 3594 (2014).
- Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Onuma Y, Chan T, Michiue T, Furue KM, Asashima M. Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations. *Sci. Rep.* **4**, 4646 (2014).
- Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**(7150), 191-5 (2007).
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**(7150), 196-9 (2007).
- Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**(6), 487-92 (2009).
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**(7479), 282-6 (2013).
- Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassidy JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(20), 9222-7 (2010).
- Sperber H, Mathieu J, Wang Y, Ferreccio A, Hesson J, Xu Z, Fischer KA, Devi A, Detraux D, Gu H, Battle SL, Showalter M, Valensisi C, Bielas JH, Ericson NG, Margaretha L, Robitaille AM, Margineanu D, Fiehn O, Hockenbery D, Blau CA, Raftery D, Margolin AA, Hawkins RD, Moon RT, Ware CB, Ruohola-Baker H. The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat. Cell Biol.* **17**(12), 1523-35 (2015).
- Ji X, Dadon DB, Powell BE, Fan ZP, Borges-Rivera D, Shachar S, Weintraub AS, Hnisz D, Pegoraro G5, Lee TI, Misteli T, Jaenisch R, Young RA. 3D Chromosome Regulatory Landscape of Human Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* **18**(2), 262-75 (2016).
- Chan YS, Göke J, Ng JH, Lu X, Gonzales KA, Tan CP, Tng WQ, Hong ZZ, Lim YS, Ng HH. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* **13**(6), 663-75 (2013).
- Takahashi Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficiz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P, Smith A. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* **158**(6), 1254-69 (2014).
- Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M1, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* **15**(4), 471-87 (2014).
- Wu J, Okamura D, Li M, Suzuki K, Luo C, Ma L, He Y, Li Z, Benner C, Tamura I, Krause MN, Nery JR, Du T, Zhang Z, Hishida T, Takahashi Y, Aizawa E, Kim NY, Lajara J, Guillen P, Campistol JM, Esteban CR, Ross PJ, Saghatelian A, Ren B, Ecker JR, Izpisua Belmonte JC. An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* **521**(7552), 316-21 (2015).
- Huang K, Maruyama T, Fan G. The Naive State of Human Pluripotent Stem Cells: A Synthesis of Stem Cell and Preimplantation Embryo Transcriptome Analyses. *Cell Stem Cell* **15**(4), 410-5 (2014).
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**(7), 1299-310 (2008).

ヒトiPS細胞の分化誘導プロセスにおける細胞の構造構築段階の重要性

ーヒトiPS細胞の心筋細胞分化に及ぼす胚様体の大きさの影響

Importance of the structuration of cells in the differentiation process of human induced pluripotent stem (hiPS) cells: Effect of the size of embryoid body on cardiomyocyte differentiation of hiPS cells.

山梨大学大学院総合研究部 生命環境学域 助教 **大貫 喜嗣**

Ph.D. Yoshitsugu Ohnuki (Assistant Professor)

Faculty of Life and Environmental Sciences, Graduate Faculty of Interdisciplinary Research, University of Yamanashi

山梨大学大学院総合研究部 生命環境学域 教授 **黒澤 尋**

Ph.D. Hiroshi Kurosawa (Professor)

Faculty of Life and Environmental Sciences, Graduate Faculty of Interdisciplinary Research, University of Yamanashi



キーワード

hiPS cells, embryoid body, cardiomyocytes

01 | はじめに

2007年、山中らはヒト人工多能性幹細胞(human induced pluripotent stem cells; hiPS細胞)を樹立した¹⁾。それまで研究されてきた胚性幹細胞(embryonic stem cells; ES細胞)は胚から樹立されるため、倫理的な問題が不可避であった。しかし、iPS細胞は体細胞から樹立されるため、ES細胞が抱える課題を解決した。加えて、ヒトiPS細胞はドナーの遺伝的背景および疾患の背景が既知であるため、自家細胞による移植治療だけでなく創薬や遺伝子疾患の研究などへの応用が期待されている。その材料となる目的細胞はできる限り一定の品質水準を維持している必要があるため、ヒトiPS細胞から目的細胞への分化誘導法には高い再現性と頑強性が求められている。

ヒトiPS細胞の分化誘導プロセスは、細胞の継代・維持と必要な細胞を確保するために細胞増殖を行う「維持増幅」、分化誘導前に細胞の単層化や三次元に構造化する「構造構築」、そして液性因子などを用いて積極的に分化誘導を行う「分化誘導」の3つの段階に分けられる。その中でも構造構築段階は、初期三胚葉への分化が決定する重要な段階である。この段階で目的細胞とは異なる系列の胚葉に分化すると、その後の分化誘導プロセスは成功しないため、この段階の細胞集団の品質を管理することは非常に重要である。構造構築段階では、三次元細胞集塊である胚様体を形成するのが一般的である。通常、ヒトiPS細胞の胚様体形成は、培養したヒトiPS細胞のコロニーを剥離し、自然発生的に凝集体を形成させるため胚様体の大きさが不均一になりやすい。そのため、実験をするたびに胚様体の品質が異なる可能性があり、十分な再現性が得られないという問題がある。

本研究では、細胞非接着性96-well丸底プレートを使用することによって胚様体の大きさの制御を試みた。そして、胚様体の大きさの違いが、その後の分化の方向性に与える影響を明

らかにした。さらに、形成した胚様体の大きさがヒトiPS細胞から心筋細胞への分化効率に及ぼす影響について検討した。

02 | 胚様体の特徴と形成方法

(1) 胚様体とは

胚様体(embryoid body; EB)とは、多能性幹細胞を浮遊培養することによって形成される三次元の細胞凝集塊である。EBは、神経細胞などに分化する胚体外胚葉と中・内胚葉に分化する原始内胚葉の二層構造をとる。そのため、EBは三胚葉に由来するすべての細胞を形成する能力を持つものと定義されている²⁾。多能性幹細胞の分化過程において重要なことは、分化の初期段階から内胚葉、中胚葉、外胚葉への細胞運命の決定が始まっているということである。たとえば、心筋細胞へ分化誘導を行う場合は、まず中胚葉へ分化を誘導しなければならない。すなわち、心筋細胞へ効率的に分化誘導をするためには、EB形成の段階から中胚葉への分化の方向性を与えて、EBを構成する細胞の多くが中胚葉系列の細胞となるようにしなければならない。マウスES細胞では、EB形成時の初期条件がその後の分化方向性に影響を与えることが示されている^{3),4)}。したがって、EBの形成条件を目的細胞に対して最適化することが重要である。

(2) 胚様体形成方法の種類

胚様体形成方法には、ハンギングドロップ法、バクテリアルディッシュ(細胞非接着性培養皿)上での浮遊培養によるEB形成法(以下、バクテリアルディッシュ法: BD法)、そして細胞非接着性96-well丸底プレートによる胚様体形成法(96-well法)がある。

ハンギングドロップ法はディッシュのフタに細胞懸濁液の懸滴を作り、その中でEBを形成する方法である。しかし、この方法は培地交換が困難であるため、未分化維持因子の添加が必要

なヒトiPS細胞には適さない。

BD法はヒトiPS細胞をコロニーもしくは小集塊で剥離し、組織細胞の接着性が低い細菌培養用のディッシュ上で浮遊培養する方法である(図1左)。この方法は、一度に大量のEBを形成できるため、大量の目的細胞が要求される場合に適している。この利点を生かしたバイオリアクターによる胚様体形成法の開発が進んでいる⁵⁾。しかし、個々のEBは形態が不揃いで、大きさも均一にはならないことから、ヒトiPS細胞から目的細胞への分化誘導効率と再現性が低下することが懸念される。

96-well法は細胞非接着性96-well丸底プレートに分散した細胞懸濁液を加え、ウェルの中央に単一のEBを形成する方法である(図1右)。ウェル内に規定の細胞数を播種することによって、形成するEBの大きさを制御することができる。ただし、ヒトiPS細胞は分散によるアポトーシスを抑制するため、ROCK阻害剤を添加しなければならない⁶⁾。一方では、ROCK阻害剤であるY-27632がヒトiPS細胞由来EBの凝集性に影響を与えることが報告されており⁷⁾、その最適化もまた重要である。ヒトES細胞の分化誘導においては、Eirakuらが96-well法を応用したSFEBq法を用いて胎児神経組織への分化誘導に成功している⁸⁾。96-well法は1ウェルに1個、1プレートに最大で96個のEBを形成することができる。BD法のように一度に大量のEBは得られないが、ウェル間のEBに質的なバラツキが少なく再現性が高い。さらに、ウェル毎にEB形成条件を設定することが可能であるため、小規模実験においては利用性の高い胚様体形成法と考えられている。

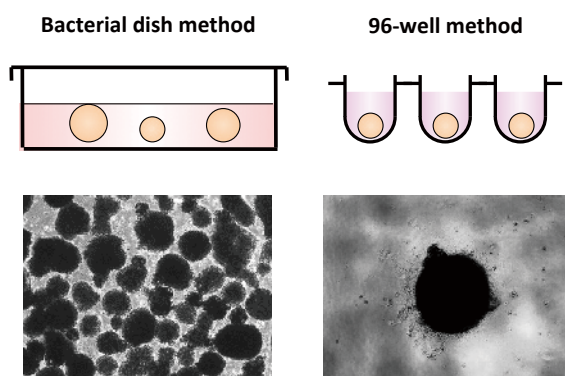


図1 胚様体形成法の種類と特徴

BD法:コロニーを剥離した後、自然発生的にEBが形成されるため、大きさが不均一となる。一度に大量の胚様体を形成できる。96-well法:細胞を酵素分散し、計数後に規定の細胞数を播種するため、大きさを制御できる。1ウェルに1つの胚様体が形成される。

03 | 胚様体の大きさの制御と分化方向性に及ぼす影響

(1) 概要

96-well法はBD法と比較して個々のEBの大きさを均一にできる方法である。96-well法で形成されるEBの大きさは、初期播種細胞数に依存するが、どの程度均一化できるのかについては詳細に検討されてこなかった。本報告では、様々な初期播種細胞数で96-well法によるEB形成を行い、BD法で形成したEBと比較して大きさの制御が可能かどうかを明らかにした。さらに、未分化維持因子非存在下で分化誘導を行い、初期播種細胞数の違いがヒトiPS細胞の分化方向性に与える影響を明らかにした。

(2) 方法

ヒトiPS細胞(201B7株、RIKEN BRC)はマイトマイシンCにより不活化したSNL細胞(76/7株)と共培養したものをを用いた。BD法では、共培養下のヒトiPS細胞をCTK解離液にてSNL細胞を剥離および除去した。ヒトiPS細胞のコロニーを剥離し、180 xgにて遠心した。6mLのb-FGF不含ヒトES培地により緩やかに再懸濁し、2mLの細胞懸濁液を細菌培養用の6-wellプレートに播種した。一方、96-well法では、CTK解離液にてSNL細胞を剥離および除去後、10μMのY-27632を添加したAccutaseによってシングルセルに分散した。分散したhiPS細胞を10 μMのY-27632を含むb-FGF不含ヒトES培地によって懸濁し、300, 1000, 3000, 9000, 30000 cells/wellとなるように細胞低接着性Lipidure plate (A-U96; NOF Co.)に播種し、4, 8, 12, 16日間の浮遊培養によってEBを形成した。以後、上記の初期播種細胞数で形成したEBをそれぞれ300-EB、1000-EB、3000-EB、9000-EBおよび30000-EBと表記する。形成したEBの形態学的特徴および、EBの未分化・初期分化関連遺伝子の発現量を定量RT-PCRによって解析した。

EBの大きさは顕微鏡画像から投影面の面積を計測し、(1)式により算出した。

$$\text{EBの大きさ} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{EBの投影面積}}{\pi}} \quad (1)$$

EBの大きさは、EBの短径と長径の平均により算出するのが一般的であるが、実験者間差を生じやすい。ここでは、投影面の面積から大きさを求めることによって、誤差を生じにくくした。

(3) 胚様体の大きさの制御

BD法により形成したEB(BD法-EB)と96-well法により形成したEBの大きさをヒストグラムにより比較した(図2)。BD法-EBの大きさは50~450μmの広い範囲に分布しており、その分布幅は約400μmであった。一方、96-well法で形成したEBは、BD法-EBに比べて、いずれの初期播種細胞数においても大きさの分布範囲が狭く、その分布幅は150μm以下であった。特に、3000 cells/wellで形成したEBの分布幅は100μm以下となり、最も高い均一性を示した。さらに、3000 cells/well以上の初期播種細胞数でEB形成を行うと、BD法では形成できない大きさのEBを形成できることがわかった。

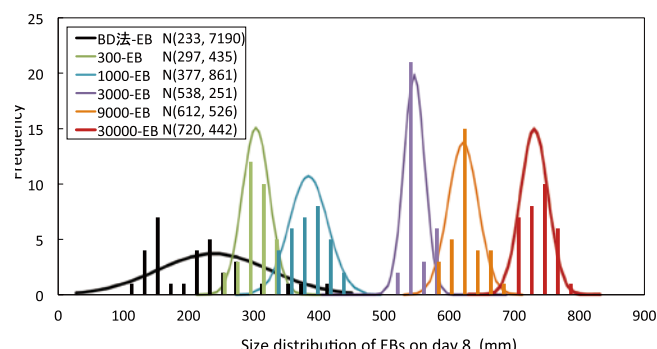


図2 BD法および96-well法によって形成した胚様体の大きさ分布
BD法-EBと96-well法により初期播種細胞数300, 1000, 3000, 9000, 30000 cells/well (300, 1000, 3000, 9000, 30000-EB)にて形成した培養8日目のEBの大きさをヒストグラムで示した。曲線はEBの大きさの正規曲線。

ヒトiPS細胞から形成したEBの顕微鏡写真および大きさの経時変化を示した(図3)。各ウェルに単一のEBが形成された。初期播種細胞数300-9000 cells/wellで形成したEBは、形成期間中に大きくなっていき、培養16日目の大きさは初期播種細胞数に依存して増大した。しかし、30000 cells/wellで形成したEBの大きさは培養4日目から16日目までの間あまり変化せず、培養16日目の大きさは9000 cells/wellで形成したものと同様であった。

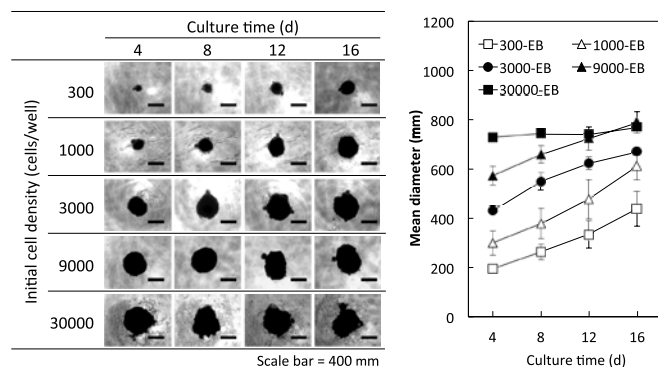


図3 96-well法による胚様体の形態的变化と大きさの推移

(4) 胚様体の大きさの違いが遺伝子発現に及ぼす影響

形成期間中のEBの未分化関連遺伝子の相対発現量を図4に示した。EB形成前のヒトiPS細胞と比較した場合、未分化関連遺伝子の発現量は初期播種細胞数の違いに関わらず経時的に減少した。しかし、その発現量には初期播種細胞数によって差が見られた。特に300-EBと30000-EBの未分化性は他の条件と比較してあまり消退しておらず、これらは分化が進みにくいEBであることが示唆された。EBの未分化性を効率的に消退させるためには、適切な初期播種細胞数の設定が必要であると考えられる。

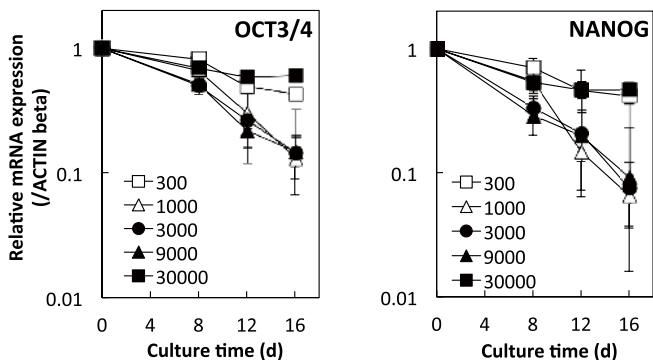


図4 初期播種細胞数が胚様体の未分化性に及ぼす影響

初期播種細胞数300(□), 1000(△), 3000(●), 9000(▲), 30000(■) cells/wellで形成したEBにおけるOCT3/4(左)およびNANOG(右)の相対発現量の推移を示した。ACTINβにより正規化し、同時に調製した分化誘導前のヒトiPS細胞により標準化。

各初期播種細胞数でのEB形成培養16日目の分化関連遺伝子、すなわち内胚葉(SOX17、AFP)、中胚葉(GATA4、T)、および外胚葉(PAX6、MAP2)の相対発現量をレーダーチャートで示した(図5)。30000-EBでは、内胚葉関連遺伝子の発現量が著しく高く、内胚葉の発生に方向づけられていることが示唆された。1000-、3000-および9000-EBでは、外胚葉関連遺伝子の発現量が他の条件よりも高かった。PAX6およびMAP2は神経関連遺伝子であるため、この3条件のEBは神経細胞の発

生に方向づけられていることが示唆された。300-EBでは他の条件と比較して全ての分化関連遺伝子の発現量が全体的に低かった。この結果は、未分化関連遺伝子(OCT3/4、NANOG)の発現量が比較的維持されていたという結果とも整合性があることから、300 cells/wellで形成したEBは分化が進みにくい状態にあるといえる。

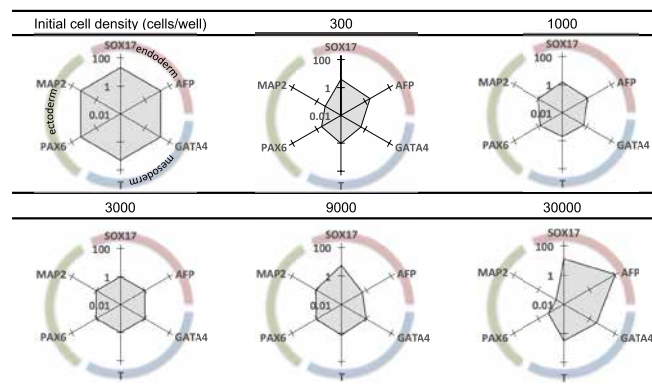


図5 初期播種細胞数がEBの分化方向性に及ぼす影響

初期播種細胞数300, 1000, 3000, 9000, 30000 cells/wellで形成したEBの培養16日目における三胚葉分化関連遺伝子、内胚葉(SOX17、AFP)、中胚葉系(GATA4、T)、外胚葉(PAX6、MAP2)の相対発現量。ACTINβにより正規化し、1000 cells/wellで形成したEBの相対発現量により標準化。

(5) まとめ

96-well法では、初期播種細胞数を規定することによってEBの大きさを制御でき、比較的均一な大きさのEBを形成することができた。EBの大きさの違いは、三胚葉分化の方向性に影響を与えた。300-EBでは、未分化性が維持される傾向があり、特定の胚葉への分化の偏りは見られなかった。一方、1000-EBから9000 cells-EBでは外胚葉への、30000-EBでは内・中胚葉への分化方向性を示した。したがって、ヒトiPS細胞の分化誘導プロセスでは、構造構築段階においてEBの大きさを制御できる96-well法が有用である。

04 | 胚様体の大きさの違いが心筋分化誘導に与える影響

(1) 概要

前項では、自然発生的に分化誘導を行うことによって胚様体の大きさが、その後のヒトiPS細胞の分化方向性に影響を与えることを明らかにした。しかし、実際の分化誘導では、様々な化合物やサイトカイン等を用いて目的細胞への分化誘導を行う。本報告では、心筋分化誘導試薬にて積極的な分化誘導を行う系において、EBの大きさの違いが心筋細胞への分化効率に及ぼす影響について検討した。

(2) 心筋細胞への分化誘導方法

ヒトiPS細胞から各種細胞への分化誘導では、フィーダー細胞非存在下に培養したヒトiPS細胞を用いるのが一般的である⁹⁾。これは、フィーダー細胞の残存による異種細胞の混入を防ぐことが目的である。本報告においてもPluriSTEM™ Human ES/iPS medium (Merck millipore社、以下PluriSTEM)による無フィーダー培養を行ったヒトiPS細胞を使用した。

分化誘導法の概要を図6に示した。Vitronectinコート上

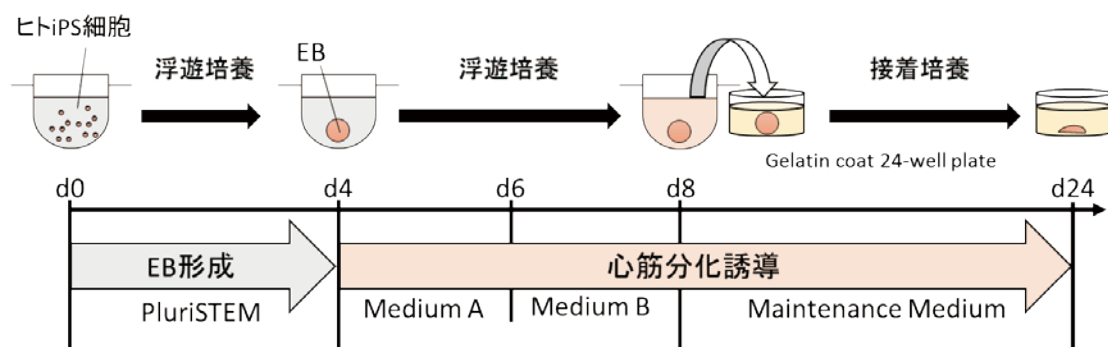


図6 ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化誘導方法

でPluriSTEMにより培養したhiPS細胞を10 μ M Y-27632 含有Accutaseにより分散した。300 $\times$ gで遠心し、10 μ M Y-27632含有PluriSTEMにて懸濁した。細胞非接着性Lipidure plate (A-U96)に300、1000、3000、9000 cells/wellにて播種し、4日間の培養によりEBを形成した。PSC cardiomyocytes differentiation kit (Thermo社、以下PSC kit) medium Aを加えたLipidure plate (A-U96)へ1個のEBを移し、2日間浮遊培養した。PSC kit medium Bを加えたLipidure plate (A-U96)へ1個のEBを移し、2日間浮遊培養した。PSC kit maintenance mediumを加えたゼラチンコートプレートへ1個のEBを移し、16日間の接着培養を行った。接着培養期間中に拍動性心筋細胞が発生したEBの割合を拍動率として算出した。培養終了後には、心筋細胞関連遺伝子の相対発現量を定量RT-PCRにより解析した。

EBの形態を評価するにあたり、本項では大きさに加えて円形度を採用した。円形度は(2)式により算出した。

$$\text{EBの円形度} = \frac{4\pi(\text{EBの投影面積})}{(\text{EBの周長})^2} \quad (2)$$

また、本項の統計解析にはEZR(自治医科大学埼玉医療センター)を使用した¹⁰⁾。このソフトはR (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)に基づいている。EZRはこのRに生物統計学で頻繁に使用される統計処理を加えたR commanderの修正版である。

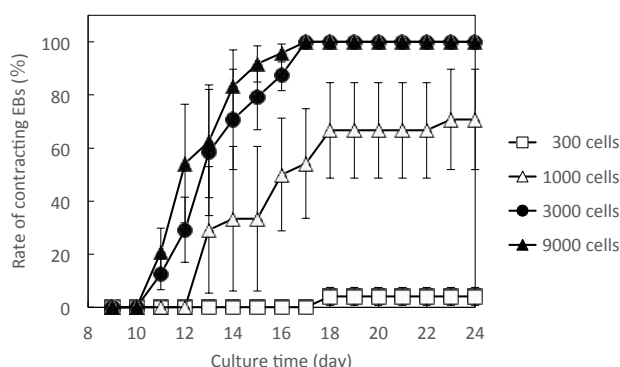


図7 心筋分化誘導時の拍動率の推移

(3) 胚様体の大きさが心筋細胞の分化に及ぼす影響

接着培養期間中に拍動が発生したEBの割合を拍動率として図7を示した。300-EBでは、心筋細胞の拍動をほとんど確認できなかった。3000-EB及び9000-EBと比較し、1000-EBは拍動率が低く、拍動が出る時期も遅かった。以上の結果より、拍動性心筋細胞の分化誘導においては、初期播種細胞数を3000 cells/well以上に設定してEB形成を行うのが望ましいといえる。

拍動性心筋細胞の発生が見られた1000、3000、9000 cells/wellで形成したEBについて、培養24日目の心筋細胞特異的遺伝子に関する遺伝子解析を行った(図8)。

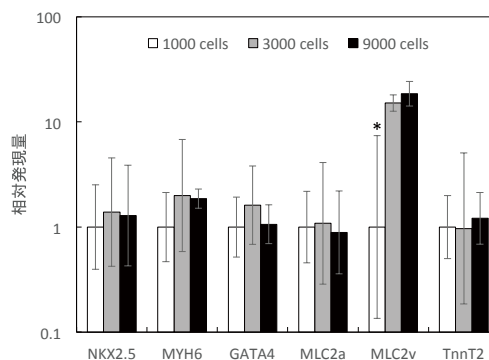


図8 初期播種細胞数が胚様体の分化方向性に及ぼす影響
初期播種細胞数1000、3000、9000 cells/wellで形成したEBの培養24日目における心筋分化関連遺伝子の相対発現量。TBPにより正規化し、1000 cells/wellで形成したEBの相対発現量により標準化。*はP<0.05。

一元分散分析およびTukey検定の結果、3000-EBと9000-EBでは、1000-EBに対してMLC2vの遺伝子発現量が有意に高かった(P<0.05)。MLC2vは成熟した心室系心筋細胞に特異的に発現するため(15)、3000及び9000 cells/wellで形成したEBは心室系心筋細胞を発生しやすいと考えられる。

以上の結果は、ヒトiPS細胞を心筋細胞などの特定の細胞へ分化誘導する場合においても、EB形成時の初期播種細胞数が分化誘導効率に影響することを強く示唆している。このことは、初期播種細胞数を規定することによってEBの大きさを制御できる96-well法が有用であることを示している。

(4) EBの円形度と拍動性心筋細胞の発生の関係

この実験では、EB形成は未分化維持を目的とした培地を使用しているため、培養4日目のEBにおいて分化が進行しているとは考えにくい。我々は、この時点でのEBの円形度に注目した。EB形成4日目の円形度と培養24日目の拍動率の関係を図式化(図9)し、これをもとに考察をした。コンクヒール-タブストラ検定による傾向解析の結果、円形度と拍動率はいずれも細胞数に対して正の相関があることが明らかとなった($P < 0.01$)。このことは、試薬による積極的な分化誘導を行う以前、すなわち構造構築直後にEBの円形度(形状)を調べれば、拍動性心筋細胞の発生確率を推測できることを示唆している。

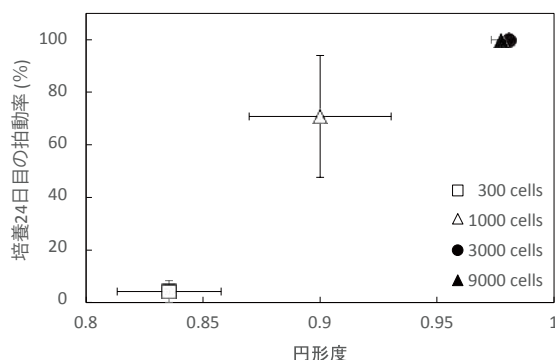


図9 胚様体の円形度と拍動率の関係

文献

- 1) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell*. **131**(5), 861-872 (2007).
- 2) E. Coucouvanis, G. R. Martin, *Cell*. **83** (2), 279-287 (1995).
- 3) M. Koike, H. Kurosawa, Y. Amano, *Cytotechnology*. **47** (1-3), 3-10 (2005).
- 4) Y. Ohnuki, H. Kurosawa, *J. Biosci. Bioeng.* **115** (5), 571-574 (2013).
- 5) K. Matsuura, M. Wada, T. Shimizu, Y. Haraguchi, F. Sato, K. Sugiyama, K. Konishi, Y. Shiba, H. Ichikawa, A. Tachibana, U. Ikeda, M. Yamato, N. Hagiwara, T. Okano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425** (2), 321-327 (2012).
- 6) K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J.B. Takahashi, Satomi Nishikawa, Shin-ichi Nishikawa, K. Muguruma, Y. Sasai, *Nat. Biotechnol.* **25** (6), 681-686 (2007).
- 7) A. Horiguchi, K. Yazaki, M. Aoyagi, Y. Ohnuki, H. Kurosawa, *J. Biosci. Bioeng.* **118** (5), 588-592 (2014).
- 8) M. Eiraku, K. Watanabe, M. Matsuo-Takasaki, M. Kawada, S. Yonemura, M. Matsumura, T. Wataya, A. Nishiyama, K. Muguruma, Y. Sasai, *Cell Stem Cell*. **3** (5), 519-532 (2008).
- 9) J. Zhang, M. Klos, G.F. Wilson, A.M. Herman, X. Lian, K.K. Raval, M.R. Barron, L. Hou, A.G. Soerens, J. Yu, S.P. Palecek, G.E. Lyons, J.A. Thomson, T.J. Herron, J. Jalife, T.J. Kamp, *Circ. Res.* **111** (9), 1125-1136 (2012).
- 10) Y. Kanda, *Bone Marrow Transplant.* **48** (3), 452-458 (2013).

05 | おわりに

細胞構造体であるEBは分化誘導の起点であり、その品質はヒトiPS細胞のその後の分化方向性を決定づける大きな要因である。しかし、これまでEBの大きさや形状といった様相ベースの品質指標についてさえ、分化誘導効率との関連性について詳しい検討は行われていなかった。

本報告では、96-well法を用いて規定の初期播種細胞数からEBを形成し、その大きさを制御することによって、その後の分化に一定の方向性を与えられることを示した。さらに、EBの円形度が拍動性心筋細胞の発生確率を予測するための指標として有効であることを見いだした。ヒトiPS細胞の分化誘導においては、そのプロセスの主要な段階において、細胞構造体の大きさや形状などの様相と、未分化性や分化方向性を反映する遺伝子発現の状態を関連づけた評価を行うことが、再現性と分化誘導効率の向上につながると考える。

本研究の実施にあたっては、山梨大学大学院矢崎こゆき氏(現ジャパンティッシュエンジニアリング)、大澤慎太郎氏、その他関係各位から多大なご助力を賜りました。この場を借りて深謝しあげます。

細胞シート工学研究の基礎と医療への発展

The foundation of cell sheet technology
and development for clinical application.

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 助教 **関谷 佐智子**

Sekiya Sachiko (Assistant Professor)

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授 **清水 達也**

Tatsuya Shimizu (Professor)

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University



キーワード

細胞シート、温度応答性培養皿、再生医療

01

はじめに

「細胞シート工学」は1990年前後から研究がスタートし、この数十年の間に小規模グループの基礎研究から、多くの様々な分野の研究者・技術者が関わり、最終的に医師による臨床応用が実現、疾病に苦しむ方々に新しい治療の技術として還元されている。その結果、論文の報告だけでなく、メディアでの紹介等が著しく増加し、2016年の現在専門家だけでなく、多くの方の耳に入る単語となっている。現在の大木のような研究技術に至るまでには、当該研究分野の開拓者の努力が根を張り、周辺の技術を改革する方々の苦労が幹を強靱にし、治療の困難な疾病に立ち向かう医師たちの強い信念が枝に実を成している。本稿は細胞シート工学の芽生えから、各方面での細胞シート工学の医療応用、さらに今後の未来医療への発展応用について紹介していく。

02

温度応答性培養皿

温度応答性培養皿は温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド、PIPAAm)をポリスチレン製の通常の細胞培養皿に固定化し、作成される。温度応答性高分子PIPAAmは32℃の相転移温度を境に、水和・脱水和変化を起こす刺激応答性高分子である。モノマーのIPAAm溶液を培養皿へ入れ、電子線照射することによって細胞培養基材の表面に重合されるのであるが、nmオーダーの薄い層として重合されるには非常に厳密な設定が必要である。このようにして作成された温度応答性培養皿は37℃の通常の細胞培養の温度では疎水性の性質を示し、細胞接着の可能な表面である。しかし、32℃以下になると親水性の性質へと変化し、細胞非接着性の表面となる。従って、細胞を37℃で培養している間は通常の細胞

培養皿と同様に細胞が接着・増殖するが、32℃以下にすると細胞を培養皿から剥離し、回収することができる¹⁾。細胞培養の際の剥離回収に用いるタンパク質分解酵素(TrypsinやDispase)を用いることなく、回収できるので、細胞の底面に存在する細胞外マトリックスおよび接着因子・細胞間接着は分解されることなく保持されて回収できる(図1)。

このような細胞の回収法の研究を開発当時東京女子医科大学に所属していた菊池・坂井らが岡野のもと確立した²⁾。この細胞脱着システムにより、温度応答性培養皿にコンフルエントまで37℃にて細胞を培養し、その後32℃以下に温度を低下させるだけで、細胞が細胞間接着を維持したまま、2次元のシート状に回収されることになる。研究当初、温度応答性培養皿は少数を手作業で試行錯誤して作製し、最適化が検討された。現在ではセルシード社がUpCell®として大量に作製・販売を行っている(<http://www.cellseed.com/product/upcell/>)。現在までに様々な細胞が培養され、細胞シートとしての回収が可能となっている。また、継代培養に際して、トリプシン等のタンパク質分解酵素による細胞の性質の変化を避けるために温度応答性培養皿を用いることも可能であり、これまでに様々な研究者によって使用されている。

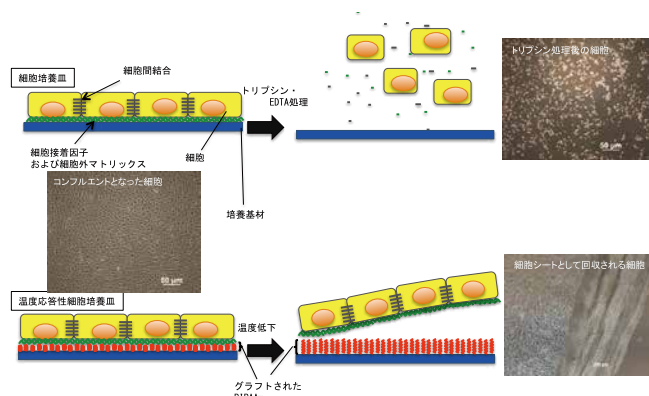


図1 温度応答性培養皿での細胞シート回収

03-1 | 組織工学

温度応答性培養皿を用いて、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、また、平滑筋細胞、自律拍動する心筋細胞など様々な細胞がこれまでに培養され、シート化されている。細胞によっては、シート化するにあたり、培地のコンディションの調製、培養期間、播種密度をコントロールする必要がある。温度応答性培養皿のため、観察を長く室温で行うと観察行為が細胞剥離を起こす原因になるために長期に観察したい場合は、37℃で保温した状態での観察が必要な場合もある。こうして作成される細胞シートは前述したように細胞間接着であるタイトジャンクションやギャップジャンクションが保持されており、またシート底面に接着因子や細胞自身が分泌した細胞外基質が維持されている。従って細胞シートは移植の際、すぐに底面が移植先へ接着し、縫合の必要がない。この性質は、細胞シートと細胞シートを積層化することで、3次元方向に厚みをもつ組織構築の加工を可能にしている。

03-2 | 細胞シートを利用した3次元心筋組織の構築

温度応答性培養皿を用いた様々な研究がある中、東京女子医科大学の清水らはまず初代培養した新生児ラット心室筋細胞を用いて、2次元の心筋組織を作製した。心筋細胞はそれまで、個々の拍動などが各々の細胞レベルで解析されていたが、隣り合う細胞の接着が続いた細胞シートの状態での解析は研究開発当時他に類を見なかった。心筋細胞シートは自律拍動を行い、肉眼でもフィブリンゲル上に積層化することで肉眼でも拍動が観察でき、また拍動のリズムの異なる2枚の細胞シートを積層化させると、細胞間で情報を受け渡す役割をもつギャップジャンクションがシート間にも作製され、2枚のシートが同期して拍動を行うようになることが明らかにされた。さらに清水らは厚みを増すために数枚を積層化した心筋シートを移植するが、生体内ではあまり厚みのあるものを一気に移植すると血管新生が間に合わずに移植組織の壊死を起こし、厚みのある組織が作製できなかった。そこで、まず血管のソースとするべく、血管内皮細胞や線維芽細胞を含む心筋シートを作製し、培養期間中に血管内皮細胞の網状構造をもつ細胞シートを作製、これを3枚積層化して移植すると移植後素早く宿主血管とシート内部の新生血管が連絡し血流を作れることが明らかになった。そこで、血流が生じたところで再び3枚の積層化心筋シートを移植するという繰り返し移植を行うことで厚みのある組織を生体内で作成することに成功している。さらには、生体外にて、3次元組織を構築するバイオリアクターを開発、厚みのある心筋組織をヒトiPS細胞より分化誘導した心筋細胞を用いることで、作製可能となっている³⁾。一方で、このような心筋シートをチューブ状に成形し、拍動保持する培養も行っており、今後臨床応用に向けた本格的組織再生が期待されている。

04 | 細胞シートのマニピュレーション技術

細胞シートは一枚を移動する際の操作は、浸水している薄い紙の状態を想像して頂けるとわかりやすいが、鋭利なものなどに脆弱なため難易度が高い。以前はPVDF膜やニトロセルロース膜などでの回収も試みられていたが、現在では、CellShifter™(セルシード社)という回収支持体が販売もされ、簡便になっている。また、フィブリンゲル等を支持体として、スタンプのように細胞シートを保持・回収移動できるデバイスも開発されている(図2)。

支持体としてゼラチンゲルを用いることにより、再びゼラチンゲルを溶解させることで移植後にシートのみにもすることも可能になる。スタンプは手動で行える他、自動で数枚積層化できる自動積層化装置の開発も行われている⁴⁾。また、大阪大学工学部と東京女子医科大学の共同研究にて細胞シートを瞬時に回収して別の部位へ移動させる回収装置⁵⁾も開発されており、工学系の科学者との交流により、医学、生物学のみでは実現できなかった高い水準のマニピュレーション技術が完成している。このような周辺機器の発展は、汎用性を向上させ、より一般的な治療への近道となる非常に重要な研究となっている。

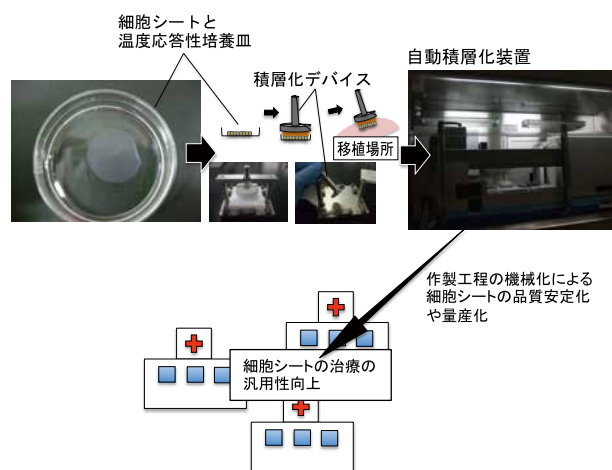


図2 細胞シートとマニピュレーション技術の例とその必要性

05 | 角膜再生臨床試験

眼の構造の中で、角膜は眼球を外部から保護する役割と光の屈折をおこし、視覚情報を網膜に結像させる役割を持つ。角膜は個人差があるが、およそ厚み500μm程度である。角膜の構造は角膜上皮、角膜実質、および角膜内皮によって構成されている。最外部の角膜上皮は角膜周辺の輪部上皮の基底細胞が幹細胞となり新しく細胞が産生され、2週間毎に新しく作られている。そのため、輪部の上皮細胞が熱傷や、アルカリや酸による腐食、Stevens-Jonson症候群、眼類天疱瘡などが原因で消失すると角膜上皮が血管を含む結膜に置き換わり、角膜混濁により視力が失われる。これまではアイバンクによる角膜組織の同種他家移植が行われてきたが免疫拒絶により、治療効果が得られにくいことが課題だった。患者本人の細胞から角膜上皮が再生され、移植可能になることが理想的であるが、タンパク分解酵素を用いない限り、培養皿からの回収が難しかった。このような問題点を克服するために、東京女子医科大学の大和ら、ま

た大阪大学・眼科・西田らは温度応答性培養皿を用いた角膜上皮シートの開発を行い、角膜再生治療の臨床応用を目指した研究を行った⁶⁾。輪部より角膜上皮幹細胞を回収できる場合はこれを用い、難しい場合は口腔粘膜上皮細胞を用いて細胞シートを作製し、角膜上皮疾患部位への移植を行ったところ、患者視力の回復・維持といった良好な成績が得られている。現在では、大阪大学にてiPS細胞より誘導した角膜上皮、内皮細胞による細胞シートでの再生医療の開発が取り組まれている。

06 | 心筋再生臨床試験

本邦において、平成21年に臓器移植法が改正され、臓器提供の増加に伴い、移植数が増加し、また補助人工心臓の開発も発展しているが、合併症の課題があり、次世代のよりよい治療法の開発が望まれている。移植を必要とするような重症心不全治療として、近年再生医療が注目されている。2008年に発表された欧州における骨格筋由来細胞のdirect needle injection法での移植臨床試験が大規模に行われたが、プラセボに対して有効性が認められず、早期終了されている。このような中、前述したように東京女子医科大学では清水らによって、心筋細胞を用いた細胞シートが作成され、3次元組織構築研究が行われていた。一方で大阪大学・澤らはinjection法による細胞移植の効率の悪さに頭を悩ませていた。清水の人工臓器学会での講演を目にした澤教授はこの細胞シート工学の細胞移植効率の高さに着目し、injection法ではなく、骨格筋芽細胞を細胞シートとして重症心不全患者に移植し、治療効果を確認することに挑戦をした。その結果、移植細胞シートによるリモデリング抑制と、心機能の有意な改善効果を得ることができた。治療効果のメカニズムは移植した細胞シートによる心筋内のサイトカイン発現上昇、また再生に関わると考えられる幹細胞によく見られる因子を発現した細胞の集積が確認されている。従って、移植細胞が移植部位で心筋になるのではなく、移植細胞により、サイトカイン分泌が促進され、これにより心臓内で再生に関わる細胞が誘引され、心機能が改善すると考えられている。このような基礎研究を経て、自己骨格筋芽細胞シート移植治療を人工心臓の要する末期的拡張型心筋症へ臨床応用する試験を行ったところ、人工心臓を外し、退院するまで回復がみられた⁷⁾。現在は虚血性心筋症への移植も行い、本治療法はテルモ社より「ハートシート」という名称により販売承認を獲得、保険適用の治療へと発展している(<https://www.terumo.co.jp/pressrelease/detail/20150918/196>)。現在は、より多くの患者へ治療を行えるように治験が行われている。

07.1 | 食道狭窄予防治療・臨床試験

現在、食道がんの早期、まだ粘膜下層に癌がとどまっている状態ならば、内視鏡にて粘膜下層を剥離する治療(Endoscopic submucosal dissection:ESD)が広く行われている。しかしながら、粘膜下層切除によって生じる潰瘍が治癒する際に食道の狭窄を起こし、食物通過障害や摂食障害が生じる。そのため、従来バルーン拡張術による治療を行わなくてはならず、患者にとって大きな負担となっていた。このような狭窄

の予防に頭を悩ます中、東京女子医科大学の大木医師は大和らのもと、眼科領域での細胞シートの治療効果からヒントを得て、食道ESD後の自己口腔粘膜シート移植による狭窄予防効果を検討した。食道上皮細胞も口腔粘膜上皮細胞も同じ扁平上皮細胞であり、非常に的を射た検討であった。大型動物での検討を行った結果、経内視鏡的細胞シートの移植に成功し、また、FBSを用いない培養法としてセルカルチャーインサートによる口腔粘膜上皮細胞シートの作製にも成功し、臨床試験へと進んでいった^{8),9)}。2011年までに10例が終了、良好な成績が得られている。

07.2 | 細胞シート・デリバリー

細胞シートを成す細胞は、患者もしくはボランティア由来であり、また体内に戻すために、細胞シートの作製工程は医薬品の製造管理および品質管理規則(Good Manufacturing Practice: GMP)を遵守したものが要求される。これは、安全性などの患者保護のための医薬品の臨床試験の実施に関する基準(Good Clinical Practice: GCP)に基づいた規制である。このGCPおよびGMP遵守のためには、細胞シートの作製をCell processing center (CPC)にて行う必要がある。このCPCは空調、温度、機器等が高度に管理された細胞培養施設であり、必ず2名で入室、作業者と記録者が必要で、取り違えを排除するため一区域1検体しか培養できず、細かく厳密な管理が要求される。そのためCPCが無い施設の場合は細胞シートを用いた治療が難しくなるという問題がある。そこで、CPCが無くても細胞シートの移植治療可能なことを実証することも含め、東京女子医科大学のCPCを用いて作製した患者由来口腔粘膜細胞シートを、遠隔地の長崎大学にて食道ESDを受けた患者へ狭窄予防のための移植治療をしようという臨床試験が東京女子医科大学と長崎大学・医学部、移植・消化器外科の江口らによって遂行された。患者由来組織を空輸で東京へ輸送し、その後およそ2週間かけ、細胞シートが作成され、長崎に再び空輸され、厳密な品質と安全性試験をクリアした結果、無事患者へ移植された。10例の臨床研究を終え、好成績が得られており、離島での治療などへの今後の展望が開ける結果となっている。

08 | 歯周組織再生臨床試験

歯周病は歯周組織に発症する疾患の総称で細菌によって生じる炎症疾患である。可逆的な病態であり、自己での適切な管理と専門のメンテナンスにて改善可能であるが、放置して病態が進行すると歯の周囲組織が破壊され、歯が喪失されてしまい、さらに細菌が血中、呼吸器へ侵入すると心筋梗塞や肺炎を引き起こすなど、全身性の病気にも関わる。現状、破壊された歯周組織を再生させるために、人工膜や、エナメルマトリックス蛋白の応用などが検討されているが、歯周組織の破壊が著しく進行している場合には既存の治療では再生が難しい。そこで、東京女子医科大学の石川・岩田らは歯周組織のなかの歯根膜から細胞を採取、歯根膜細胞シートを作成し、歯周欠損患者へ移植、歯周組織再生の臨床研究を行った¹⁰⁾。2000年前後に基礎研究をスタートし、十分に小動物、大型動物などで試験を重ね、

有効性が得られた末、患者由来細胞を用いて安全性、品質の安定化試験を重ね、2011年～2014年で患者10例への臨床試験が終了している。

09 | 軟骨再生臨床試験

人体にはおよそ350箇所の関節が存在し、骨と骨の間を緩衝する軟骨が関節部で骨を被膜している。外傷などでも軟骨が損なわれることがあるが、老化などで誰しも関節軟骨は疲弊し、特に変形性膝関節症は非常に多くの患者が存在する。従来の治療法としては、ステロイドの注射、ヒアルロン酸の注入、人工関節などが挙げられる。しかし、近年の再生医療の発展により、不可能だと考えられてきた軟骨の再生が現在可能になりつつある。日本においては、滑膜由来幹細胞を用いた3次元軟骨組織の移植(大阪大学)、また骨髄由来幹細胞を用いたコラーゲンを支持体にした移植(信州大学)、そして、細胞シート工学を応用した、滑膜細胞との共培養軟骨細胞シートの移植(東海大学)が軟骨再生の臨床応用として行われているが、変性膝関節軟骨損傷への適用が認められているのは軟骨細胞シートの移植治療のみである。患部へ移植された積層化自己軟骨細胞シートは様々なサイトカインを発現することで組織修復再生効果を示す¹¹⁾。臨床試験を終え、良好な成績を収めており、今後は先進医療として申請を準備している(<http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/project.html>)。将来的には、さらに多くの患者を対象として速やかに治療を行うために、同種他家移植の可能性を考えている。骨、軟骨は同種組織移植にて免疫抑制剤の必要のない希少な組織であり、一般化すれば多くの患者のQOLを向上させる優れた治療法となることが期待されている。

10 | 中耳閉塞予防治療・臨床試験

聴覚は外耳から入って鼓膜が振動され、中耳に入った振動が耳小骨を振動、内耳の蝸牛にてシグナルとなり、脳に伝達される。一連の流れの中で、中耳が重要な役割を担っており、難治性中耳炎である中耳真珠腫や癒着性中耳炎などは聴力の著しい低下を招くため、鼓室形成術という手術を行い、真珠腫や癒着を改善し、中耳環境を整える必要がある。しかし、多くは粘膜再生が上手くいかず、再発することが懸念され、新しい治療法が望まれていた。そこで、慈恵医大の濱らは食道再生研究の上皮細胞シートから着想し、鼻粘膜細胞シートを用いて中耳腔粘膜の再建を行い、新しい難治性中耳炎治療法の開発を試みている¹²⁾。特に中耳粘膜は狭い領域に骨に隣接しているため、薄く、かつ縫合なしに接着する細胞シートは非常に適している。また、微絨毛を有する粘膜上皮細胞は機能的にも癒着や真珠腫再発防止に大きく貢献することが期待され、臨床応用が開始されている。

11 | 今後の臨床に向けた検討

現在、東京女子医科大学の呼吸器外科・神崎らによって、肺がん切除後の気漏予防を目的とした自己線維芽細胞シート移

植臨床研究がまさに行われようとしている。肺がんなどで肺が切除された場合、切除部位が塞がなければ肺機能が著しく低下する。そのために以前から癒着を促進させるような施術が行われていたが、一時的な肺機能の保持には有効であっても、肺の自由な駆動が癒着によって制限されてしまうために、いずれまた肺機能が低下するおそれがある。また、がん再発時に癒着が発生している場合は癒着剥離に時間を要し、手術時間の延長などが懸念される。そこで、次世代に向けた癒着なしの気漏防止による早期肺機能保持を目指したのが細胞シートの切除部位への移植である¹³⁾。細胞シートはその性質により縫合なしに術後素早く生着できる。また、移植した細胞シートは肺の伸展収縮に非常によく適合する。今後、臨床研究が行われ、その効果が得られることに期待が寄せられている。

その他にも現在までに、動物実験レベルにて細胞シートを用いた様々な組織の再生が検討されてきた。肝臓再生においては、小動物体内にて細胞シートより分泌するアルブミンが確認されており¹⁴⁾、また、膵島細胞シートでは、長期的なインシュリン分泌による糖尿病モデルでの高血糖状態の抑制結果が得られている¹⁵⁾。分泌物による治療効果としては、血友病モデル動物に対して、欠損遺伝子を導入した細胞シートを移植することにより、病態改善を行う研究も行われている¹⁶⁾。さらに、甲状腺細胞シートを用いた甲状腺切除モデルでの甲状腺ホルモン分泌の確認が行われ、甲状腺摘出手術後の甲状腺再生治療法開発に繋がる研究が行われている。今後、細胞ソースがiPS細胞由来などのヒト細胞になるとさらに臨床応用への道が拓けると期待される。また、腎臓に関しては、増え続ける末期腎不全患者の治療法開発として、透析治療を要する前に、腎機能・腎構造保持を目指した腎への直接的治療法開発が細胞移植法を用いて検討されている。このような背景の中、東京女子医科大学の腎臓内科では、HGF分泌細胞シートを水腎症・線維化モデルへ移植、腎臓構造崩壊の著しい抑制効果を得ており、今後は細胞ソース選択を行い、臨床応用への発展が期待されている。最新の組織構造の再生研究としては、子宮内膜の重度障害における子宮内膜再生不全による不妊症を想定した子宮内膜再生研究が行われており、動物実験レベルではあるが、再生した子宮内膜での自然妊娠の成立が示唆される結果が得られており、今後の不妊症治療への可能性が期待されている¹⁷⁾。このような基礎研究は主に医師になって間もない若い大学院生が発信源になっており、今後も再生医療を発展させてくれることを期待したい。

12 | おわりに

温度応答性培養皿から始まり、細胞ソースの選定、対象疾患の設定また、移植に際するマニピュレーションおよび輸送のデバイスなど、化学、生物学、理学、医学、薬学、工学の知識が集学した細胞シート工学は今後さらに進化・発展を遂げていくであろう。基材を加工する技術の発展により、より細胞を形態および機能的に制御する技術も開発されており¹⁸⁾、今後の成果が期待されている。

参考文献

- 1) N Yamada, T Okano, H Sakai, F Karikusa, Y Sawasaki, Y Sakurai. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem Rapid Commun* **11**, 571-576 (1990).
- 2) A. Kikuchi, M. Okuhara, F. Karikusa, Y. Sakurai, T. Okano, Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* **9**, 1331-1348 (1998).
- 3) H. Sekine, T. Shimizu, K. Sakaguchi, I. Dobashi, M. Wada, M. Yamato, E. Kobayashi, M. Umezu, T. Okano, In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun* **4**, 1399 (2013).
- 4) T. Kikuchi, T. Shimizu, M. Wada, M. Yamato, T. Okano, Automatic fabrication of 3-dimensional tissues using cell sheet manipulator technique. *Biomaterials* **35**, 2428-2435 (2014).
- 5) K. Tadakuma, N. Tanaka, Y. Haraguchi, M. Higashimori, M. Kaneko, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, A device for the rapid transfer/transplantation of living cell sheets with the absence of cell damage. *Biomaterials* **34**, 9018-9025 (2013).
- 6) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, Y. Tano, Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **351**, 1187-1196 (2004).
- 7) Y. Sawa, Y. Yoshikawa, K. Toda, S. Fukushima, K. Yamazaki, M. Ono, Y. Sakata, N. Hagiwara, K. Kinugawa, S. Miyagawa, Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure Due to Ischemic Heart Disease. *Circ J* **79**, 991-999 (2015).
- 8) T. Ohki, M. Yamato, D. Murakami, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki, T. Okano, K. Takasaki, Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* **55**, 1704-1710 (2006).
- 9) T. Ohki, M. Yamato, M. Ota, R. Takagi, D. Murakami, M. Kondo, R. Sasaki, H. Namiki, T. Okano, M. Yamamoto, Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* **143**, 582-588 e581-582 (2012).
- 10) T. Iwata, M. Yamato, H. Tsuchioka, R. Takagi, S. Mukobata, K. Washio, T. Okano, I. Ishikawa, Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials* **30**, 2716-2723 (2009).
- 11) 佐藤正人, セルシートエンジニアリング, 関節軟骨再生. 最新医学 69(7月増刊号), 144-153 (2014).
- 12) T. Hama, K. Yamamoto, Y. Yaguchi, D. Murakami, H. Sasaki, M. Yamato, T. Okano, H. Kojima, Autologous human nasal epithelial cell sheet using temperature-responsive culture insert for transplantation after middle ear surgery. *J Tissue Eng Regen Med*, (2015).
- 13) M. Kanzaki, M. Yamato, J. Yang, H. Sekine, R. Takagi, T. Isaka, T. Okano, T. Onuki, Functional closure of visceral pleural defects by autologous tissue engineered cell sheets. *Eur J Cardiothorac Surg* **34**, 864-869 (2008).
- 14) K. Ohashi, T. Yokoyama, M. Yamato, H. Kuge, H. Kanehiro, M. Tsutsumi, T. Amanuma, H. Iwata, J. Yang, T. Okano, Y. Nakajima, Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* **13**, 880-885 (2007).
- 15) T. Saito, K. Ohashi, R. Utoh, H. Shimizu, K. Ise, H. Suzuki, M. Yamato, T. Okano, M. Gotoh, Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation* **92**, 1231-1236 (2011).
- 16) K. Tatsumi, M. Sugimoto, D. Lillicrap, M. Shima, K. Ohashi, T. Okano, H. Matsui, A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A. *PLoS One* **8**, e83280 (2013).
- 17) G. Kuramoto, S. Takagi, K. Ishitani, T. Shimizu, T. Okano, H. Matsui, Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intrauterine adhesions. *Hum Reprod* **30**, 406-416 (2015).
- 18) H Takahashi, T Shimizu, M Nakayama, T Okano. Anisotropic cellular network formation in engineered muscle tissue through the self-organization of neurons and endothelial cells. *Adv Healthc Mater* **4**, 356-360 (2015).

ad-MEDビトリゲル®とその創薬、 化学物質安全性試験への応用

ad-MED vitrigel® for the application
in drug development and alternative method of animal experiments

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 **山口 宏之**

Hiroyuki Yamaguchi

Isehara Research Laboratory, Technology and Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.



キーワード

ビトリゲル®、足場材料、動物実験代替法

1

はじめに

コラーゲンビトリゲル®は国立研究開発法人 農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)の竹澤らが開発した、生体内の結合組織に匹敵する高密度のコラーゲン線維で構成された素材であり、ピンセットなどで容易に取り扱える強度を持ち、透明性に優れ、また高分子タンパク質を含む物質透過性に優れるといった特徴がある^{1),2)}。本稿では、このコラーゲンビトリゲル®膜の特徴を生かした細胞培養用インサート「ad-MEDビトリゲル®」およびその関連製品の特長とその応用研究について概説する。

2

コラーゲンビトリゲル®の特徴

水を大量に含むハイドロゲルを温度、湿度をコントロールしながら徐々に乾燥させて、自由水だけでなく結合水も除去した後、再水和すると透明性に優れた物性に変換される。この乾燥工程はガラス化(vitrification)と呼ばれ、このガラス化工程を経て作製したゲルが新しい学術用語「ビトリゲル®(vitrigel®)」と定義されている¹⁾。ビトリゲル®は様々なハイドロゲルから作製できるが、このうちコラーゲンゲルから作製したものをコラーゲンビトリゲル®と呼ぶ。

コラーゲンを原料とした医療器具や細胞培養用担体に用いられる素材は従来から存在するが、それらは透明ではなく白色である。そのため医療器具として用いた場合、患部の観察が難しかった。また、細胞培養用担体として用いた場合は、光学顕微鏡による観察が困難であった。さらに、それらの素材自体の強度が低いため、プラスチック等の裏打ち材や、化学物質による架橋を必要とした。それに対し

て、コラーゲンビトリゲル®は架橋剤等を含まない純粋なコラーゲン線維でありながら、透明であり患部や細胞の観察が容易である。またピンセットでつまみあげたり引っ張ったり、折り曲げたりしても破れない強度を持つ。さらに、任意の形状(膜、糸、管等)に加工でき、乾燥状態で常温保存が可能である。このような性質を生かして、化学物質の動態・毒性の解析に有用な培養モデルの構築、欠損組織を修復する生体適合性素材、細胞移植用担体、ドラッグデリバリーシステム等としての応用が進められている³⁾。

3

ad-MEDビトリゲル®および その関連製品の開発

3.1. ad-MEDビトリゲル®

ad-MEDビトリゲル®はウシ由来I型コラーゲンを原料として作製したコラーゲンビトリゲル®膜を、円筒形の容器の底面に貼りつけた細胞培養用インサートである(図1)。



図1 ad-MEDビトリゲル

インサートとは、培地などを透過する膜を底面に貼りつけたカップ状の容器であり、マルチウェルプレート内に設置した状態で細胞をインサート内に播種して使用する。ad-MEDビトリゲル®で使用しているコラーゲンビトリゲル®膜は、従来のインサートで使われているプラスチック製フィルムや不織布等と比べ細胞が迅速に接着・伸展する。また、膜

の透明性が高く、自家蛍光が低いことから位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で鮮明な観察像を取得することが可能である。

通常の培養皿で細胞を培養した場合、細胞の下面はプラスチックなどの固相に接触しており、培地の栄養成分や酸素は細胞の上方からのみ供給される。一方、ad-MEDビトリゲル®で培養した場合は、コラーゲンビトリゲル®膜が高分子タンパク質を含む培地の栄養成分や酸素を透過するため、細胞の上方だけでなく、膜を介した下方も培養液と接触（液相-液相）させて、上下両方向から栄養成分等を供給することができる。さらに、ad-MEDビトリゲル®ではインサート内外に入れた培地を保持できることから、インサート内外に異なる組成の培地を入れる、インサート内外のどちらか一方にのみ培地を入れ、もう一方は空気に晒す（気相-液相）といった培養を行うこともできる（図2）。

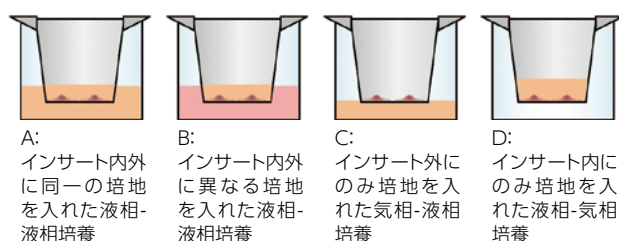


図2 ad-MEDビトリゲルを用いた培養方法

例えば、皮膚や角膜の上皮細胞をad-MEDビトリゲル®内に播種し、インサート外にのみ培地を入れ、細胞の上方を空気に晒した気相-液相界面培養を行うと、生体と同様の多層化した上皮細胞層を形成される。このように、ad-MEDビトリゲル®は天然の組織・器官を再現した高度な培養モデルの構築に適している⁴⁾。

従来のad-MEDビトリゲル®はコラーゲンビトリゲル®膜が培地で膨潤すると、インサート底面に弛みを生じるため、接着性の弱い一部の細胞では、播種した細胞が中心部に偏ってしまう傾向が見られた。最近、弛みを低減した改良品「ad-MEDビトリゲル®2」を開発した。ad-MEDビトリゲル®2では従来品で接着性が弱い細胞も、迅速に接着、伸展し、細胞の偏りが無い均一な細胞層を形成することなく作

製できる（図3）。

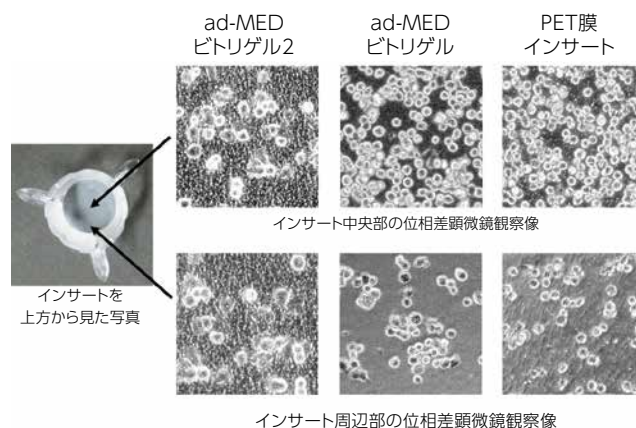


図3 インサート内に播種したHepG2細胞の分布

3.2. オプションリング

生体内では、ある細胞が分泌した物質がその近傍にある別の細胞に作用し、その細胞を活性化する現象（パラクライン効果）が様々な場面でみられる。例えば、皮膚の表皮角化細胞や繊維芽細胞が分泌した神経成長因子（nerve growth factor, NGF）が神経細胞の神経突起伸長を誘導することが知られている⁵⁾。このパラクライン効果を*in vitro*で再現するため、インサート内で2種類の細胞を同時に培養すること（共培養）が行われてきた。しかし、インサートを用いた一般的な共培養では、一方の細胞をインサート内、もう一方の細胞をマルチウェルプレートのウェル底面で培養する。そのため、細胞同士が離れており、パラクライン効果が現われにくい場合がある。そこで、ad-MEDビトリゲル®の底面に細胞を播種するためのリング状の部品「オプションリング」を開発した。ad-MEDビトリゲル®にオプションリングを装着し、リングを装着した側が上方になるようにad-MEDビトリゲル®を設置してリング内に細胞を播種する。そして細胞が接着したらリングを取り外し、ad-MEDビトリゲル®をひっくり返して、マルチウェルプレートに設置し、インサート内部に細胞を播種する（図4）。この操作によってコラーゲンビトリゲル®膜の両面に細胞を播種することが可能になる。一例としてL929細胞が産生するNGF

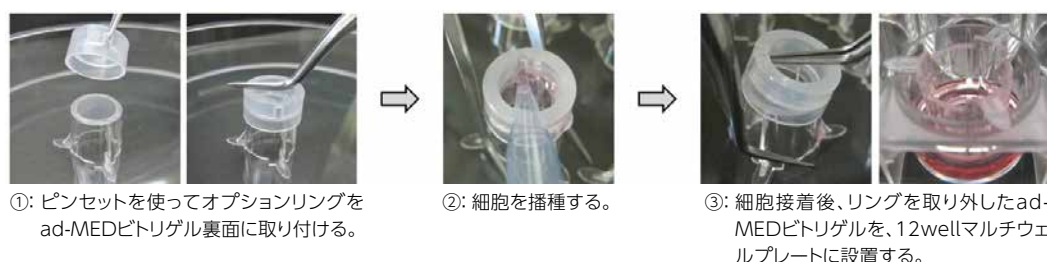


図4 オプションリングの使用手順

でPC-12細胞の神経突起伸長を誘導する実験系を示す。従来法である、インサート内にPC-12細胞、マルチウェルプレートの底面にL929細胞を培養した系(底面培養)と比べ、オプションリングを用いて、ad-MEDビトリゲル®のコラーゲンビトリゲル®膜の一方の面にPC-12細胞、もう一方の面にL929を培養した系(両面培養)の方が、神経突起伸長が促進されることが認められた(図5)。

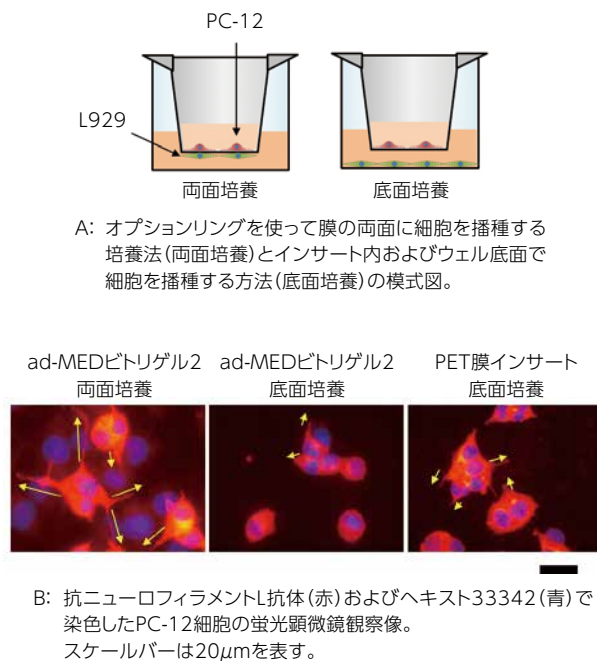


図5 L929細胞とPC-12細胞の共培養

3.3. TEER測定装置

皮膚、角膜、腸、気管、血液等、生体で面を形成している部分では上皮細胞が層状構造を形成し、また、細胞間に密着結合(tight junction)を形成することによって外部から物質の流入を制御している。この仕組みを上皮のバリア機能といい、このバリア機能の評価には経上皮電気抵抗(trans epithelial electrical resistance, TEER)の測定が広く用いられている^{6), 7), 8)}。TEER値は組織毎に異なり、例えば強固なバリア機能を持つ皮膚では $1000\Omega\cdot\text{cm}^2$ 以上、バリア機能が比較的弱い物質透過性の高い血管内皮では $10\sim 20\Omega\cdot\text{cm}^2$ である。TEER値の測定は、細胞を培養したインサート内外の培地中に測定用の電極を挿入することで行う。その際、電極の位置がわずかでもずれるとTEER値が変動し正確な値が測定できない。そこでad-MEDビトリゲル®にしっかり固定できる専用の電極と、応答速度の速い抵抗計を組み合わせたTEER測定装置を新たに開発した(図6)。この電極をad-MEDビトリゲル®組み合わせて使用することで微細なTEER値の変化を正確に測定することが可能である。



図6 TEER測定装置

4

ad-MEDビトリゲル®の 創薬・動物実験代替法への応用

医薬品や化粧品の原料として使われる化学物質の効能および安全性は、従来、実験動物にそれらの物質を投与して動物の反応を観察することで試験されてきた。しかし、近年、動物実験に対する倫理的な問題に注目が集まり、また、それらの物質が動物に及ぼす作用が、必ずしもヒトに及ぼすそれと一致しないことが明らかになってきている。それを受けて、EUではいち早く2009年から動物実験を行った原料を使った化粧品の販売を禁止し、動物の代わりに培養細胞や微生物などを使う試験法(動物実験代替法)への置換を進めている⁹⁾。また、国内でも大手化粧品メーカーが原料の試験に動物実験を行わないことを表明しており、また、医薬品メーカーも動物実験の削減と動物実験代替法の導入を進めている。このように、世界的に動物実験を代替法に置き換えていこうという動きがある一方で、現在でも、化粧品の試験に利用できる動物実験代替法は皮膚刺激性試験、光毒性試験、眼刺激性試験など一部の試験に限られており、医薬品・医薬部外品に利用できる試験法はさらに少なく、承認申請を動物実験無しでは行うことができない。このように動物実験代替法の開発が進まない原因として、一つはヒトの体内で化学物質の動態に関する組織や器官を構成する細胞と同等の機能を持つ培養細胞が入手困難であったことが挙げられる。そして二つ目の原因としては、その細胞を適切に配置してその機能を発現させるための足場材料がなかったことである。一つ目の課題である細胞に関して、従来の細胞ソースとしては、無限増殖能を持った単一クローンである株化細胞や、ヒトから採取してきた初代細胞が主に用いられてきた。しかし、前者は不死化していることで、生体内にある正常な細胞とは機能が大きく異なることが問題であった。また、後者は、採取できる細胞数が限られる、細胞の純度が低い場合がある、ドナーの個体間差によって実験再現性が低下するといった問題があった。一つの光明となったのが山中らによるヒトiPS細胞の発見である¹⁰⁾。ヒトiPS細胞を様々な薬剤で処理し分化を促すことで、心筋、肝臓、小腸など様々なヒト由来細胞を誘導することができる。また、患者由来のiPS細胞を用い

ること、疾患特異的な性質をもつ体細胞が得られることから、創薬への応用に関して研究が進められている。一方、二つ目の課題に関しては、生体内において、多くの細胞は単独で機能しているわけではなく、同一種類の細胞が規則的に配列した「組織」や、2種類以上の細胞が複合した「器官」を形成し、近傍に存在する細胞同士が相互作用することで機能を発現している。また、組織や器官において、細胞は一定の方向性(極性)を保って存在している。例えば、生体が外界と接する部分を覆っている上皮細胞は、密着結合(tight junction)・接着結合(adherens junction)・接着斑(desmosome)からなる接着複合体(apical junction complex)で区分された、頂端側(apical)と側底側(basolateral)という極性を持っている。細胞がこの極性に従って、物質の吸収・輸送・代謝・分泌を行うことが、組織・器官の機能を発現させるうえで非常に重要である。この細胞の極性を規定するのは細胞外マトリクス、血液、空気など細胞の周囲環境であると言われている。ad-MEDビトリゲル®を用いて、気相-液相界面培養、液相-液相界面培養など細胞の周囲環境を適切に維持した培養を行うことで、創薬や安全性試験に有用な極性を持った培養モデルを構築できると考えている。その一例として、角膜上皮モデルを用いた眼刺激性試験法、および、肝代謝毒性試験用モデルの構築について説明する。

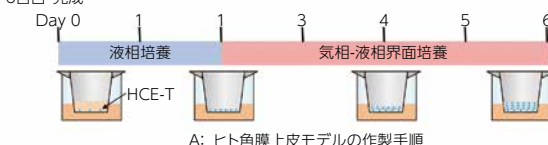
4.1. 眼刺激性試験法

眼刺激性試験とは、化学物質が眼に付着することによって惹起される傷害の重篤さを評価するための試験法である。従来はウサギの眼に被験物質を滴下し、障害の程度を観察する動物実験(ドレイズ試験)によって行われてきたが、近年の動物実験削減の流れを受け、ウサギの代わりに食肉用のウシやニワトリから摘出した眼球、培養細胞、3次元培養モデルなどをを用いた動物実験代替法¹⁾が開発されている。しかし、眼刺激性試験は主に化学物質の安全性を確認する目的で使用されるため、偽陰性の少ない高感度な試験法が求められている。

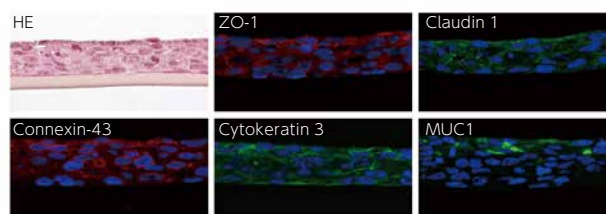
そこで着目したのが角膜上皮のバリア機能である。眼刺激性の化学物質が眼に触れると、最初に上皮バリア機能が破壊され、次いで、化学物質が角膜内部に侵入し、角膜上皮細胞死や角膜実質の浮腫などのより重篤な障害を引き起こす。そのため、上皮バリア機能は化学物質による眼刺激性の早期マーカーとして知られている¹²⁾。そこで、ad-MEDビトリゲル®内で角膜上皮由来の細胞を培養することによって、ウサギの眼の代わりとなる、上皮バリア機能を持つ角膜上皮モデルを構築した。そのモデルに化学物質が触れた際のTEER値の変化を測定することで、化学物質の上皮バリア機能への障害の有無を判定する新しい眼刺激性試験法

「Vitrigel®-Eye Irritancy Test(EIT)法」が開発された^{13), 14)}。ad-MEDビトリゲル®内にヒト角膜上皮由来の株化細胞であるHCE-T細胞を播種すると細胞はビトリゲル®膜に速やかに接着する。その後、液相培養を2日間、続いて、インサート内の培養液を取り除き、細胞の上方を空気に晒した状態での培養(気相-液相界面培養)を4日間行う。すると、HCE-T細胞は多層化し、ヒト角膜上皮と同等の約6層の細胞層を形成し、かつ、上皮バリア機能を有したヒト角膜上皮モデルが構築できる(図7)。

0日目 ad-MEDビトリゲルにHCE-T細胞を播種
2日目 気相-液相界面培養
6日目 完成



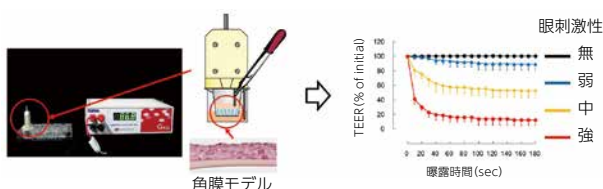
A: ヒト角膜上皮モデルの作製手順



B: ヒト角膜上皮モデル(6日目)のHE染色像および免疫染色像。
スケールバーは20μmを表す。

図7 ヒト角膜上皮モデル

このモデルに培養液と混和した化学物質を曝露し、滴下直後から3分間TEER値の経時変化を測定する。このとき、眼刺激性のない物質ではTEER値は3分間全く変化しない。一方、弱い眼刺激性物質では、TEER値は最初変化せず、一定時間経過後に徐々に減少する。そして中程度から強い眼刺激性物質では曝露直後からTEER値が低下し、かつ、眼刺激性が強い物質ほど大きく低下する(図8)。



①角膜モデルに被験物質を曝露する。 ②TEER値の経時変化を3分間測定する。

図8 Vitrigel-EIT法の試験手順

このTEER値の変化パターンを、曝露してからTEERが低下し始めるまでの時間差(Time lag)、低下速度(Intensity)、終点での低下率(Plateau level)の3種類のパラメータで数値化し、その数値から化学物質の眼刺激性の有無を判定する。Vitrigel®-EIT法で118種類の化学物質を判定し、その結果を動物実験の結果に基づいた分類

法であるGHS分類と比較したところ、一致度は80.5%、偽陰性率9.9%、偽陽性率34.1%となり、本試験法は偽陰性が少なく、眼刺激性物質と非刺激性物質との判別に適していることが示唆された¹⁴⁾。

Vitrigel®-EIT法を国際的な公定法であるOECDテストガイドラインに登録することを目指して、代替試験法国際協力(ICATM)の協力を得て結成された国際的なバリデーション実行員会のもと、日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM)主導で本試験法のバリデーション試験が実施された。国内3施設において、試験法の技術譲渡性、施設内・施設間再現性、および、予測性を試験し、良好な結果が得られている。

4.2. 肝代謝毒性試験

医薬品リード化合物の効能の評価や安全性の確認を行う上で、肝臓における吸収(Absorption)・分布(Distribution)・代謝(Metabolism)・排泄(Excretion)・毒性(Toxicity)のいわゆるADMETを解析することは非常に重要である。しかし、ヒトと動物とではADMETに種差があるため、薬剤をヒトに投与した際、動物実験では予測できない副作用が現われる場合があることが問題となっている。そこで、様々なヒトの肝臓由来細胞を用いた*in vitro*試験法で、ヒトでのADMETを予測する試みが進められている。ここで使われる細胞としては、初代凍結肝細胞、iPS由来肝細胞、および、肝ガン由来の細胞株であるHepG2細胞やHepaRG細胞などがある。これらの細胞にはそれぞれ長所と短所がある。凍結肝細胞は高価であり、ドナーの違いによるロット間差が大きい。iPS由来肝細胞は、ヒト由来の細胞を大量に得られるが、高価であり、また肝臓に特徴的なCYP等の代謝酵素活性が低い。そして、肝ガン由来細胞株は、無限増殖能があり大量の細胞が容易に得られるが、比較的代謝酵素活性が高いHepaRG細胞は高価であり、一方、比較的安価なHepG2細胞は代謝酵素活性が低いことが知られている。このHepG2細胞をシリコン処理PET膜(固相)上においたad-MEDビトリゲル®に播種し2日間培養(液相-固相界面培養)した後、空のマルチウェルプレートに設置し、細胞の上側を培地(液相)、膜を介した下側を空気(気相)に晒した液相-気相界面培養を1日間行うことで、HepG2細胞のアルブミン産生能、尿素合成能、およびCYP3A4活性が向上することが見いだされた(図9)。

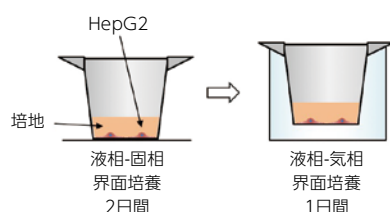


図9 肝代謝毒性試験用モデルの作製手順

また、HepG2細胞の細胞間に毛細胆管用構造を形成している様子が確認された¹⁵⁾。このように、ad-MEDビトリゲル®を用いて、細胞の上下の環境を変えて細胞を培養することで、ヒトにおけるADMEDの解析に有用な培養モデルの開発が期待できる。

5

おわりに

本稿ではビトリゲル®に関する研究開発のうち主にad-MEDビトリゲル®とその応用研究について説明した。それ以外にもビトリゲル®は医療器具、移植用担体など様々な応用が研究されており、今後の用途の拡大が期待できる。本稿で紹介したad-MEDビトリゲル®, Vitrigel®-EIT法、および肝代謝毒性試験用モデル等の研究は、農林水産省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト(現 医薬品作物、医療用素材等の開発)」の支援を受けた。また、「ビトリゲル®」は国立研究開発法人 農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)の登録商標である。

参考文献

- 1) T. Takezawa, K. Ozaki, A. Nitani, C. Takabayashi, T. Shimo-Oka, *Cell Transplant* **13**(4), 463-473 (2004).
- 2) T. Takezawa, T. Takeuchi, A. Nitani, Y. Takayama, M. Kino-Oka, M. Taya, S. Enosawa, *J. Biotechnol.* **131**(1), 76-83 (2007).
- 3) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 動物由来材料を利用した医薬品原料や医療機器等の開発のてびき, http://www.nias.affrc.go.jp/press/2016/20160328/vitrigel*.pdf(参照2016-5-25).
- 4) 竹澤俊明, 薬剤学 **75**(6), 344-353 (2015).
- 5) R. Levi-Montalcini, *Science* **237**(4819), 1154-1162 (1987).
- 6) C. Kawada, T. Hasegawa, M. Watanabe, Y. Nomura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**(4), 867-869 (2013).
- 7) F. Caloni, C. Cortinovis, F. Pizzo, I. De Angelis, *Front Pharmacol* **11**(3), 1-8 (2012).
- 8) C. Blume, E. J. Swindle, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, D. E. Davies, *Tissue Barriers* **3**(3), e1062316 (2015).
- 9) "Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (Text with EEA relevance)", European Parliament, Council of the European Union (2009).
- 10) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell* **131**(5), 861-872 (2007).
- 11) C. Lotz, F. F. Schmid, A. Rossi, S. Kurdyn, D. Kampik, B. De Wever, H. Walles, F. K. Groeber, *ALTEX* **33**(1), 55-67 (2016).
- 12) M. Meloni, A. Pauly, B. De Servi, B. Le Varlet, C. Baudouin, *Toxicol In Vitro* **24**(1), 276-285 (2010).
- 13) T. Takezawa, K. Nishikawa, P. C. Wang, *Toxicol In Vitro* **25**(6), 1237-1241 (2011).
- 14) H. Yamaguchi, H. Kojima, T. Takezawa, *Toxicol. Sci.* **135**(2), 347-355 (2013).
- 15) H. Yamaguchi, H. Kojima, T. Takezawa, *J. Appl. Toxicol.* doi: 10.1002/jat.3254. (2015). [Epub ahead of print]
- 16) A. Oshikata-Miyazaki, T. Takezawa, *Cytotechnology* doi: 10.1007/s10616-015-9934-1. (2015). [Epub ahead of print]



キーワード解説

ES細胞

胚性幹細胞(Embryonic Stem cell)とは、受精後6,7日の初期胚(胚盤胞)から将来胎児になる細胞集団(内部細胞塊)の細胞を取り出し、それを培養することにより作製される多能性幹細胞の1つである。あらゆる組織の細胞に分化できる能力(全能性)をもっている。

iPS細胞

人工多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem cell)とは、人間やマウスなどの体細胞に特定因子を導入し、培養することによって作製されるES細胞に類似した多能性幹細胞である。2006年に世界で初めて、山中教授らの研究グループによりマウス体細胞を用いて作製された。受精卵を破壊する必要がなく、自分自身の細胞から作製することも可能なため、免疫拒絶が起きる可能性が低いと期待されている。

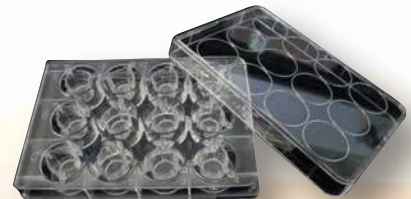
ビトリゲル

農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)の竹澤主席研究員らが開発した、ハイドロゲルをガラス化および再水和することで作製した素材。このうち、コラーゲンゲルから作製したものをコラーゲンビトリゲルと言い、再生医療用材料、薬物送達システムの担体、および、三次元培養に適した細胞培養担体としての応用研究が進んでいる。

3次元培養に適した細胞培養用器材 ad-MED ビトリゲル®2

組織再構築に有用なコラーゲンビトリゲル®膜を使用した細胞培養用インサートです。

従来の ad-MED ビトリゲル® よりも細胞接着活性・伸展活性に優れ、様々な細胞に対して良好な細胞培養を可能とします。



特徴

細胞接着活性が高く、均一な分散培養が可能

接着斑の形成が早く、細胞進展活性が高い

ビトリゲル®膜を介した両面培養が可能

標準的な使用方法

培養液を注いだプレートウェルに	細胞および培養液を	CO ₂ インキュベータ内	光学顕微鏡で
吊り下げる	ad-MED ビトリゲル®内に注ぐ	で培養する。	細胞の形態を観察する
		培養液を適宜交換する。	

「ビトリゲル®」は独立行政法人 農業生物資源研究所の登録商標です。

「農林水産省アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト(ビトリゲル®)」の支援を受けて独立行政法人 農業生物資源研究所と共同で開発されました。

※無断転載および複製を禁じます。



関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

HP <http://www.kanto.co.jp/times/>

E-mail: chemiti-info@gms.kanto.co.jp 編集責任者: 猪瀬真人

平成 28 年 7 月発行