

# 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

## —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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3),4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>、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<sup>8)</sup>。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。

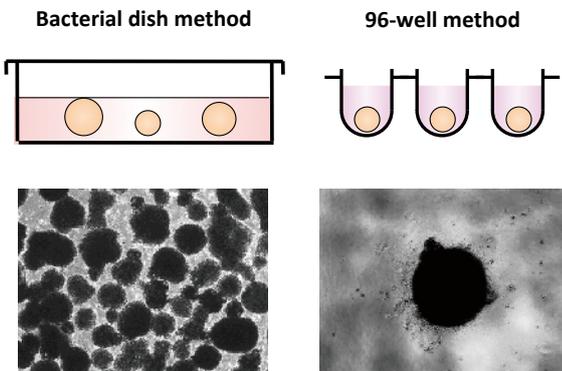


図1 胚様体形成法の種類と特徴

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、10 $\mu$ MのY-27632を添加したAccutaseIによってシングルセルに分散した。分散したhiPS細胞を10  $\mu$ M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50~450 $\mu$ mの広い範囲に分布しており、その分布幅は約400 $\mu$ m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150 $\mu$ m以下であった。特に、3000 cells/wellで形成したEBの分布幅は100 $\mu$ m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。

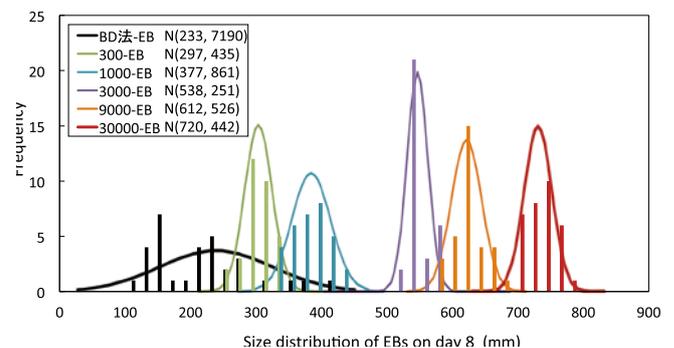


図2 BD法および96-well法によって形成した胚様体の大きさ分布  
BD法-EBと96-well法により初期播種細胞数300, 1000, 3000, 9000, 30000 cells/well (300, 1000, 3000, 9000, 30000-EB)にて形成した培養8日目のEBの大きさをヒストグラムで示した。曲線はEBの大きさの正規曲線。

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ほおなじであった。

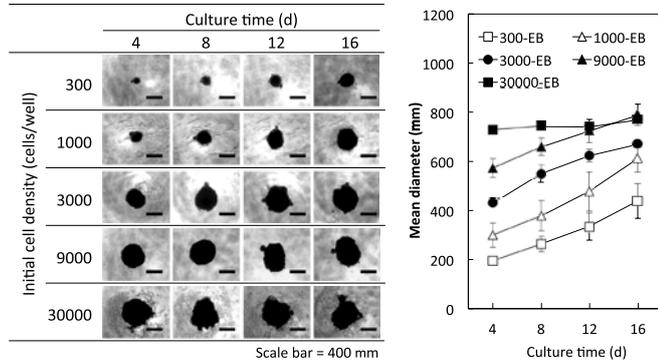


図3 96-well法による胚様体の形態的变化と大きさの推移

(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。

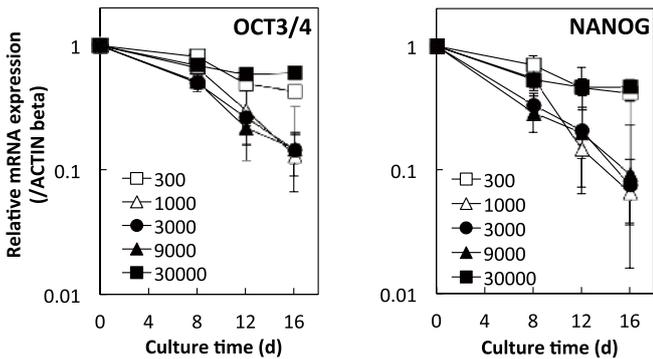


図4 初期播種細胞数が胚様体の未分化性に及ぼす影響  
初期播種細胞数300(□), 1000(△), 3000(●), 9000(▲), 30000(■) cells/wellで形成したEBにおけるOCT3/4(左)およびNANOG(右)の相対発現量の推移を示した。ACTINβにより正規化し、同時に調製した分化誘導前のヒトiPS細胞により標準化。

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。

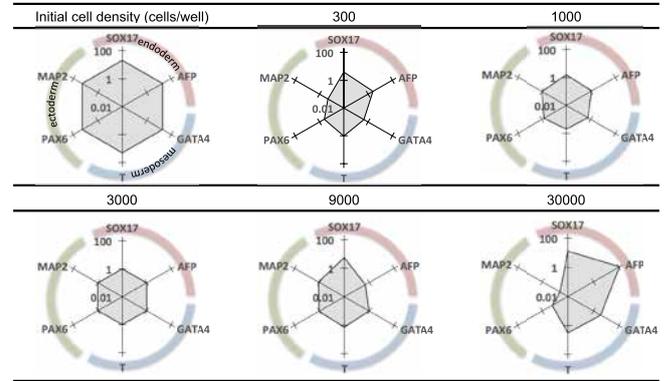


図5 初期播種細胞数がEBの分化方向性に及ぼす影響  
初期播種細胞数300, 1000, 3000, 9000, 30000 cells/wellで形成したEBの培養16日目における三胚葉分化関連遺伝子、内胚葉(SOX17、AFP)、中胚葉系(GATA4、T)、外胚葉(PAX6、MAP2)の相対発現量。ACTINβにより正規化し、1000 cells/wellで形成したEBの相対発現量により標準化。

(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て培養したヒトiPS細胞を用いるのが一般的である<sup>9)</sup>。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PluriSTEMTM 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

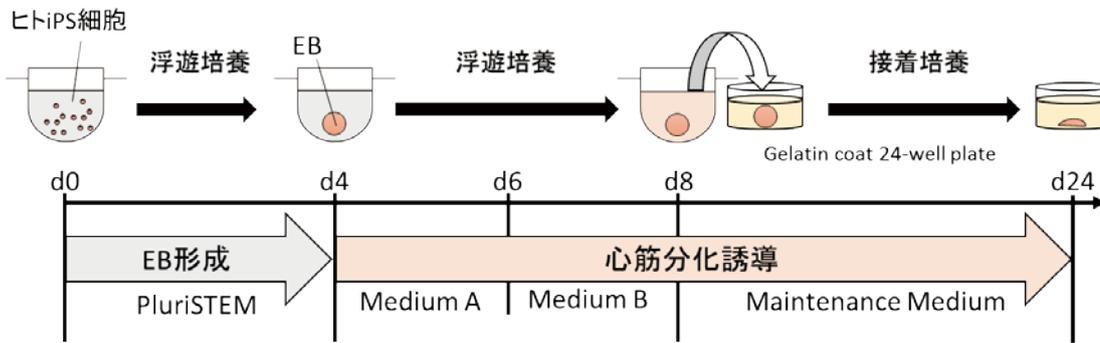


図6 ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化誘導方法

でPluriSTEMにより培養したhiPS細胞を10 μM Y-27632含有Accutaseにより分散した。300 xgで遠心し、10 μM 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<sup>10)</sup>。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。

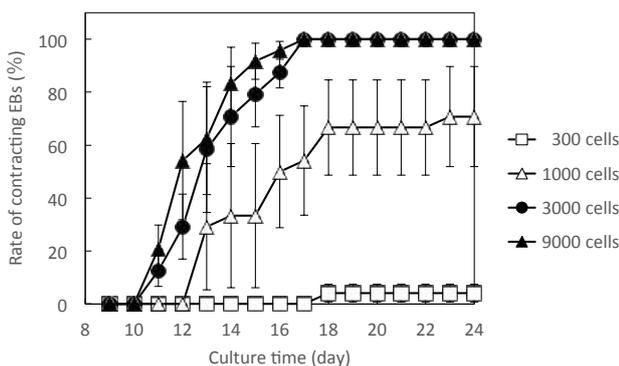


図7 心筋分化誘導時の拍動率の推移

### (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)。

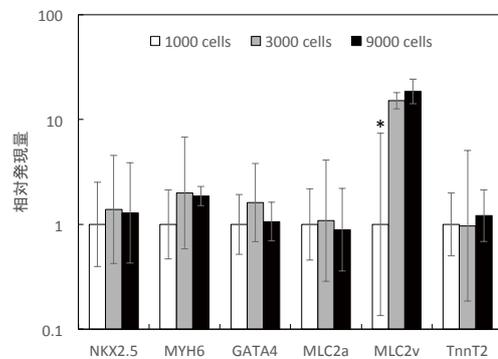


図8 初期播種細胞数が胚様体の分化方向性に及ぼす影響  
初期播種細胞数1000、3000、9000 cells/wellで形成したEBの培養24日目における心筋分化関連遺伝子の相対発現量。TBPIにより正規化し、1000 cells/wellで形成したEBの相対発現量により標準化。\*はP<0.05。

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の円形度に着目した。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。

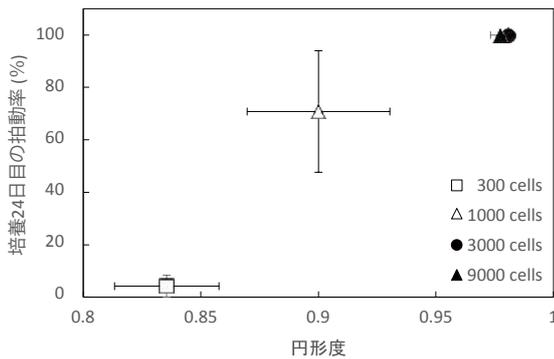


図9 胚様体の円形度と拍動率の関係

## 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。