

幹細胞スフェロイドにおける
微小培養環境の設計と分化

2018年3月

宮本 大輔

目次

第1章：序論

1.1. 幹細胞の可能性	1
1.2. 細胞ニッチ制御の意義	2
1.3. 既存のスフェロイド培養におけるコンセプト	4
1.4. 本研究の戦略	5
1.5. 本論文の構成	7
参考文献	9

第2章：既往のスフェロイド研究

2.1. スフェロイド研究の歴史	12
2.2. スフェロイド形成技術	13
2.2.1. スフェロイド形成の原理	
2.2.2. 汎用的なスフェロイド形成法	
2.2.3. マイクロパターニングスフェロイド培養法	
2.3. スフェロイド特性を制御するための様々な取り組み	19
2.3.1. スフェロイドサイズ的作用	
2.3.2. 共培養的作用	
2.3.3. 培地成分的作用	
2.3.4. ECM 成分/培養担体の作用	
2.3.5. 酸素環境的作用	
2.3.6. メカニカルストレス的作用	
2.4. 自発的微小培養環境と本研究の位置づけ	22
参考文献	24

第3章：シングル/マルチ-スフェロイド培養における幹細胞の分化特性

3.1. 本章の目的	29
------------	----

3.2. 幹細胞分化におけるスフェロイドサイズの効果	30
3.2.1. 本節の目的	
3.2.2. 実験方法	
3.2.3. 実験結果および考察	
3.2.4. 本節のまとめ	
3.3. 分化スイッチング現象のメカニズムの解明	41
3.3.1. 本節の目的	
3.3.2. 実験方法	
3.3.3. 実験結果および考察	
3.3.4. 本節のまとめ	
3.4. 本章のまとめ	51
参考文献	52

第4章：スフェロイド間距離と幹細胞分化の関係

4.1. 本章の目的	55
4.2. 胚様体間距離が ES 細胞特性に与える影響	56
4.2.1. 本節の目的	
4.2.2. 実験方法	
4.2.3. 実験結果および考察	
4.2.4. 本節のまとめ	
4.3. スフェロイド間距離が HepG2 細胞特性に与える効果	66
4.3.1. 本節の目的	
4.3.2. 実験方法	
4.3.3. 実験結果および考察	
4.3.4. 本節のまとめ	
4.4. 本章のまとめ	78
参考文献	79

第5章：ガス透過性培養基板を利用した幹細胞の分化

5.1. 本章の目的	80
5.2. 酸素透過性材料が iPS 胚様体特性に与える効果	81
5.2.1. 本節の目的	

5.2.2. 実験方法	
5.2.3. 実験結果および考察	
5.2.4. 本節のまとめ	
5.3. スフェロイド数依存的な幹細胞分化特性の変化	95
5.3.1. 本節の目的	
5.3.2. 実験方法	
5.3.3. 実験結果および考察	
5.3.4. 本節のまとめ	
5.4. 本章のまとめ	107
参考文献	108

第6章：結論

6-1.本論分のまとめ	110
6-2.今後の展望	112

学術論文リスト

謝辞

第 1 章：序章

1.1. 幹細胞の可能性

我々の体の中には様々な細胞が多様な働きを担うことで健康を維持しており、これらの細胞は受精卵から細胞分化が進み遺伝子発現パターンの違いによって「運命決定」されている。一方でこの「遺伝子発現パターン」の歯車が崩れることで「ダウン症候群」や「骨形成不全症」などの先天性疾患や「肝硬変」や「パーキンソン病」、「癌」などの後天性疾患を引き起こす。つまり逆に発想すると細胞分化および遺伝子発現パターンの解析は「生理学的/病理学的メカニズムの解明」、「疾患モデル構築における細胞アッセイ研究」、「再生医療に向けた高機能性細胞の提供」へと発展することが期待できる。このようなアプリケーションにおいて、発生学的研究ではヌードマウスやゼブラフィッシュ、ショウジョウバエなどの小動物、病理学的研究において疾患患者の腫瘍組織の利用が中心であった[1,2]。一方で *in vitro* 下での研究では生体から摘出した初代細胞や癌化させ無限増殖能を有する株化細胞などが利用されてきた。しかし初代細胞では機能発現の急激な低下や増殖能の低さがあり、また株化細胞の機能発現は *in vivo* に比べ著しく低いといった問題点が存在してしまう。

そこで近年では自己複製能と多分化能を有する「多能性幹細胞」の利用が期待されている。1981年にマウスの受精卵の一部である細胞を摘出・精製して作成された胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells ; ES 細胞) が樹立され、1998年には J.Thomson 教授らによって同様のアプローチでヒト ES 細胞が確立された[3]。ただし ES 細胞は受精卵を壊すため倫理的な問題から 2000年頃からアメリカでは ES 細胞の使用が禁止されるなどの問題が生じている。日本では体外受精に不妊治療時に母体に戻されず破棄が決定したもののみ使用が許可されている。しかし近年の ES 細胞研究においては受精卵の一部あるいは発生停止した胚から ES 細胞を作製する技術が確立されており[4]、基礎生物学的研究や創薬研究、再生医療への利用が加速されている。また 2006年では山中伸弥教授らによって線維芽細胞に「山中 4 因子」と呼ばれる遺伝子を導入することで ES 細胞と同様の能力を持つ「人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells ; iPS 細胞)」が樹立された[5,6]。この細胞は自分自身の細胞から多能性幹細胞を作製することが可能であり、ES 細胞とは異なり免疫拒絶のない自家細胞移植治療などやオーダーメイド細胞アッセイ研究など様々な可能性を秘めている。実際に「滲出型加齢黄斑変性」の患者に対して自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シートによる臨床試験が 2014年 9月に理化学研究所 高橋プロジェクトリーダーらによって実施されている[7]。さらに 2011年より京都大学の山中教授らは日本の人口の約 20%に対して他家移植が可能な「HLA3 座ホモ iPS 細胞株 (HLA-A、HLA-B、HLA-DR ホモ接合

型)」を作製しており、この細胞株を細胞バンクによって凍結保存させておくことでおよそ半年はかかるといわれている iPS 細胞の作成時間を短縮できるのではないかと期待されている[8]。

多能性幹細胞としては ES/iPS 細胞以外にも様々あり、例えば組織幹細胞や出澤教授らによって間葉系組織などから分離・精製された非腫瘍形成性の「多能性成体幹細胞 (Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell ; Mues 細胞)」[9]、加野准教授らによって樹立された「脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated Fat cell : DFAT 細胞)」[10]など様々な細胞が樹立されていっている。そのため *in vitro* 下における多能性幹細胞の利用は Table1 のような臨床研究へと展開されていき、再生医療において近い将来多くの患者を救うこと重要な治療技術となることが期待されている。

Table.1.多能性幹細胞を利用したアプリケーションの一例

幹細胞の種類	確立年度	作成組織	現在の研究/アプリケーションの例
神経幹細胞	1992年	生体組織 (脳組織)	脳神経疾患・神経損傷への細胞 移植治療
造血幹細胞	1978年	生体組織 (骨髄組織)	輸血用血液、骨髄移植 etc..
間葉系幹細胞	1960年代	骨髄組織、脂肪組織、 臍帯静脈 etc..	人工関節への応用 骨欠損/軟骨損傷治療への応用
Muse細胞	2010年	生体から抽出した 間葉系幹細胞	慢性腎臓病の治療法
DFAT細胞	2008年	成人の脂肪組織	血管再生細胞治療
ES細胞	1981年	受精卵	ES由来オリゴデンドロサイト 前駆細胞による骨髄損傷治療
iPS細胞	2006年	あらゆる組織細胞	加齢黄斑変性の治療 パーキンソン病治療 etc..

1.2. 細胞ニッチ制御の意義

既存の幹細胞分化誘導では「機能性細胞への分化誘導効率の低さ」あるいは「分化誘導後の機能性細胞の機能発現が低い」といった問題点がいまだに解決できていない。*in vivo* では発生時あるいは組織の再生過程 (例えば皮膚などのターンオーバーなど) では規則的に幹細胞分化が促進されるものの、現在の *in vitro* での幹細胞分化は無秩序的に発生してしまう。その結果、多能性幹細胞の初期分化効率が低く、例えば iPS 細胞から肝細胞への分化効率は 30%程度しかない。その要因としては幹細胞を取り巻く微小環境 (細胞ニッチ) が *in vivo* と *in vitro* で大きく異なることが考えられる。初代肝細胞を例にとると、生体内の肝

臓は 70%を切除したとしても数週間から数ヶ月経つことで元の大きさに戻る極めて高い再生能を有するものの、*in vitro* では生体から摘出してきた初代肝細胞はほとんど増殖せず数週間で肝特異的機能発現が減少することが知られている[11]。この現象は *in vivo* での微小環境から *in vitro* での微小環境へと変化することで肝細胞特性に影響を与えたことが考えられ、細胞ニッチと細胞特性を支配するシグナル経路の関係性を実証している。すなわち、多能性幹細胞の分化シグナルに関しても *in vitro* での細胞ニッチの刺激によって分化誘導を助長するシグナルや阻害するシグナルが無秩序に作用するためといえる。そのため *in vitro* 下での分化現象を理解するためには幹細胞ニッチと細胞内シグナル伝達の関係性を十分に考慮した培養系の確立が求められる。そこで本節では、細胞内シグナル伝達を刺激する細胞ニッチを「生化学的幹細胞ニッチ」と「材料/工学的細胞ニッチ」といった 2 つに分類し、それに伴う細胞内シグナル伝達との関係性についてまとめた。

【生化学的細胞ニッチ】

【材料/工学的細胞ニッチ】

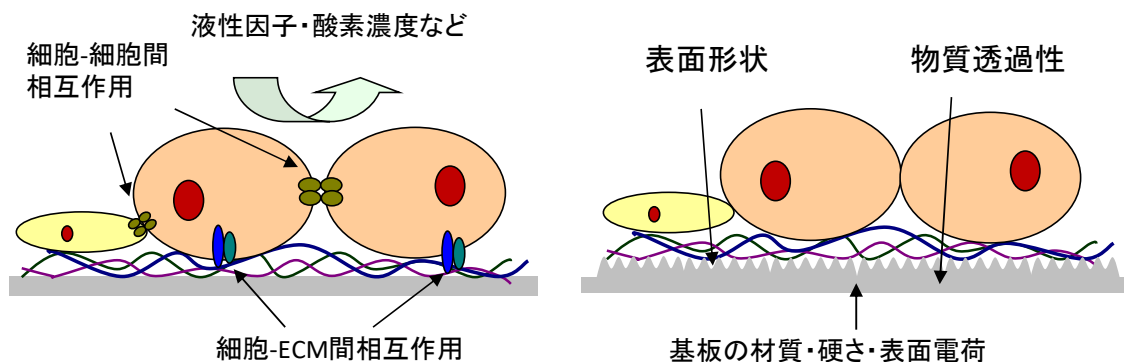


Fig 1.1. 幹細胞を取り巻く微小培養環境因子。(左) 生化学的細胞ニッチ、(右) 材料/工学的細胞ニッチ。

(1) 生化学的細胞ニッチと細胞内シグナル

「生化学的幹細胞ニッチ」としてはタンパク質や糖で構成された細胞の足場である細胞外マトリクス (Extra-Cellular Matrix; ECM) や細胞の栄養となる生理活性因子 (細胞増殖因子やサイトカイン、ホルモンなど) はこれまで多く研究されている。ECM の効果としては細胞骨格を支えるだけではなく、コラーゲンやラミニンなどの様々な ECM に応じて発現するインテグリン鎖 (α 鎖および β 鎖) によって生じる細胞内シグナル伝達が細胞増殖や分化、細胞遊走、アポトーシスなどを誘導させる[12,13]。また生理活性因子においても同様に、例えばアクチビン A や骨形成タンパク (Bone Morphogenetic Protein; BMP) に応答する「Smad シグナル伝達」、線維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factors; FGF) や上皮細胞成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF)、インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factors; IGF) に応答する「PI3K シグナル」あるいは「MAPK シグナル」などのように個々の応答性を示す。

さらに近年では、細胞ニッチの一つである「細胞周辺の酸素環境」に注目されている。生

体内における細胞周辺の酸素濃度は様々である。例えば発生初期では受精卵内部あるいは脊髄内部に存在する間葉系幹細胞や造血幹細胞周辺では低酸素環境（2～8%程度）を形成している[14]。一方で肝臓や心臓などの臓器あるいは組織における細胞は高い酸素供給を求める。つまり培養細胞における細胞特性の変化にも酸素供給量の制御が重要であり、細胞増殖能や肝特異的機能発現、さらに血管新生といった様々な生理現象をコントロールすることが報告されている[15-17]。

(2) 材料/工学的細胞ニッチと細胞内シグナル

「力学的幹細胞ニッチ」としては培養基板の表面特性（アニオン/カチオンの極性や基板固さ、基板形状など）や培養系における機械的ストレスに応じた細胞特性を制御する方法がある。また表面特性の違いは基板上における細胞接着・進展への影響が細胞形態（つまりアクチン骨格の違い）に応じて発生する「Rho/Rock シグナル」や「Hippo/YAP シグナル」が連動することで転写因子や自己分泌タンパクの発現を誘導させる[18,19]。また培養基板の固さや培養系内のせん断応力というファクターに関しては現在メカニズムが不明であるものの、生体における臓器の硬さ（骨ならば 100KPa、脳ならば 1KPa など）あるいは血管内部で生じる機械的ストレス（血流あるいは血圧など）といった生体内における細胞ニッチを模倣することが考えられている[20,21]。

1.3. 既存のスフェロイド培養におけるコンセプト

これらのアプリケーションを実現させるためにはこれらの多能性幹細胞の分化特性を *in vitro* 下で十分に制御することが求められる。培養細胞は生体とのギャップ差が著しいため、生体内の生理現象を十分に再現できていないことが課題とされている。その要因としては汎用的に用いられている単層培養（培養基板上に接着・伸展させた細胞培養）では細胞間コミュニケーションおよび生体内構造の欠如（たとえば肝細胞における微小胆管構造の欠如）するためである。そこで生体内における細胞形態の模倣させた「生体バイオミメティック培養」である三次元培養法が注目され、その手法の一つとして多能性幹細胞を集合・凝集させた三次元球状組織体（スフェロイド）を構築し、サイトカインや小分子化合物などの分化誘導因子を添加させる培養技術が確立されている[22]。例えば、発生過程においては受精卵内部にある「胚」と呼ばれる三次元球状組織体をスタートとして Fig 1.1.1-A に示すようにサイトカインやホルモンなどの分泌物の刺激を受けて肝細胞が増殖・分化することで生体を構築している。つまり幹細胞スフェロイド培養のコンセプトは生体内における細胞形態および分化/発生過程における刺激因子発現を模倣するといったものである。

多能性幹細胞スフェロイド培養では 1.1 節でも述べたように多くの多能性幹細胞は再生医療研究への利用が期待されている。しかし我々の体を構築する細胞は約 37 兆個であり、

肝臓や膵臓などの臓器治療においても多くの細胞が必要である。そのため多能性幹細胞特性を制御したままで大量培養することが求められる。従来の単層培養を用いて大量培養を行うためには莫大な培養面積を有することが求められ、また細胞が積層していくと十分に細胞特性を制御できないといった問題点が挙げられている。そこで近年では多能性幹細胞の大量培養としてスフェロイド培養技術に注目されており、中辻教授らは粘性のある培養液内でヒト iPS スフェロイド培養を行うことで 10^8 オーダーの細胞数を確保する技術を報告している[23]。しかし多能性幹細胞スフェロイドの大量培養においては分化状態を十分に制御することが重要であり、その多くの研究が 1 個のスフェロイドに着目した解析が中心である。一般的にスフェロイドは中心部に存在する細胞に比べてスフェロイド周辺部に位置する細胞のほうが増殖能は活発であり、1.2 節で述べたように細胞間接着などによる生化学的作用、細胞骨格による張力なども発生する。このような微小培養環境の形成にはスフェロイドサイズと密接にかかわっており、スフェロイドサイズと幹細胞分化特性の関係性について多くの研究報告が挙げられている。つまり既存の多能性幹細胞スフェロイド培養では「スフェロイドサイズの制御」および「スフェロイドの大量形成」を目的とした研究が中心である。

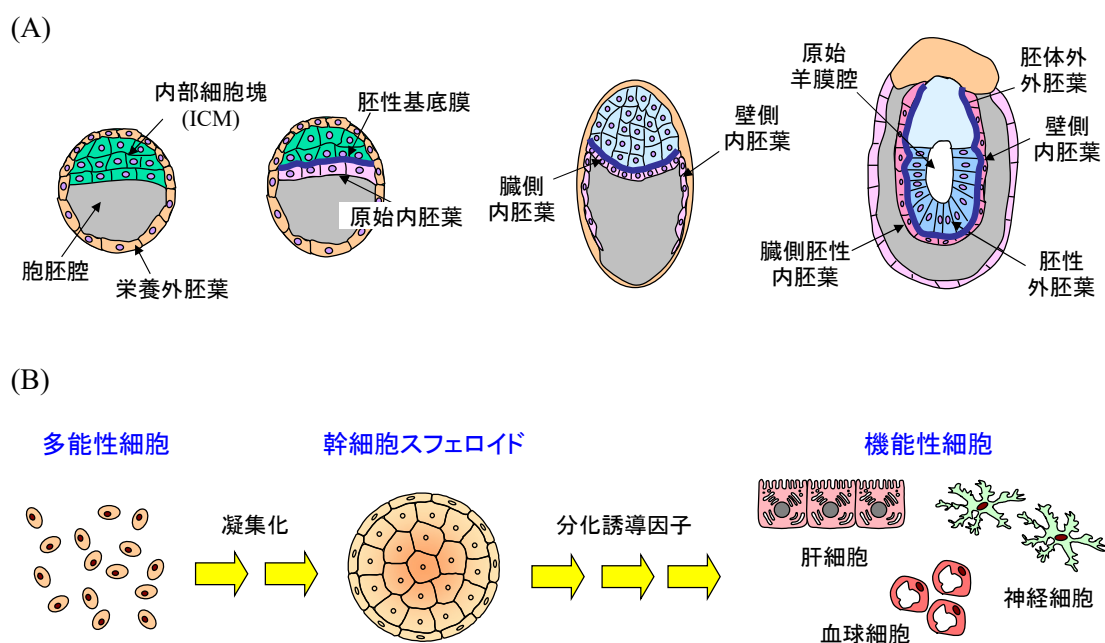


Fig 1.2. 幹細胞分化の概念図。(A) マウス胚における分化過程 (*in vivo*)、(B) 多能性幹細胞スフェロイド形成を利用した分化過程 (*in vitro*)。

1.4. 本研究の戦略

スフェロイド形成では従来の単層培養とは異なりスフェロイド内部/近傍で「特殊な微

小培養環境」を形成してしまうため、その形成された微小培養環境によって細胞特性に大きく影響することが知られている。例えばスフェロイドは血管網を持たない細胞集合体であるためスフェロイドサイズが変化することで、その内部における物質（供給物質や老廃物）の濃度分布、細胞間相互作用、力学的作用などが異なり、幹細胞の分化特性が変化することが知られている[24]。さらに静置培養下において同一培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合、隣接するスフェロイド間の距離や培養系内のスフェロイド数の違いによって、胚様体を取り巻く物質（供給物質や老廃物）の濃度分布が異なるはずである（Fig. 1.3）。

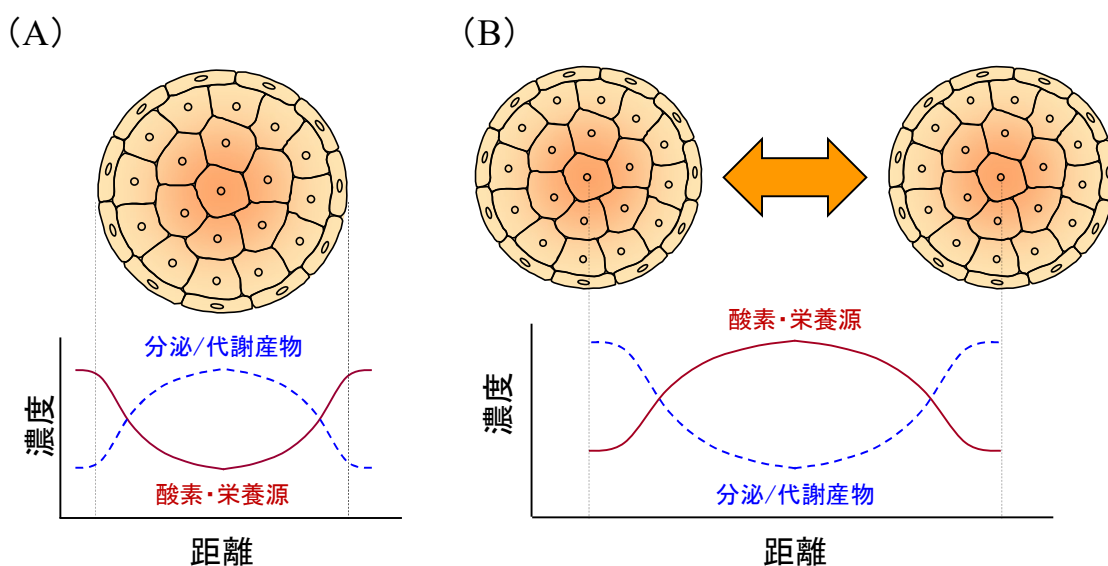


Fig 1.3. 本研究の着眼点；培養基板上のスフェロイドアレイ化を利用した幹細胞ニッチの制御

しかし、「スフェロイド近傍の微小培養環境の変化」が与える幹細胞特性に影響は考えられるもののこのような観点からの研究報告はほとんどない。「スフェロイド近傍の微小環境による影響」を評価するためには「スフェロイドサイズ」、「スフェロイド間距離」、「培養系内のスフェロイド数」といった様々なファクターを十分に制御した培養系が求められている。しかし 1.3 で述べたように、既存のスフェロイド研究では「単一スフェロイドをターゲットとした基礎研究」あるいは「スフェロイド形成に伴う大量培養技術の開発」を中心に行われており、既存のスフェロイド培養技術であるハンギング・ドロップ法や U 字底プレート（単一スフェロイドをここに形成させる培養系）、浮遊旋回培養法（大量のスフェロイド場ランダムに存在する培養系）ではこのような取り組みは困難である。一方で、近年では材料科学や機械工学の研究を細胞培養へと応用させ、スフェロイドを培養基板上にマイクロパターンニング培養する技術が開発され、本研究室でも独自のスフェロイドパターンニング技術（詳細は 2.3 節で述べる）を確立している。そこで、本研究ではスフェロイドパターンニング技術を利用して培養基板上のスフェロイドをアレイ化する技術に着目した。培養系内のスフェロイドをアレイ化することによって隣接するスフェロイド同士の位置関係性をサブミリメートル単位で制御し、「スフェロイドニッチ」とも呼ぶべきスフェロイド近傍の微小培

養環境と多能性幹細胞分化特性の関係性を評価することを目的とする。

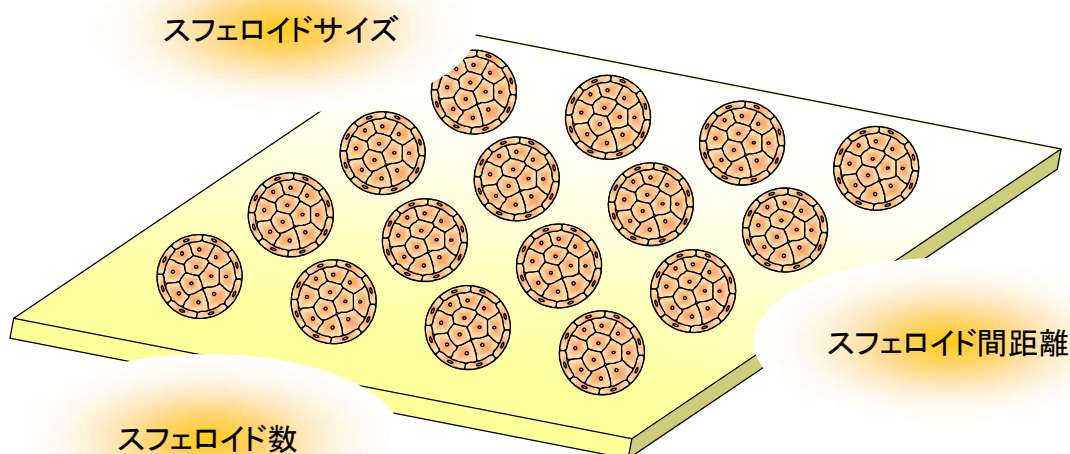


Fig 1.4. スフェロイドパターニング技術の概念図。

1.5. 本論文の構成

第1章では、本研究の着眼点とその必要性検討について述べた。さらに、本研究を遂行すべき内容の方針を示した。

第2章では、本研究に関する関連分野の既往の研究について示した。2.1 および 2.2 では、スフェロイド研究における既存の研究成果およびスフェロイド形成技術について紹介した。2.3 では、スフェロイド培養における細胞ニッチ制御技術について既存の幹細胞ニッチを制御する手法についてまとめ、2.4 では既存の研究と本研究の着眼点の違いを明確化し、本研究のアプローチについて述べた。

第3章では、スフェロイド形成技術の違いが生み出す微小培養環境が iPS スフェロイド分化特性に与える影響について評価した。まず、シングル-スフェロイド系（培養系内に1つのスフェロイドが存在する培養系）とマルチ-スフェロイド系（培養系内に多数のスフェロイドが隣接する培養系）でサイズの異なるスフェロイドをそれぞれ作製し、培養法の違いが iPS スフェロイド分化特性に与える影響について検討した。さらに、培養法の違いによる環境因子の一つである微小酸素環境に着目し、酸素環境に依存的な代謝活性の変化およびその分化特性に影響する細胞内シグナル伝達経路の探索を試みた。

第 4 章では、第 3 章で導き出したスフェロイド近傍の微小酸素濃度勾配の影響についてスフェロイド間距離とスフェロイド特性の関係性について検討した。まず、スフェロイド間距離および形成された位置関係性についてスフェロイドパターンニングチップを利用して制御しマウス ES 細胞の分化特性に与える影響を評価した。さらに、同様の条件を肝芽腫瘍細胞株 (HepG2 細胞) でもスフェロイドを形成し、肝細胞特異的機能発現とスフェロイド近傍での酸素濃度勾配の関係性について評価した。

第 5 章では、スフェロイド近傍の酸素環境が分化スイッチング現象を引き起こす要因であることを実証することを試みた。まず、酸素透過性の異なる培養基板を利用してスフェロイド近傍の酸素環境とマウス iPS 細胞分化特性の関係性について検討した。また微小酸素環境を形成するファクターの一つである培養系内のスフェロイド数に着目し、iPS スフェロイド数が代謝活性と細胞分化特性の関係性について検討した。さらに、第 3 章で見出した酸素環境に依存した細胞内シグナル経路と微小酸素環境の関係性に関して考察した。

第 6 章では、本論文の総括を行うとともに、本技術がどのような波及効果があるかを考察した。さらに、本論文の成果をもとに、今後の本研究の展開について記述した。

【参考文献】

1. **Ando, K., Fukuhara, S., Izumi, N., Nakajima, H., Fukui, H., Kelsh, R. N. and Mochizuki, N.:** Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development*, **143**, 1328-1339, 2016.
2. **Meikle, L., Talos, D. M., Onda, H., Pollizzi, K., Rotenberg, A., Sahin, M., Jensen, F. E. and Kwiatkowski, D. J.:** A Mouse Model of Tuberous Sclerosis: Neuronal Loss of Tsc1 Causes Dysplastic and Ectopic Neurons, Reduced Myelination, Seizure Activity, and Limited Survival. *Journal of Neuroscience*, **21**, 5546–5558, 2007.
3. **Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.:** Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, **282**, 1145-1147, 1998.
4. **Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S., Zdravkovic, T., Llic, D., Genbacev, O., Fisher, S., Krtolica, A. and Lanza, R.:** Human Embryonic Stem Cell Line Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell*, **2**, 113-117, 2008.
5. **Takahashi, K. and Yamanaka, S.:** Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126**, 663–676, 2006.
6. **Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.:** Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblast by Defined Factors. *Cell*, **131**, 861–872, 2007.
7. **Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., Go, M. J., Shinohara, C., Hata, K., Sawada, M., Yamamoto, M., Ohta, S., Ohara, Y., Yoshida, K., Kuwahara, J., Kitano, Y., Amano, N., Umekage, M., Kitaoka, F., Tanaka, A., Okada, C., Takasu, N., Ogawa, S., Yamanaka, S. and Takahashi, M.:** Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, **376**, 1038-1046, 2017.
8. **Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Takahashi, H. H. and Yamanaka, S.:** A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, **8**, 409-412, 2011.
9. **Kitada, M., Wakao, S. and Dezawa, M.:** Muse cells and induced pluripotent stem cell: implication of the elite model. *Cell. Mol. Life Sci*, **69**, 3739–3750, 2012.

10. **Kishimoto, N., Momota, Y., Hashimoto, Y., Tatsumi, S., Ando, K., Omasa, T. and Kotani, J.:** The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. *Clin Oral Invest*, **18**, 1893–1901, 2014.
11. 中澤浩二: 肝細胞: 培養技術と肝機能評価. *バイオマテリアル—生体材料*, **26**, 55-61, 2008.
12. **Hayashi, Y., Furue, M, K., Okamoto, T., Ohnuma, K., Myoishi, Y., Fukuhara, Y., Abe, T., Sato, J, T., Hata, R. and Asashima, M.:** Integrins Regulate Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *STEMCELLS*, **25**, 3005–3015, 2007.
13. **Martino, M, M., Mochizuki, M., Rothenfluh, D, A., Rempel, S, A., Hubbell, J, A. and Barker, T, H.:** Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2-D and 3-D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials*, **30**, 1089–1097, 2009.
14. **Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T. and Quinones-Hinojosa, A.:** Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*, **7**, 150-161, 2010.
15. **Xiao, W., Shinohara, M., Komori, K., Sakai, Y., Matsui, H. and Osada, T.:** The Importance of Physiological Oxygen Concentrations in the Sandwich Cultures of Rat Hepatocytes on Gas-Permeable Membrane. *Biotechnol. Prog.*, **30**, 1401-1410, 2014.
16. **Kunz-Schughart, L, A., Groebe, K. and Mueller-Klieser.:** Three-dimensional cell culture induces novel proloferative and metabolic alterations associated with oncogenic transformation. *Int. J. Cancer*, **66**, 578-586, 1996.
17. 服部 浩一、宗像 真也: 造血系細胞による血管新生制御機構, 血管新生研究の最先端, 株式会社医薬ジャーナル社, pp.56-66, 2013.
18. **Wang, W., Xiao, Z, D., Li, X., Aziz, K, E., Gan, B., Johnson, R, L. and Chen, J.:** AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *NATURE CELL BIOLOGY*, **17**, 490-499, 2015.
19. **Discher, D, E., Janmey, P. and Wang, Y.:** Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *SCIENCE*, **310**, 1139-1143, 2005.
20. **Yeung, T., Georges, P, C., Flanagan, L, A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. and Janmey, P, A.:** Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **60**, 24–34, 2005.
21. **Engler, A, J., Sen, S., Sweeney, H, L. and Discher, D, E.:** Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, **126**, 677-689, 2006.
22. **Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, J, P., Meacham, A, M., Zon, L, I. and**

- Terada, N.:** Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Letters*, **497**, 15-19, 2001.
23. **Otsuji, T, G., Bin, J., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J, E., Nishino, T., Hasegawa, K. and Nakatsuji, N.:** A 3D Sphere Culture System Containing Functional Polymers for Large-Scale Human Pluripotent Stem Cell Production. *Stem Cell Reports*, **2**, 734-745, 2014.
24. **Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W. and Kunz-Schughart, L, A.:** Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, **148**, 3-15, 2010.

第2章：既往のスフェロイド研究

2.1. スフェロイド研究の歴史

生体に存在する組織や臓器は立体的形態を維持した状態で存在し、また複数の細胞が混合した状態で異種細胞同士が刺激し合うことで機能発現を維持している。一方で、*in vitro* 下での細胞培養はペトリ皿上で培養する場合、培養培地に含まれるフィブロネクチンなどの細胞接着分子が基板上に接着し細胞-基板間相互作用が働くことで細胞が接着・伸展してしまう。そのため、細胞形態の違いが発生し、急激に細胞特性の低下が発生してしまうといった問題点が存在していた。一方で1980年代に M. Bissell らが *in vitro* 下において三次元組織体培養の重要性を説き、スフェロイド培養が普及してきた[1]。スフェロイドは細胞-基板間相互作用に比べ、細胞-細胞間相互作用の影響が強く働くことで細胞が集合・凝集し力学的安定の高い球状組織体を形成する。これによって単層培養に比べスフェロイド培養は *in vitro* 下で高い機能発現を誘導させることが報告されている。実際に肝細胞スフェロイド内部には微小胆管構造が形成されるとともに肝細胞特異的機能発現が向上することを報告している[2]。スフェロイド培養においては幹細胞などの機能性細胞以外にも様々な細胞へと利用されている。例えば多能性幹細胞である ES/iPS 細胞では1.3節でも述べたように発生過程における細胞形態を模倣することで細胞分化を促進させるトリガーの役割を担い、近年では間葉系幹細胞分化誘導においてもスフェロイド培養が同様に利用されている[3, 4]。さらに間葉系幹細胞スフェロイドにおいては分化特性の向上以外にも様々な増殖因子の分泌、抗アポトーシス特性、ホーミング効果（移植時に疾患部位に集まる現象）といった特異的機能発現の向上についても報告されている[5]。一方で神経幹細胞分化特性においてはこれまでとは異なり単層培養下では分化が促進されるのに対してスフェロイド培養下では未分化維持機構を促進させる効果が報告されている[6, 7]。またスフェロイドという三次元組織体という構造を利用したアプリケーションの利用が期待されている。例えば、スフェロイドという三次元球状祖組織体構造が *in vivo* における固形癌と類似した構造であるため、癌細胞スフェロイドにおける抗がん剤の応答性を *in vitro* で再現させる細胞アッセイ技術の開発が報告されている[8, 9]。細胞移植時における特徴としては、スフェロイドが数百マイクロ単位であることから単一細胞に比べ生着率の改善される期待できる。さらに近年では、高い機能発現を有するスフェロイドを利用して数ミリ単位の組織体を構築させる方法が様々行われており、多数のスフェロイドをコラーゲンゲルやマトリゲルなどで包埋させる、あるいは数のスフェロイドを融合させて数ミリオーダーの組織体を構築させるビルドアップ組織形成法におけるビルドブロックとしての利用などが挙げられている[10-12]。

このように、スフェロイド研究は「幹細胞研究」以外にも「細胞アッセイ」や「組織工学」といった様々な研究へと発展されているものの、スフェロイドは血管様構造を持たないの
で物質の拡散依存的に酸素や栄養素などの供給物質や代謝物質による濃度勾配が形成され
るために一定のサイズ以上ではスフェロイド内部ではネクローシスが発生してしまうとい
った問題点が残っている。そのためスフェロイドに関する機能的・構造的な解析やその培養
法の確立、さらにはアプリケーション展開などの取り組みは、活発に進められている。そこ
で本章では既存のスフェロイド研究における様々なアプローチについて述べる。

2.2. スフェロイド形成技術

2.2.1. スフェロイド形成の原理

2.1 節でも述べたように単層培養下ではペトリ皿のような培養器具底面に細胞接着タン
パクが吸着することで足場を作り細胞-基板間相互作用が働くことで培養器具に接着・伸展
させる形態を示す。一方で、スフェロイド培養では細胞非接着性を有する培養底面では細胞
接着タンパクが吸着することができないため、培養細胞は浮遊状態を維持する。一般的に培
養細胞は担体に接着ができない場合、アポトーシスのシグナルが働いてしまう。それを回避
するために培養細胞同士が集合・凝集することで互いに足場を確保することでスフェロイ
ドが形成される (Fig. 2.1-A)。そのほかにも培養底面に培養細胞が接着したとしても底面の
接着性が弱い場合、細胞-基板間相互作用より細胞内で働く力学的作用によって細胞の遊走
現象によって培養細胞同士が集合し合いスフェロイドを形成する (Fig. 2.1-B)。

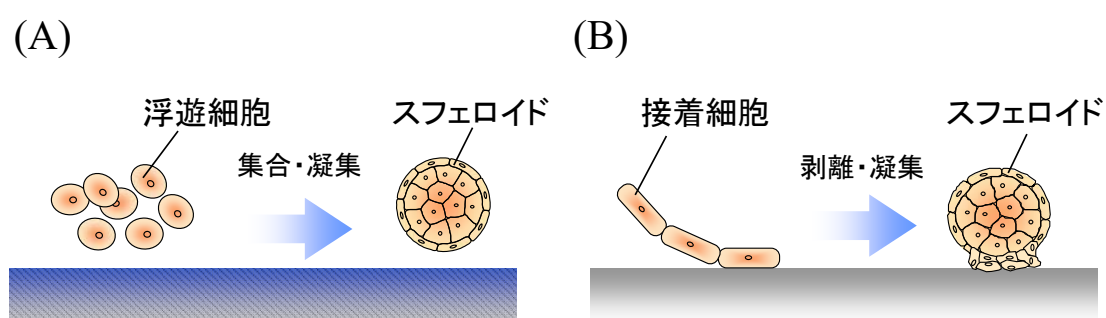


Fig. 2.1. スフェロイド形成過程。(A) 細胞非接着面上での形成 (B) 低接着面上での形成。

このようにスフェロイド培養においては培養底面の細胞接着性に依存した細胞-細胞間相
互作用と細胞-基板間相互作用のバランスの制御が重要となる。本節ではこれまでに報告さ
れてきた「汎用的なスフェロイド培養技術」について紹介する。

2.2.2. 汎用的なスフェロイド形成法

一般的にスフェロイド形成技術においては 1.4 節で述べたように「単一スフェロイドをターゲットとした研究」と「スフェロイドを大量形成させる培養技術の開発」が挙げられ、目的に応じて様々な培養技術が利用されている (Fig. 2.2)。単一スフェロイドの形成技術としては液滴内あるいはウェル内に個々のスフェロイドを形成させるハンギング・ドロップ法や U 字底プレート培養法などが挙げられる[13]。これらの培養法は培養空間をセパレートすることでスフェロイドを形成しており、播種細胞数を変えることで容易にスフェロイドサイズを制御でき、個々のスフェロイド特性の解析を可能としている。一方で、スフェロイドを大量形成させる手法としては細胞非接着担体内に細胞懸濁液を入れて細胞同士が衝突しあうことでスフェロイドを形成させる浮遊培養法が報告されている[14]。またスフェロイドをより効率的に形成させるために細胞懸濁液を細胞非接着担体内で旋回させる浮遊旋回培養法などが開発され、Yamamoto らはバイオリアクターを利用して iPS 由来心筋細胞を大量培養し、移植用の心筋細胞シートへと展開させている[15]。このほかにも培養基板上に微細な凹凸構造をプリンティングさせることで細胞遊走を促せ、基板上に多数のスフェロイドをランダムに形成させる微細構造基板法などが報告されている[16, 17]。

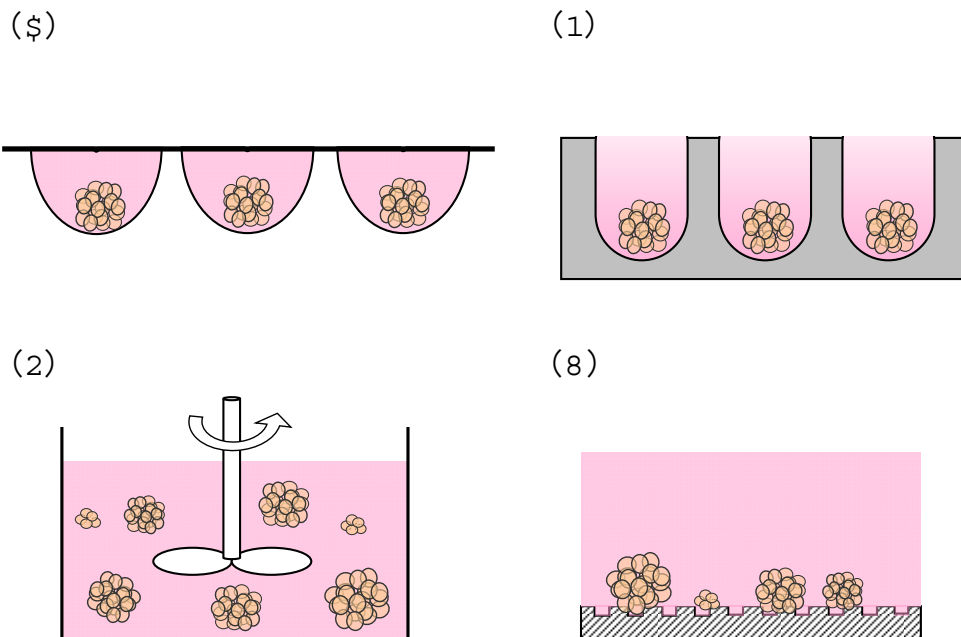


Fig. 2.2. 汎用的なスフェロイド培養技術。(A) ハンギング・ドロップ法、(B) U 字底プレート法、(C) 浮遊旋回培養法、(D) 微細構造基板法。

2.2.3. マイクロパターンニングスフェロイド培養法

スフェロイドをアレイ化させる技術の一つに培養基板上的細胞接着/非接着部位を制御する細胞パターンニング技術が挙げられる (Fig. 2.3)。細胞は特定の amino 酸配列 (アルギニン、グリシン、アスパラギン酸 ; Arg-Gly-Asp, RGD) を認識して接着することが知られている [18]。一方で細胞非接着面の形成としては様々な生体適合性高分子の利用が挙げられる。例えば、排除体積効果によってタンパク吸着を抑制するポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG)、生体膜表面を模倣する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; MPC)、親水性の高いハイドロゲルを形成するポリ 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (Poly 2-hydroxyethyl methacrylate : pHEMA) などが細胞非接着分子の代表例として挙げられる [19-21]。これらの分子の固定化は、物理吸着もしくは自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer; SAM) を作製する際に用いる金属-チオール結合などによって行われる [22]。実際に Otsuka らはコラーゲンと PEG 分子を利用して軟骨細胞スフェロイドのパターンニング培養技術を確立させている [23]。

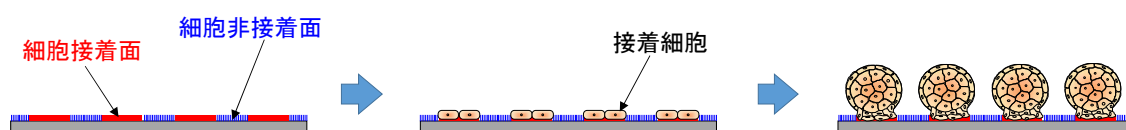


Fig. 2.3. 細胞接着/非接着部位の制御に伴うスフェロイドパターンニング培養の概念図。

また、近年では細胞接着性が低い培養基板上では一度細胞が接着するものの細胞遊走によって接着細胞が集合・凝集してスフェロイドを形成させる培養技術が報告されている。培養基板の細胞接着性を制御する手法としては基板表面特性 (アニオン/カチオンの極性や基板固さなど) や基板形状などによって細胞接着/進展を制御することが可能である。実際にポリアクリルアミドやコラーゲンゲルなどを利用した細胞弾性率の影響 [24, 25]、ナノピラー構造やハニカム構造などを利用した基板形状の影響 [26]、温度応答性ポリマーとして広く利用されているポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (poly-N-isopropylacrylamide ; PIPPA) やプラズマ処理を利用した基板表面の官能基による影響によって細胞接着性を制御する技術が報告されている [27]。これらの表面特性の異なる培養基板を有するウェルプレートあるいはナノプリンティングによって設計することでスフェロイドを形成させる技術が近年多く報告されている。Takayama らはナノピラーを有するウェルプレートを利用して iPS 由来肝細胞スフェロイドを形成すると従来の肝細胞株スフェロイドと同程度の薬物代謝活性を有することを報告している [28]。このような細胞接着/非接着性を制御した培養基板作製法としては様々あり、細胞パターンニング技術を以下にまとめた。

(1) スポットティング技術

DNA チップやプロテインチップなどのバイオチップ開発による技術の進歩に伴い網羅的に基板上に固定化する方法が開発されており、この技術を応用させて ECM 溶液などを染み込ませたスポットティング部位を基板に直接形成させる、あるいはインクジェットプリンタを利用して ECM を規則的に固定化する技術が確立されている (Fig. 2.4-A)。実際に Watanabe らは複数の細胞増殖因子を同様の技術を用いて培養基板の作製に成功している [29]。

(2) ソフトリソグラフィ

ソフトリソグラフィ技術には、ハンコの原理を利用したマイクロコンタクトプリンティング技術や毛細管カリソグラフィ技術などが報告されている。これらの技術は目的に応じたマイクロパターンの鋳型を PDMS などのエラストマーによって作製し、作成した鋳型をスタンプとして利用している (Fig. 2.4-B)。Whitesides らは、親水化 PDMS スタンプによるマイクロコンタクトプリンティングによって 2 種類のアルカンチオール修飾に伴い細胞接着/非接着分子パターンニング基板を作製している。本基板上でウシ毛細管内皮細胞 (BCE Cs) を培養すると、表面設計に伴い細胞がパターンニングできることを報告している [30]。本研究室でも PSDM スタンプを用いたマイクロコンタクトプリンティング技術によって細胞接着部位 (コラーゲンやゼラチンなど) を Pt 蒸着基板上に形成し、その後細胞非接着分子である PEG 分子を修飾し細胞非接着面を有するマイクロパターンニングチップを作製している (具体的な手法は第 4 章で述べる)。この基板上で初代肝細胞を培養するとスフェロイドの位置関係性を任意に制御できることを報告している [31, 32]。

(3) フォトリソグラフィ

微細加工されたフォトマスクを利用して光酸化やプラズマエッチング、プラズマ処理によって細胞接着面 (あるいは細胞非接着面) を形成させることでマイクロパターンニング基板を作製する方法がある (Fig. 2.4-C)。Peng らはこのフォトマスクを利用してガラス基板上に金状に RGD をグラフト修飾させた細胞接着面を形成し、その他の表面を PEG-ハイドロゲルで修飾させることで間葉系幹細胞をフォトマスク形状と同じ培養形態をとらせたパターンニング培養法を報告し、また Yamada らはフォトマスクとプラズマ処理によってヒト iPS 細胞パターンニング培養について報告している [33, 34]。

(4) インテリジェントマテリアルを利用した細胞パターンニング技術

近年、ある特定波長のレーザー照射や温度を変化させることで高分子の立体構造を変化し細胞分子の接着性/非接着性を自由に制御できるインテリジェントマテリアルが利用されている (Fig. 2.4-D)。例えば Kikuchi らが開発した PEG を担持したポリニトロスピロピランメチルメタクリレート (pNSpMMA) 基板表面は UV 照射をすることで担持していた PEG

分子を除去し細胞接着性を自由に制御できることを報告しておく[35]。またインテリジェントマテリアルの多くの分子は外部刺激（光、温度、電気、磁気など）によって細胞接着/非接着性が可逆的に変化するため、この特徴を利用して捕捉した細胞を回収することが可能で、セルセレクションに応用できる技術である。

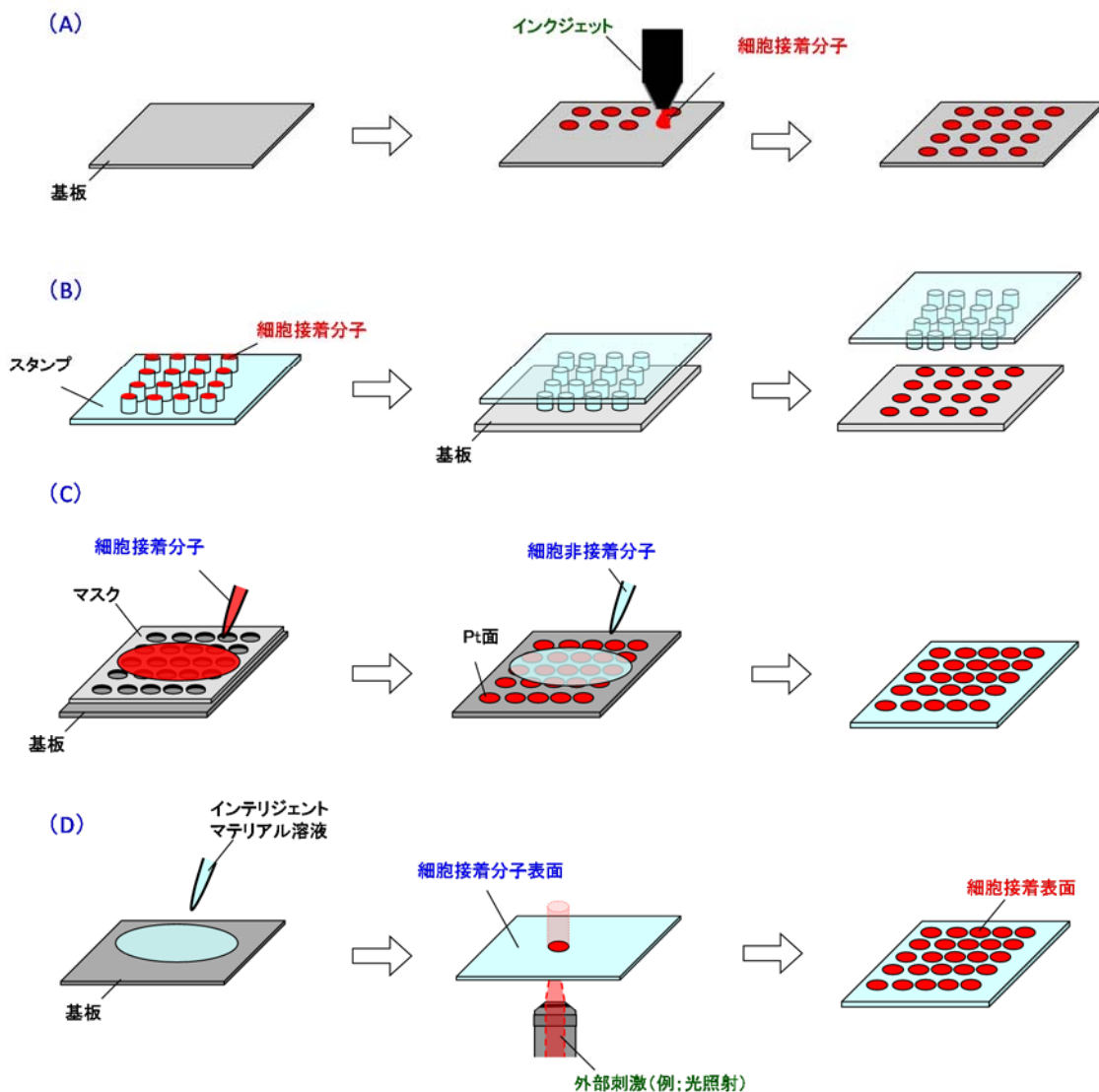


Fig. 2.4. 既存の細胞パターニング培養基板作製の概念図。(A) スポットニング技術、(B) ソフトリソグラフィ技術、(C) フォトマスクを利用したパターニング技術、(D) インテリジェントマテリアルを利用した細胞パターニング技術（光照射による細胞接着/非接着面の形成）。

また別のアプローチとして主に半導体分野などで利用されてきた微細加工技術を細胞培養分野へと発展させたモールドイング法の開発が行われている。実際にこのモールド径をマイクロ/ナノオーダーで形成しその表面を細胞非接着分子によって修飾することで血球細胞チップ（単一の血球細胞を微小空間にトラップさせた細胞チップ）や様々なサイズのスフェロイドを形成させる細胞チップの開発が機械工学の研究者を中心に粉われている。

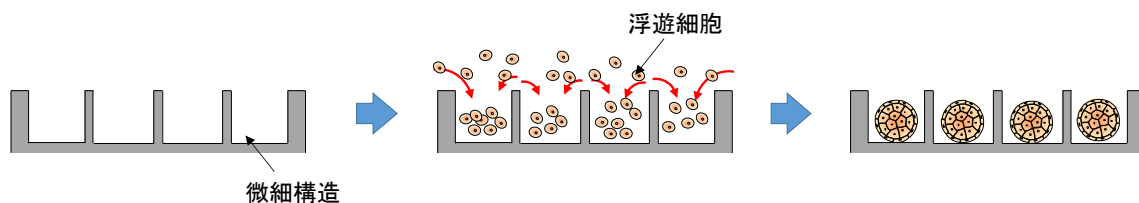


Fig. 2.5. 細胞接着/非接着部位の制御に伴うスフェロイドパターンニング培養の概念図。

本研究室においても微細加工技術および表面修飾技術を組み合わせ、2005年に福田（現横浜国立大学）らによって「マイクロウェルチップ」と呼ばれる細胞パターンニング技術を開発しウイスターラットより摘出した初代肝細胞のマイクロスフェアである「肝細胞スフェロイド」を形成させることを報告した[36]。このマイクロウェルチップはポリメタクリレート（PMMA）基板上に数百 μm 単位のウェル構造を規則正しく配列させたものであり、各ウェル内に個々のスフェロイドを形成させ、大量のスフェロイドを形成・培養させることが可能となる。このマイクロウェルチップではラット初代肝細胞以外にも肝芽腫瘍細胞株（HepG2 細胞）などの癌細胞や神経幹細胞、マウス ES 細胞など多様なスフェロイドを均一かつ大量に形成させることが出来る。また 2007 年には塚（現 長崎大学）らは様々な設計条件（ウェル間距離、チップ上のウェル数、ウェルあたりの細胞密度など）を変更させることで様々なサイズの HepG2 スフェロイドを形成出来ることを報告した（37, Fig. 2.6）。

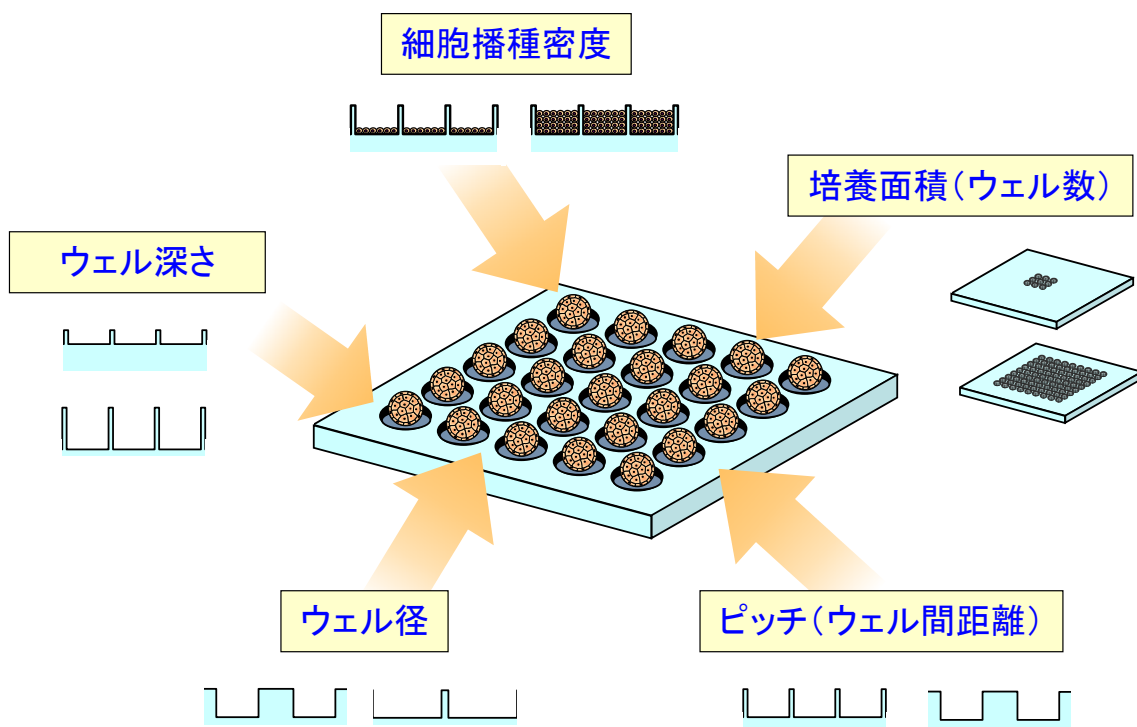


Fig. 2.6. マイクロスフェア特性に影響するマイクロウェルチップ設計条件

さらにマイクロウェルチップは多様な生体適合性材料を用いて作製することができ、例

例えば物質透過性の高いハイドロゲルの一つである「アガロースゲル」でも作製できた。マイクロウェルチップの材質は形成させるスフェロイド特性に影響を与える [38]。つまりマイクロウェルチップ培養は設計条件や細胞播種密度、基板材質といった様々な条件を制御することでスフェロイド周辺の培養環境を制御出来ることが期待できる。マイクロウェルチップで形成させたマウス ES スフェロイドおよびマウス神経幹細胞スフェロイドはマイクロウェルという微小空間内で形成させるため、そのウェル径に依存して細胞増殖能が変化することを 2010 年に堺（同上）らが報告している[39]。さらに 2013 年にはマウス ES 胚様体の分化特性はウェル径に依存する細胞増殖能に比例していくことを見出した[40]。

2.3. スフェロイド特性を制御するための様々な取り組み

*in vitro*でのスフェロイド培養は *in vivo* とのギャップが大きく、十分な機能発現あるいは効率的な分化誘導が促すことができない。その要因としては 1.2 節でも述べたようにスフェロイドを取り巻く細胞ニッチの影響が関連している。そこで近年では様々なアプローチを利用してスフェロイド特性を制御する技術が開発されている。そこで本節ではスフェロイド特性を制御する様々なアプローチについて紹介する。

2.3.1. スフェロイドサイズの作用

*in vivo*での組織・臓器は様々な細胞同士が結合し合うことで構造や機能を維持しており、*in vitro*においても同様に単一細胞に比べ細胞の集合体であるスフェロイドは生体応答性が高い。その要因としては細細胞間同士が結合することで細胞間コミュニケーションの向上すること、生体類似構造の形成/維持していることが考えられる。しかし単一細胞で形成されているスフェロイドは *in vivo*での組織・臓器とは異なり血管網を有しておらず、1.4 節で述べたようにスフェロイド内部では物質濃度勾配が形成される。これによって細胞を取り巻く細胞ニッチは大きく変化し、例えば酸素が供給できない中心部ではネクロシスが発生してしまう[41]。その他にも細胞間接着や ECM 濃度における相互作用(生化学的作用)や内部と外周部に存在する細胞におけるストレスファイバーの発達の違い(力学的作用)も発生してしまう (Fig.2.7)。これらの細胞ニッチはすべてスフェロイドサイズに依存しており、実際にスフェロイドサイズと細胞特性の関係性について多くの報告がされている。Nishikawa らは肝細胞特性とスフェロイドサイズの関係性を報告しており、Burrige らは 250 μm 程度の ES 細胞スフェロイドにおいて心筋細胞分化が特異的に促進されることを報告している[42]。

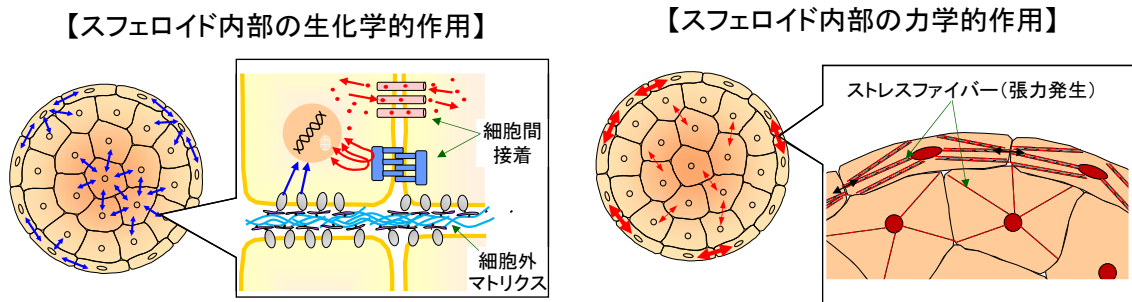


Fig. 2.7. スフェロイド内部における細胞ニッチの概念図。

2.3.2. 共培養の作用

*in vivo*における組織・臓器はあらゆる細胞が集合することで構築し、異種細胞との細胞間接着あるいは互いの細胞が分泌する生理活性因子のオートクライン/パラクラインによって刺激し合う。この現象を *in vitro* で再現させる手法として異種細胞との共培養法が挙げられる。共培養環境の形成は大きく分けて 2 種類挙げられる。一つは 2 種類以上の細胞を混合させるあるいは単一スフェロイド表面に異種細胞をコーティングさせた共培養スフェロイド技術であり、これは異種細胞間での細胞間コミュニケーション（直接接触）させることで方法である (Fig. 2.8-A)。もう一方の培養法としては同一培養系内で異種細胞をセルインサートのような透過性膜上で培養させるあるいはフィーダー細胞やほかの機能性細胞を培養させた培養培地 (コンディション培地) を用いてスフェロイドを培養させる手法が挙げられる (Fig. 2.8-B)。これらの培養法は単一スフェロイドでは分泌されないサイトカインやホルモンを異種細胞から培地を介して供給させるといった目的である。

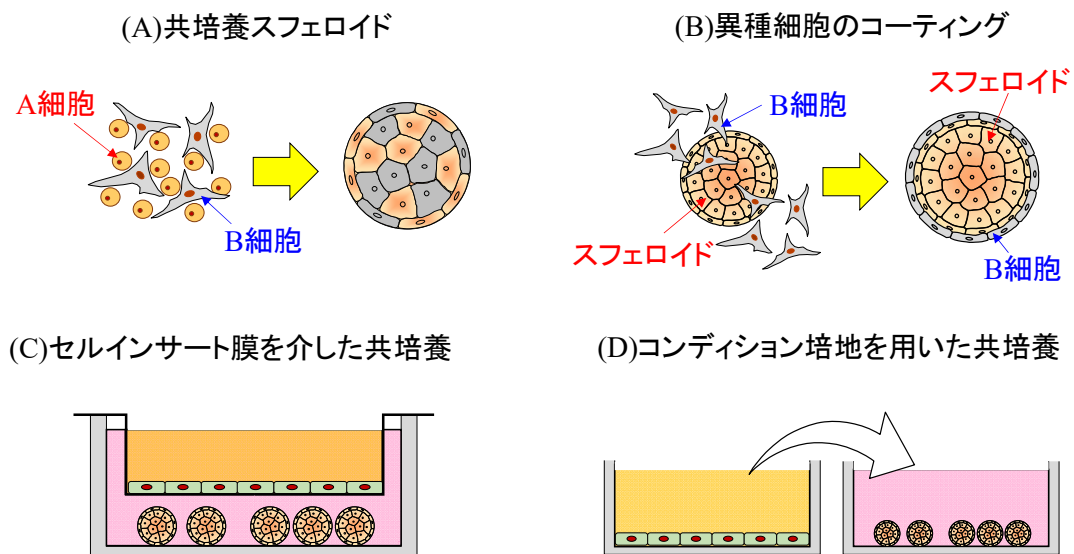


Fig. 2.8. 共培養技術の概略図。(A, B) 細胞接着を介した共培養、(C, D) 培地を介した共培養。

2.3.3. 培地成分の作用

*in vitro*でのスフェロイド培養系内の液性因子濃度は非常に低いため、様々な増殖因子やサイトカインを添加させ培養細胞の特異的特性を維持することが求められる。一般的に、培養細胞の増殖にはウシ胎仔血清（Fetal Bovine Serum ; FBS）は必要不可欠である。また増殖因子である肝細胞成長因子（HGF）や血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などは初代肝細胞や血管内皮細胞の増殖および機能発現には必要不可欠であるとともに、多能性幹細胞の分化特性を向上させる分化誘導因子としても利用されている。一方で、近年の再生医療研究においてはFBSや増殖因子などの動物由来物質では牛海綿状脳症（BSE）などの感染症が懸念されており、近年では動物由来成分の未使用（ゼノフリー）といった概念が確立され化学物質のみによって形成されたゼノフリー培地や遺伝子組み換えタンパク（EGFやFGFなど）の利用が国内外で行われている。国内の代表例としては京都大学と味の素が共同開発したヒトiPS細胞の増殖培地であるStemFit培地などが挙げられる[43]。このほかにも多能性幹細胞を中心に、多能性幹細胞分化抑制効果として働く遺伝子発現をKnock outあるいは促進効果のある遺伝子の過剰発現を促すために培養培地に小分子化合物やsiRNA、ウイルスベクターを添加させる手法が多く報告されている[44, 45]。

2.3.4. ECM成分/培養担体の作用

*in vivo*に存在する細胞間ではECMを足場に細胞特性を維持している。スフェロイドにおいても内部でECMの濃度分布による影響が知られ、線維芽細胞と肝細胞の共培養においてもコラーゲン産生に伴い肝細胞の高機能発現を誘導されると考えられている。このようにECMはスフェロイド特性を支配するうえで重要であるものの、線維芽細胞を除く単細胞スフェロイドではECM産性能が低くECM濃度が十分ではない。そのため近年ではスフェロイドを取り巻くECM足場を人為的に設けることが必要となり、その方法としてはスフェロイド内部および周辺部からのアプローチが挙げられる。スフェロイド内部のECM濃度を上げる方法としてはコラーゲンなどの微小粒子を細胞懸濁液に混和させてスフェロイドを形成させることでECM足場を確保させる方法が挙げられる。またスフェロイド外部のECM濃度に関してはスフェロイドパターニングにおけるECM部位やECMゲルを利用したスフェロイドの包埋、浮遊下でスフェロイドを形成しその後ECM基板上にスフェロイドを転写させる方法などが挙げられる[46, 47]。

*in vitro*における細胞足場としてはECM以外にもポリウレタンやポリエチルテレフタレートなどの有機材料やアルミナやハイドロキシアパタイトなどの無機材料、キチン/キトサ

ンやヒアルロン酸などの天然由来材料などで作製した多孔質足場を利用されている。これは接着面積や培養空間といった物理的因子によって細胞特性（細胞接着や細胞遊走能など）を制御に伴いスフェロイド形成させるアプローチである。さらに近年ではスフェロイド特性を制御するために多孔質と細胞特性の関係性（例えば軟骨細胞ならばヒドロキシアパタイト、歯根膜由来細胞ならばエナメル質やセメント質など）を利用する技術や多孔質内に生理活性物質（BMP など）を取り込ませ培養経過に伴い物質を除法させる技術などが利用されている[48]。

2.3.5. 酸素環境の作用

一般的に、培養培地内ではグルコース飽和濃度は 2.02×10^6 ppm に対して飽和酸素濃度はおよそ約 1/30 万の 6.68ppm と非常に低いため、ほとんどの培養系では十分な酸素供給が行うことができず、いかに培養細胞に酸素供給させるかが重要な課題とされている。Sakaiらは酸素透過性材料である PDMS を利用して培養細胞への酸素供給量を向上させ、実際に初代肝細胞スフェロイドや膵 β 細胞スフェロイドの機能発現を向上させている[49, 50]。さらに、スフェロイドへの酸素供給量を制御させるためにインキュベータなどの培養装置を利用して細胞周辺の酸素分圧を制御する取り組みも挙げられる。これらの酸素供給法はバルク内の酸素濃度を制御するものであるが、血管網を持たない単一スフェロイドではスフェロイド内部まで酸素が拡散に依存してしまうため十分な酸素供給は望めない。そこで近年ではスフェロイド内部に血管様ネットワーク構造を持たせるために血管構成細胞（血管内皮細胞や平滑筋細胞など）と共培養スフェロイドを形成させるあるいはスフェロイド内部に血管様構造と類似した物理的空間を形成させる手法が報告されている。実際に Kojimaらはスフェロイド形成時にハイドロゲルビーズなどを混入させることで内部に物理的空間を持たせ、スフェロイド内部への酸素供給量を向上させるといった方法を報告している[51]。

2.3.6. メカニカルストレスの作用

一方で、「機械的ストレスの制御」に関しては 1.2 節でも述べたように細胞は *in vivo* において様々な機械的ストレスを受けている。*in vivo* で発生するメカニカルストレスとしては骨組織に作用する重力や血管内で生じる血流や血圧による細胞周辺で生じる力学的作用、心臓での拍動や筋組織の収縮/弛緩など細胞自身の力学的作用が挙げられる。これらの力学的作用は組織・臓器の機能や構造、強度に関連しており、このような *in vivo* でのメカニカルストレスを *in vitro* で再現させる取り組みが行われている。例えばスフェロイド形成の一つである浮遊旋回培養で生じるせん断応力はスフェロイド特性に影響を与えることが考え

られており、実際に京都大学の山下教授らはせん断応力を制御して iPS 細胞スフェロイドの血管内皮細胞分化特性をコントロールできること報告されている[52]。このほかにも *in vitro* での取り組みとしては遠心分離を利用した加重作用、電気振動刺激、磁気ビーズの利用など主に機械工学的観点による培養材料および培養装置の開発によるものが多い。

2.4. 自発的微小培養環境と本研究の位置づけ

2.3 節で述べたようにスフェロイド特性の制御法としては様々なアプローチが存在する。これらのアプローチのほとんどはスフェロイド培養下において *in vivo* とのギャップが大きい環境因子（増殖因子や細胞足場、酸素など）を人為的に加えることで培養系内のバルク濃度を人為的に形成させるものである（Fig. 2.9）。現在の幹細胞研究でも *in vivo* 下に存在する生理活性物質（タンパクやサイトカイン、ホルモンなど）の物質濃度やその下流に存在する遺伝子発現の制御などを細胞外部より添加し刺激する生物学的アプローチと物質拡散や力学的作用を化学工学的あるいは機械工学的観点から制御する工学的アプローチを組み合わせた分化誘導法の開発が行われている。

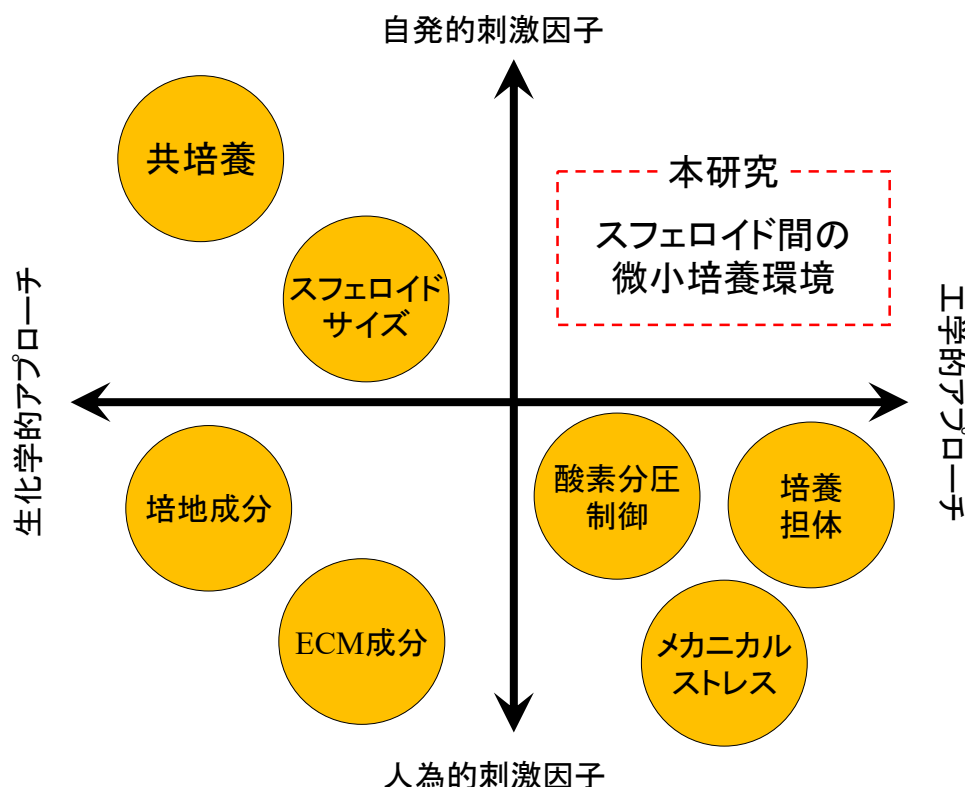


Fig. 2.9. スフェロイドを取り巻く微小培養環境制御技術と本研究の位置づけ。

一方で、*in vivo* に存在する細胞は周辺にある供給物質（グルコースや酸素など）を自身

のエネルギー産生に利用して生存や増殖などの細胞特性に利用している。さらに細胞は栄養源などを消費し代謝産物/老廃物として細胞外に放出、あるいはサイトカインやタンパク分泌によって様々な組織・臓器とのコミュニケーションをとり我々の健康を保つ働きをしている。このように細胞は自分自身の代謝活性の違いによって微小培養環境を形成することが考えられる。この現象は *in vivo* での培養細胞においても同様のことがいえ、特にスフェロイドは 1.4 節でも述べたように血管様ネットワークを持たないためにスフェロイド内部では物質の濃度勾配が生じてしまう。実際にスフェロイドサイズや共培養スフェロイドは単一あるいは複数の細胞が自身で形成する細胞ニッチによって分化特性は変化している。しかし既存のスフェロイド研究がターゲットとしている自発的細胞ニッチは単一スフェロイドのみである。しかし静置培養下においてスフェロイドが多数存在する場合、スフェロイド自身が消費した供給物質濃度やサイトカインやホルモン、乳酸などの分泌/代謝物の濃度勾配が形成されることが懸念される (1.4 節参照)。そのため、スフェロイド培養系においては培養系内のバルク濃度の制御以外にもスフェロイド自身が形成する自発的微小培養環境が存在し、本研究ではこのスフェロイド自身が形成する「スフェロイドニッチ」といった新たな研究領域をターゲットとした研究といえる。

【参考文献】

1. **Roskelley, C, D., Desprez, P, Y. and Bissell, M, J.:** Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 12378-12382, 1994.
2. **Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R. and MARCEAU, N.:** Spheroidal Aggregate Culture of Rat Liver Cells: Histotypic Reorganization, Biomatrix Deposition, and Maintenance of Functional Activities, *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, **101**, 914-923, 1985.
3. **Kamoya, T., Anada, T., Shiwaku, Y., Takano-Yamamoto, T. and Suzuki, O.:** An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Sensors and Actuators B*, **232**, 75–83, 2016.
4. **Hsu, S. and Huang, G, H.:** Substrate-dependent Wnt signaling in MSC differentiation within biomaterial-derived 3D spheroids. *Biomaterials*, **34**, 4725-4738, 2013.
5. **Lee, J, H., Han, Y, S. and Lee, S, H.:** Long-Duration Three-Dimensional Spheroid Culture Promotes Angiogenic Activities of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biomol Ther*, **24**, 260-267, 2016.
6. 赤松 和士.: 神経系の幹細胞生物学、再生医療業書 7 神経系, 株式会社 朝倉書店, pp.20-30、2013.
7. 大津 昌弘、中井 孝、井上 順雄.: ES 細胞からの神経幹細胞・神経細胞の分化-自給型分化誘導法によるヒト細胞の安定供給-, 幹細胞の分化誘導と応用, -ES・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線-, 株式会社エヌ・ティー・エス, pp.179-186, 2009.
8. **Chitcholtan, K., Sykes, P, H. and Evans, J, J.:** The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *Chitcholtan et al. Journal of Translational Medicine*, **10**, 1-16, 2012.
9. **Raghavan, S., Ward, M, R., Rowley, K, R., Wold, R, M., Takayama, S., Buckanovich, R, J. and Mehta, G.:** Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Author manuscript*, **138**, 181-189, 2015.
10. **Elbert, D, L.:** Bottom-up tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.*, **22**, 674-680, 2011.
11. **Tiruvannamalai-Annamalai, R., Armant, D, R. and Matthew, H, W, T.:** A Glycosaminoglycan Based, Modular Tissue Scaffold System for Rapid Assembly of

- Perfusable, High Cell Density, Engineered Tissue. *PLOS ONE*, **9**, e84287, 2014.
12. 尾上 弘晃、竹内 昌治.: ボトムアップ組織工学、*生物工学* **92**、161-165、2014.
 13. Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., and Kurosawa, H.: Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 294–299 (2007).
 14. Matsuura, K., Wada, M., Konishi, K., Sato, M., Iwamoto, U., Sato, M., Tachibana, A., Kikuchi, T., Iwamiya, T., Shimizu, T., Yamashita, J, K., Yamato, M., Hagiwara, N. and Okano, T.: Fabrication of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Layered Cardiac Cell Sheets Using a Bioreactor Culture System. *PLOS ONE*, **7**, e52176, 2012.
 15. Matsuura, K., Shimizu, T. and Okano, T.: Toward the Development of Bioengineered Human Three-Dimensional Vascularized Cardiac Tissue Using Cell Sheet Technology. *Int Heart J*, **55**, 1-7, 2014.
 16. Pan, Z., Yan, C., Peng, R., Zhao, Y., He, Y. and Ding, J.: Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns. *Biomaterials*, **33**, 1730-1735, 2012.
 17. Nikkhah, M., Edalat, F., Manoucheri, S. and Khademhosseini, A.: Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials*, **33**, 5230-5246, 2012.
 18. Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J. and Vacanti, J, P.: Micro scale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS*, **103**, 2480-2487, 2006.
 19. Satomi, T., Nagasaki, Y., Kobayashi, H., Otsuka, H. and Kataoka, K.: Density Control of Poly(ethylene glycol) Layer To Regulate Cellular Attachment. *Langmuir*, **23**, 6698-6703, 2007.
 20. Iwasaki, Y., Sawada, S., Ishihara, K., Khang, G. and Lee, H, B.: Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend. *Biomaterials*, **23** 3897–3903, 2002.
 21. Mrksich, M., Dike, L, E., Tien, J., Ingber, D, E. and Whitesides, G, M.: Using Microcontact Printing to Pattern the Attachment of Mammalian Cells to Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Transparent Films of Gold and Silver. *Experimental Cell Research*, **235**, 305–313, 1997.
 22. 竹中 繁織: 電流検出型 DNA チップ (第 1 編 第 3 章 第 3 節), バイオチップ 実用化ハンドブック, 株式会社エヌ・ティー・エス, pp.81-96, 2010.
 23. Otsuka, H., Nagamura, M., Kaneko, A., Kutsuzawa, K., Sakata, T. and Miyahara, Y.: Chondrocyte spheroids on microfabricated PEG hydrogel surface and their noninvasive functional monitoring. *Sci. Technol. Adv. Mater*, **13**, 1-8, 2012.

24. **Nemir, S. and West, J. L.:** Synthetic Materials in the Study of Cell Response to Substrate Rigidity. *Annals of Biomedical Engineering*, **38**, 2-20, 2010.
25. **Ochsner, M., Textor, M., Vogel, V. and Smith, M. L.:** Dimensionality Controls Cytoskeleton Assembly and Metabolism of Fibroblast Cells in Response to Rigidity and Shape. *PLoS ONE*, **5**, e9445, 2010.
26. **Tanaka, M., Nishikawa, K., Okubo, H., Kamachi, H., Kawai, T., Matsushita, M., Todo, S. and Shimomura, M.:** Control of hepatocyte adhesion and function on self-organized honeycomb-patterned polymer film. *Physicochem. Eng. Aspects*, **284**, 464-469, 2006.
27. **Asakawa, N., Shimizu, T., Tsuda, Y., Sekiya, S., Sasagawa, Yamoto, M., Fukai, F. and Okano, T.:** Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials*, **31**, 3903–3909, 2010.
28. **Takayama, K., Kawabata, K., Nagamoto, Y., Kishimoto, K., Tashiro, K., Sakurai, F., Tachibana, M., Kanda, K., Hayakawa, T., Furue, M. K. and Mizuguchi, H.:** 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, **34**, 1781-1789, 2013.
29. **Watanabe, K., Miyazaki, T. and Matsuda, R.:** Growth Factor Array Fabrication Using a Color Ink Jet Printer. *Zoological Science*, **20**, 429-434, 2003.
30. **Kane, R. S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D. E. and Whitesides, G. M.:** Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*, **20**, 2363-2376, 1999.
31. **Mori, R., Sakai, Y. and Nakazawa, K.:** Micropatterned Organoid Culture of Rat Hepatocytes and HepG2 Cells. *J. Biosci. Bioeng*, **106**, 237-242, 2008.
32. **Tamura, T., Sakai, Y., and Nakazawa, K.:** Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip. *J Mater Sci: Mater Med*, **19**, 2071-2077, 2008.
33. **Peng, R., Yao, X. and Ding, J.:** Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials*, **32**, 8048-8057, 2011.
34. **Yamada, R., Hattori, K., Tagaya, M., Sasaki, T., Miyamoto, D., Nakazawa, K., Sugiura, S., Kanamori, T. and Ohnuma.:** Plasma-Patterned Polydimethylsiloxane Surface With Single-Step Coating with a Mixture of Vitronectin and Albumin Enables the Formation of Small Discs and Spheroids of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Plasma Medicine*, **4**, 165-176, 2014.
35. **Kikuchi, K., Sumaru, K., Edahiro, J., Ooshima, Y., Sugiura, S., Takagi, T. and Kanamori, T.:** Stepwise Assembly of Micropatterned Co-cultures Using

- Photoresponsive Culture Surfaces and Its Application to Hepatic Tissue Arrays. *Biotech. Bioeng.*, 103, 552-561, 2009.
36. **Fukuda, J., Sakai, Y. and Nakazawa, K.:** Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing. *Biomaterials*, 27, 1061-1070, 2006.
 37. **Sakai, Y. and Nakazawa, K.:** Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips. *Biomaterials*, 3, 1033-1040, 2007.
 38. **宮本大輔、 中澤浩二:** スフェロイド培養器 (第 2 編 第 1 章 1 節), 三次元ティッシュエンジニアング細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで, 株式会社エヌ・ティー・エス, pp.189195, 2015.
 39. **Sakai, Y., Yoshida, S., Yoshiura, Y., Mori, R., Tamura, T., Yahiro, K., Mori, H., Kanemura, Y., Yamasaki, M., and Nakazawa, K.:** Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 223–229, 2010.
 40. **Nakazawa, K., Yoshiura, Y., Koga, H. and Sakai, Y.:** Characterization of mouse embryoid bodies cultured on microwell chips with different well sizes. *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 628-633, 2013.
 41. **Anada, T., Fukuda, J., Sai, Y., Suzuki, O.:** An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids, *Biomaterials*. 33, 8430-8441, 2012.
 42. **Burridge, P, W., Anderson, D., Priddle, H., Muñoz, M, D, B, Chamberlain, S., Allegrucci, C., Young, L, E. and Denning, C.:** Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability. *STEM CELLS*, 25, 929-938, 2007.
 43. **Miyazaki, T., Isobe, T., Nakatsuji, N. and Suemori, H.:** Efficient Adhesion Culture of Human Pluripotent Stem Cells Using Laminin Fragments in an Uncoated Manner. *Scientific RepoRts*, doi: 10.1038/srep41165, 2017.
 44. **Touboul, T., Hannan, N, R, F., Corbineau, S., Martinez, A., Martinet, C., Branchereau, S., Mainot, S., Strick-Marchand, H., Pedersen, R., Santo, J, D., Weber, A. and Vallies, L.:** Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells Under Chemically Defined Conditions that Recapitulate Liver Development. *HEPATOLOGY*, 51, 1754-1765, 2010.
 45. **Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Tashiro, K., Katayama, K., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M, K. and Mizuguch, H.:** Efficient and Directive Generation of Two Distinct Endoderm Lineages from Human ESCs and iPSCs by Differentiation

- Stage-Specific SOX17 Transduction. *PLoS ONE*, **6**, e21780, 2011.
46. **Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V. and Wobus, A. M.:** Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells into Cardiomyocytes. *Circ Res*, **91**, 189-201, 2002.
 47. **Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Stern-straeter, J., Bran, G., Hormann, K. and Riedel, F.:** Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, **21**, 271-279, 2008.
 48. **Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y.:** Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and b-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, **26**, 4856–4865, 2005.
 49. **Hamon, M., Hanada, S, Fujii, T., and Sakai, Y.:** Direct Oxygen Supply With Polydimethylsiloxane (PDMS) Membranes Induces a Spontaneous Organization of Thick Heterogeneous Liver Tissues From Rat Fetal Liver Cells In Vitro, *Cell Transplantation*, **21**, 401–410, 2012.
 50. **Shinohara, M., Kimura, H., Montagne, K., Komori, K., Fujii, T. and Sakai, Y.:** Combination of Microwell Structures and Direct Oxygenation Enables Efficient and Size-Regulated Aggregate Formation of an Insulin-Secreting Pancreatic b-Cell Line. *Biotechnol. Prog.*, **30**, 178-187, 2014.
 51. **Kojima, N., Takeuchi, S. and Sakai, Y.:** Fabrication of microchannel networks in multicellular spheroids. *Sensors and Actuators B*, **198**, 249–254, 2014.
 52. **Yamamoto, K., Sokabe, T., Watabe, T., Miyazono, K., Yamashita, J. K., Obi, S., Ohura, N., Matsushita, A., Kamiya, A. and Ando, J.:** Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H1915–H1924, 2005.

第3章：シングル/マルチ-スフェロイド培養における

幹細胞分化の分化特性

3.1. 本章の目的

多能性幹細胞である ES/iPS 細胞の分化誘導法の一つである「スフェロイド培養」は初期分化のトリガーを誘導させることから効率的な分化誘導技術として期待されている。そこで筆者らも均一なスフェロイド形成技術として 2.2 節でも述べたように均一かつ大量のスフェロイドを形成させる技術としてマイクロウェルチップ培養を開発している。このチップ培養は従来の一量量の細胞懸濁液（液滴）をぶら下げて培養するハンギング・ドロップ法（HD 法）や個々のウェル内にスフェロイドを形成させる U 字型プレート法とは異なり、マイクロウェルチップ培養では培養系内に多数のスフェロイドが存在する。ここで培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合、スフェロイド近傍で形成される微小培養環境は幹細胞分化特性に影響するファクターであるものの、既存のスフェロイド研究ではこのような観点からアプローチする研究はほとんど挙げられていない。これらの背景から、マイクロウェルチップ培養ではこれまでとは異なる幹細胞分化特性を示すことが考えられる。

そこで本章では、マウス ES/iPS スフェロイド近傍の微小培養環境による分化特性への影響およびその影響因子の探索を目的とした。具体的には、3.2 節では個々のスフェロイドを形成する従来法（ハンギング・ドロップ法：HD 法）と多細胞パターンニング技術の一つであるマイクロウェルチップ培養を比較することで、スフェロイド近傍の微小培養環境の違いが幹細胞分化特性に与える影響について評価した。また 3.3 節ではスフェロイド近傍の微小培養環境によって生じる分化特性の変化の要因として分泌糖タンパクである Wnt タンパクに着目し、Wnt タンパクの発現と微小培養環境の関係性について検討した。

3.2. 幹細胞分化におけるスフェロイドサイズの効果

3.2.1. 本節の目的

血管様構造を持たないスフェロイドは酸素や栄養素などの供給物質や代謝物質は物質の拡散によって制御される。そのためスフェロイド内部における微小培養環境はスフェロイドサイズを制御することが求められる[1,2]。それは Koike らの報告のように、マウス ES 細胞はスフェロイドサイズの違いによって幹細胞分化特性に相違があることに起因する[3]。

そこで、本節では、スフェロイド初期サイズを導入細胞数によって制御することができることから、スフェロイド間干渉作用の有無における影響に焦点を当てることができこれまでの幹細胞研究とは全く異なるアプローチにおける概念を提供することができる。また、マイクロウェルチップおよび HD 法で形成されたマウス iPS スフェロイドの増殖能や分化特性などの評価を行い、そのマイクロウェルチップ培養が幹細胞特性にもたらす影響を評価した。

3.2.2. 実験方法

3.2.2.1. マイクロウェルチップの作製

24×24mm 角のポリメチルメタクリレート (PMMA) 基板の上に 195 個のマイクロウェル構造を有するマイクロウェルチップを微細加工機 (PMT Corp.) によって作製した (Fig. 3.1)。マイクロウェルの構造はウェル径およびウェル深さを $600\ \mu\text{m}$ とし、ウェル間距離を $660\ \mu\text{m}$ としている (Fig. 3.1)。このチップ表面を Pt 蒸着した後に金属-チオール結合を介して細胞非接着分子であるポリエチレングリコール (PEG, 日油) を修飾した (Fig. 3.2)。

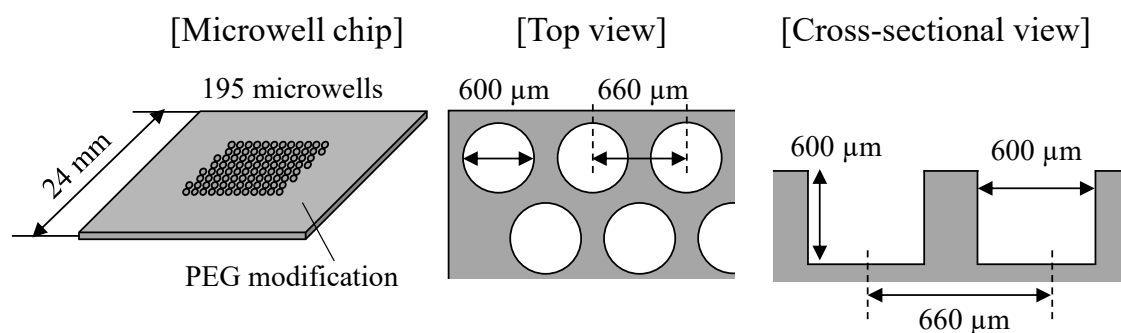


Fig. 3.1. マイクロウェルチップ設計条件。

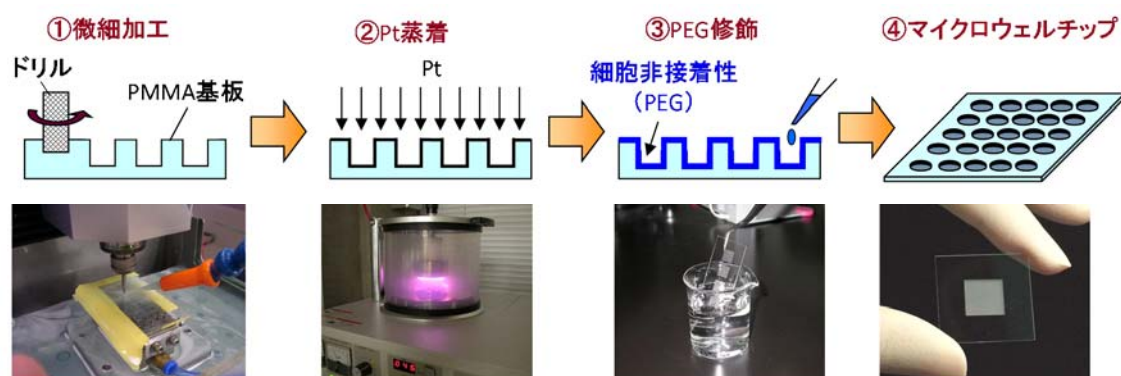


Fig. 3.2. マイクロウェルチップ作製工程。

3.2.2.2. マウス iPS 細胞培養

マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17, 理研) をマウス胚性線維芽細胞 (MEF; ReproCELL) 上で DMEM 培地を用いて 3 日間単層培養を行った。このときの DMEM 培

地においては DMEM 基本培地 (MILLIPORE) 500mL に対して非必須アミノ酸 (MILLIPORE) 5mL、100×SPG (Gibco) 5mL、2-メルカプトエタノール (MILLIPORE) 5mL、血清 (MILLIPORE) 75mL を混合させた培養培地を使用している。単層培養におけるマウス iPS 細胞では未分化状態を維持させたままでの細胞増殖を目的としているため培養培地に対して LIF (Wako Pure Chemical Industries) を 1000unit/mL を添加して未分化培養を行った[4]。

培養 3 日目におけるマウス iPS 細胞を 1×PBS で 2 回洗浄後トリプシン溶液 (Gibco) 500 μ L を添加して剥がし細胞懸濁液を調整後、前日プレインキュしていたマイクロウェルチップ内に播種した。マイクロウェル部分に PDMS で作製した枠の部分に各細胞密度に調整した細胞懸濁液 (Table 2) を添加し 2~3 時間後、マイクロウェル内に細胞が沈殿していることを確認して PDMS 枠を滅菌済みのピンセットで外し、ガラス板を用いて 3 日間マイクロウェルチップを培養ディッシュごと傾け自発的にスフェロイドを形成させた (Fig. 3.3)。培養 3 日後ガラス板を取り除きさらに静置状態で 7 日間培養を行った。

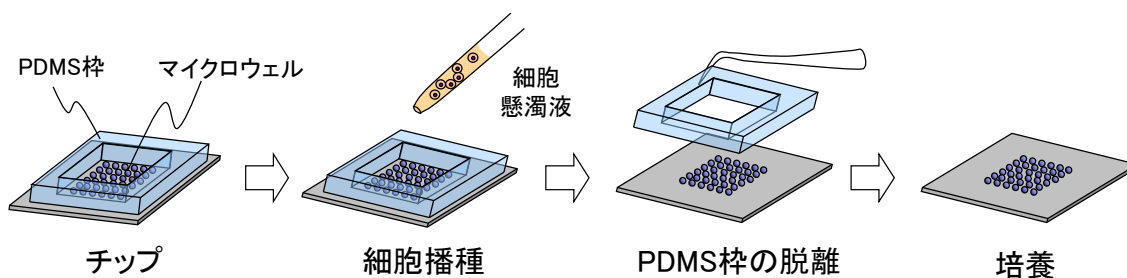


Fig. 3.3. マイクロウェルチップへの播種工程の概略図。

同じく培養 3 日目におけるマウス iPS 細胞を上記の操作で剥がし、細胞懸濁液を調整後、8 連ピペットを用いてマイクロウェルチップと同様の細胞密度 (100cells、500cells、1000cells、2000cells/drop) になるように 20 μ L の液滴内でスフェロイドを形成し培地交換をしないまま 10 日間培養した。

Table 2. iPS スフェロイドサイズと播種細胞数

Condition	Cell number per microwell	Cell number per chip
EB-100	100 cells/well	1.95×10^4 cells/chip
EB-500	500 cells/well	9.75×10^4 cells/chip
EB-1000	1000 cells/well	1.95×10^5 cells/chip
EB-2000	2000 cells/well	3.90×10^5 cells/chip

3.2.2.3. LOX-1 染色

スフェロイド内部の酸素状態を評価するために低酸素プローブ (Lox-1, SCIVAX Life Sciences, Japan) で染色した[6]。染色液は DMEM 培地に 4.9mL に Lox-1 染色液を 100 μ L 添加し、最終濃度を 20 μ g/mL とした。培地交換の際に染色液に変更し、24 時間前培養を行った。前培養後蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000; Keyence) を用いて解析を行った。

3.2.2.4. スフェロイド増殖能

培養経過に伴うスフェロイドサイズの変化を評価するため、培養 1、3、5、7、10 日目における各チップにおける位相差顕微鏡写真からそれぞれ 30 個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト (Win ROOF Ver 5.02; Mitani Corp., Japan) を利用してスフェロイドの粒径を測定した。スフェロイドの直径は、スフェロイドの面積から等価円直径 (equivalent circle diameter; ECD) 法により算出した。

また細胞数測定に関しては本研究室で改良を行った DNA-DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 蛍光測定法を利用して、各培養日数における細胞数を測定した[5]。TEN buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5) に 100 μ g/mL proteinase K (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加して DNA 抽出液を調製した。DNA 抽出液で細胞を 37 $^{\circ}$ C で 24 時間以上インキュベートして溶解させ、DNA を抽出した。TEN buffer に 1 μ g/mL の DAPI (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加した DAPI 溶液と抽出した DNA 溶液を 100 μ L ずつ 96 ウェルプレート内で混合し、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent Thermo Labssystem; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) で測定した (Ex. 355 nm / Em. 460 nm)。サスペンションから抽出した DNA 溶液を用いて検量線を作成し、検量線を用いて測定した吸光度から EB あたりの細胞数を算出した。

3.2.2.5. 遺伝子解析

Total RNA は各条件の培養細胞を spin column (NucleoSpin RNAII; Nippon Genetics Co. Ltd.)を用いて説明書どおりに抽出した。cDNA は a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)を用いて説明書どおりに 20 μ g/mL の濃度で調製した。各サンプルはリアルタイム RT-PCR によって測定するまで-20 $^{\circ}$ Cで保管した。PCR 解析においては StepOne Real-time PCR 装置を用いて cDNA と TaqMan Gene Expression Assay Kits (Applied Biosystems)と反応させ、解析した。各遺伝子の発現比は

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm99999915_g1) をハウスキーピング遺伝子として解析プロトコールの一つである $\Delta\Delta$ CT法を用いて解析を行った。解析した遺伝子としては特異的分化マーカー遺伝子；肝分化マーカー遺伝子であるトランスサイレチン；TTR (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm00443267_m1) および α フェトプロテイン；AFP (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm00431715_m1)、心筋分化マーカー遺伝子である NK2 転写因子；Nkx2.5 (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm00657783_m1) および α ミオシン重鎖； α MHC (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm00440354_m1)、血管分化マーカー遺伝子である胎児肝臓キナーゼ 1；Flk1 (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm01222419_m1) および血小板成長因子受容体 β ；PDGFR β (Taqman プ ロ ー ブ 、 Mm00435546_m1) である。各遺伝子発現比については播種前に調製したマウス iPS 細胞の発現比を 1 とし発現比の変化を比較した。

3.2.2.6. 統計処理

データは平均±標準偏差で示し、各データは 3 点の比較を行っている。統計処理に関しては一元分散分析を行った。また $P < 0.05$ の値は統計的に有意であると考えられる。

3.2.3. 実験結果および考察

3.2.3.1. スフェロイド形成と LOX-1 染色

各チップ条件において播種された iPS 細胞はすぐに集合・凝集化をはじめ、培養 1 日以内にスフェロイドを形成した。その後、幹細胞はスフェロイド形態を維持したまま増殖した (Fig. 3.4)。HD 法において 500cells 以上の条件では培養 3 日目で EB 100 に比べると明らかに異なる高密度に細胞が集積化されたスフェロイドを形成した。さらに培養 7 日目には 500cells 以上の条件でほぼ同等のスフェロイドサイズを形成し、どのサイズにおいてもスフェロイドの一部において細胞密度の低い yolk-sac 構造とも呼ぶべき特殊な細胞形態を示した (Fig. 3.4-A)。一方でマイクロウェルチップ培養では 1000cells 以下の条件では、培養経過に伴ってスフェロイド中心部に周辺部とは明らかに異なる高密度に細胞が集積化された領域が出現した。これに対し、EB 2000 の条件では培養初期から高密度細胞領域から観察された。また 100cells で形成されたスフェロイドは培養 3 日目まではほかの 3 条件と同様の形態を示したものの、培養 7 日目には HD 法で形成したスフェロイドと同様に yolk-sac 構造を持つスフェロイドを形成した (Fig. 3.4-B)。

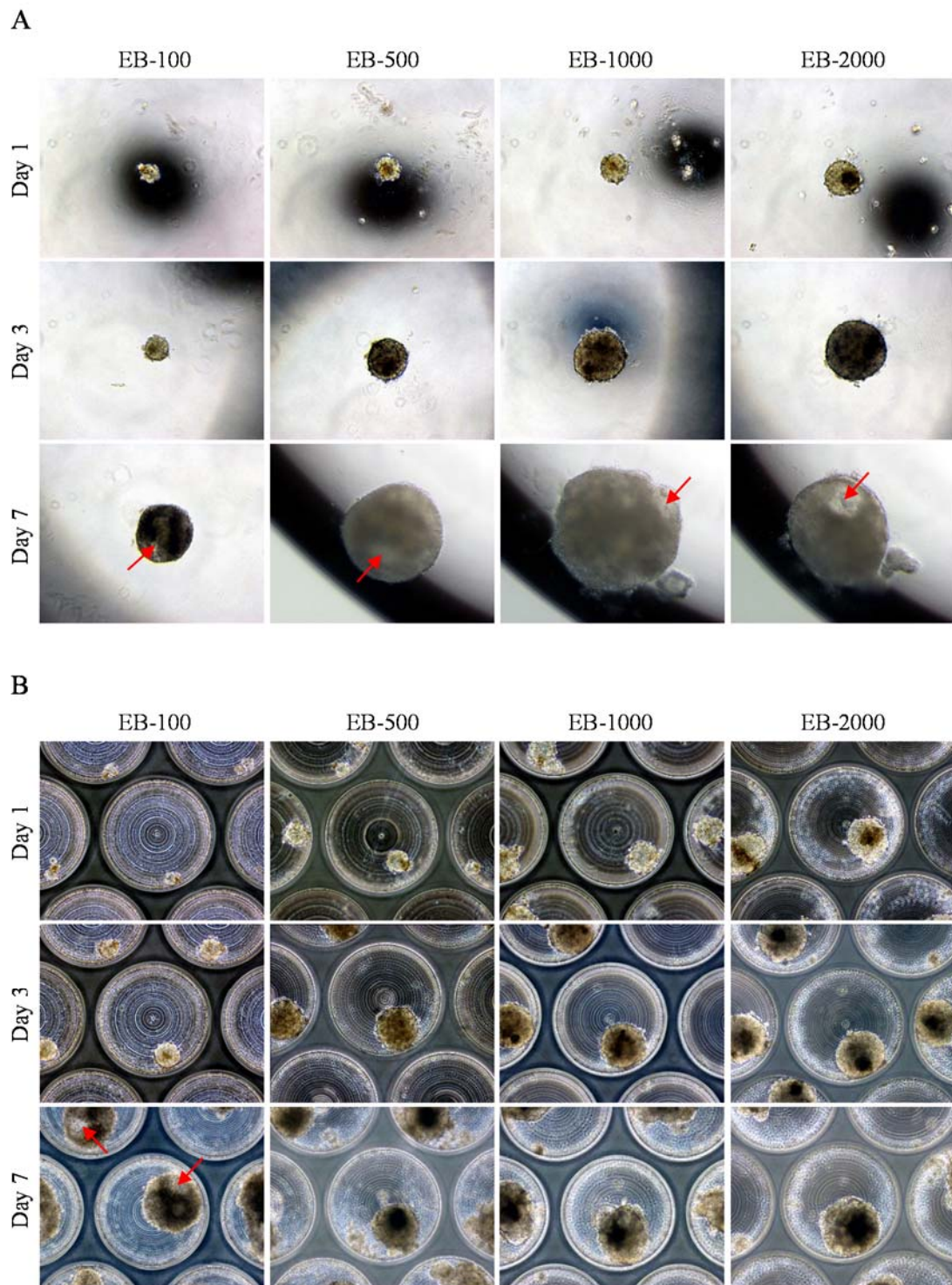


Fig. 3.4. 培養経過に伴うマウス iPS スフェロイド形態の変化、(A) HD 法、(B) マイクロウェルチップ培養。スケール ; 500 μ m、赤矢印 ; yolk-sac 構造。

次にマイクロウェルチップ培養で形成したスフェロイド内部の酸素化状態を把握するた

めに、低酸素プローブ (Lox-1) 染色を行った (Fig. 3.5)。培養 3 日目において 100cells 以下の条件では低酸素状態はみられなかったが、500cells 以上の条件ではスフェロイド中心部において低酸素状態が確認された。特に EB 2000 では顕著な低酸素状態が観察された。培養 7 日目ではすべての条件において、スフェロイド中心部の低酸素状態が確認されたが、EB 100 では細胞密度の低い yolk-sac 構造の部分では低酸素状態が緩和された。

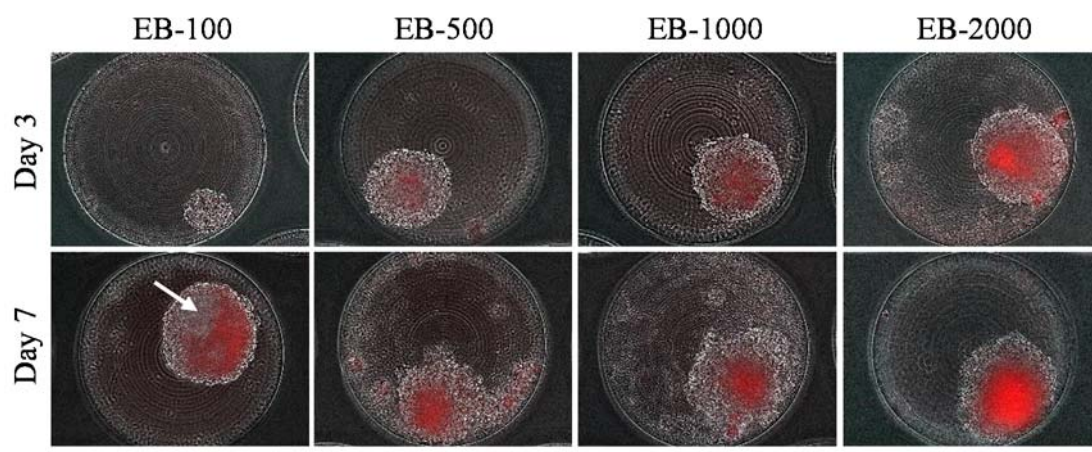


Fig. 3.5. 培養 3、7 日目におけるマウス iPS スフェロイド内部の低酸素状態 (Lox-1 染色, Red)。スケール ; 500 μ m、白矢印 ; yolk-sac 構造。

3.2.3.2. スフェロイド増殖能の変化

Fig. 3.6 にスフェロイドサイズの変化を示す。培養 1 日目の HD 法で形成したスフェロイドサイズは、EB 100 条件では 80 μ m、EB 500 条件では 110 μ m、EB 1000 条件では 150 μ m、EB 2000 条件では 200 μ m であり、播種細胞数に応じたスフェロイドが形成された。その後、細胞増殖に伴ってスフェロイドサイズは増加し、1000cells 以下で形成したスフェロイドは導入細胞数に依存してそれぞれ 400、600、550 μ m となり EB 500 で最も大きいスフェロイドを形成した。一方で EB 2000 では培養 5 日目以降で細胞増殖能が抑制され、培養 10 日目には EB 1000 と同等のスフェロイドを形成した。またマイクロウェルチップ培養で形成したスフェロイドは培養 1 日目のスフェロイドサイズは、EB 100 条件では 80 μ m、EB 500 条件では 110 μ m、EB 1000 条件では 150 μ m、EB 2000 条件では 200 μ m であり、播種細胞数に応じたスフェロイドが形成された。その後、細胞増殖に伴ってスフェロイドサイズは増加したが、すべての条件において培養 5 日目には約 250 μ m のスフェロイドとなり、その後、300 μ m に達した。

すべての条件で同等のスフェロイドサイズを形成したマイクロウェルチップ培養法で形成したスフェロイドの培養経過に伴うスフェロイド当りの細胞数を評価した結果、播種細胞数に依存してスフェロイド構成細胞数が増加したが、EB 1000 と EB 2000 条件ではほぼ

同レベルであった (Fig. 3.7-A)。ここで、スフェロイドサイズと細胞数から算出されるスフェロイド内細胞密度を比較すると、培養初期ではすべての条件において高密度なスフェロイドが形成されていたが、EB 100 の条件では培養経過に伴ってスフェロイド内の細胞密度が著しく低下した (Fig. 3.7-B)。これらの結果は、播種密度に応じて細胞密度の異なるスフェロイドが形成されることを示す。

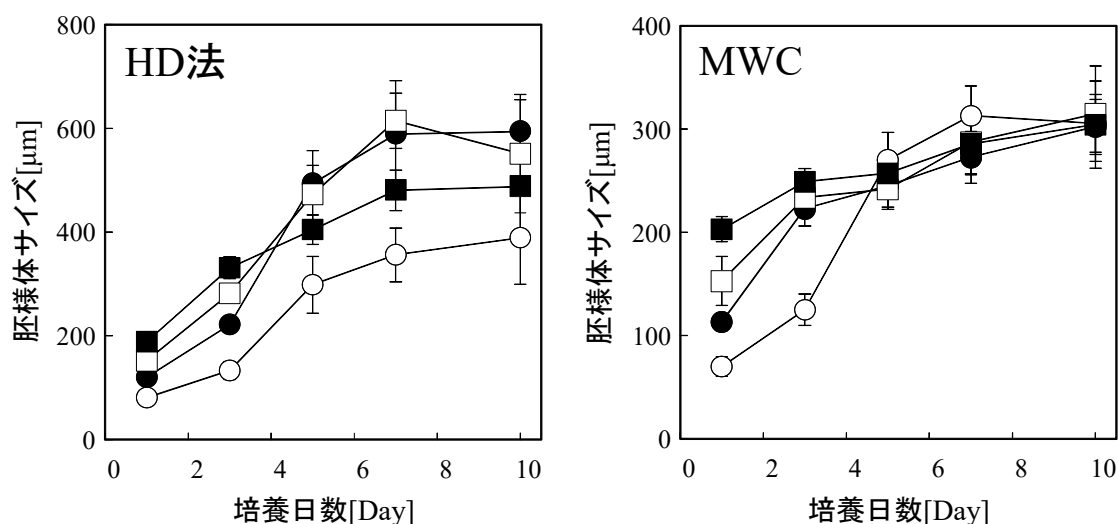


Fig. 3.6. 培養経過に伴う HD 法とマイクロウェルチップ (MWC) におけるマウス iPS スフェロイドサイズ変化。(○ ; EB-100、● ; EB-500、□ ; EB-1000、■ ; EB-2000)。

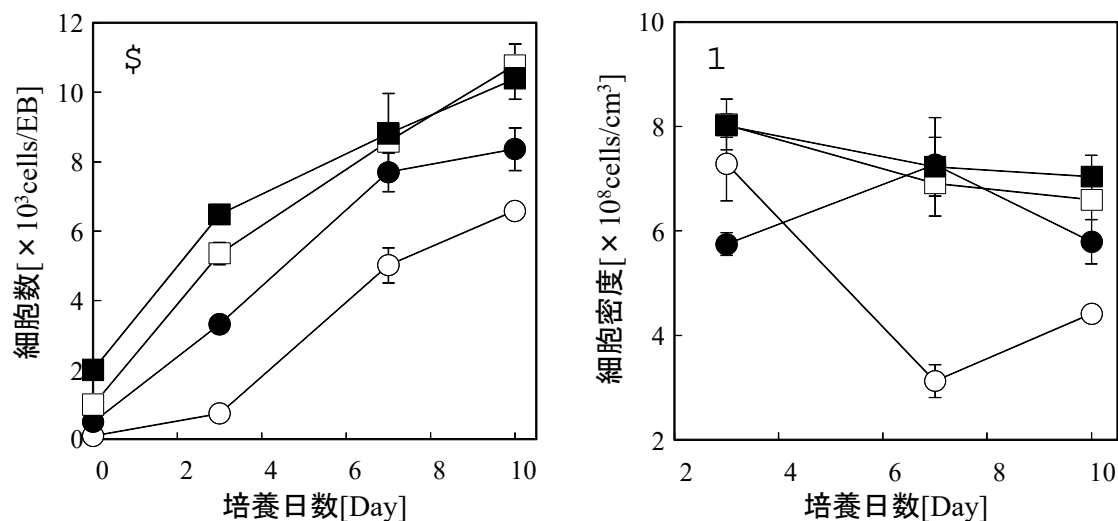


Fig. 3.7. 培養経過に伴う MWC におけるマウス iPS スフェロイドの (A) 細胞数変化、および (B) 細胞密度変化。(○ ; EB-100、● ; EB-500、□ ; EB-1000、■ ; EB-2000)。

培養初期には導入細胞数に依存したスフェロイドが形成されたが、培養 5 日目以降ではすべての条件においてスフェロイドのサイズほぼ同じに達した。この結果は、マイクロウェ

ルチップで培養した HepG2 スフェロイドや神経幹細胞スフェロイドがほぼ一定サイズに到達するという以前の報告に一致しており[7]、マイクロウェルの直径によってスフェロイドのサイズが制御できることを示している。一方で、播種細胞に対する培養 10 日目の細胞増殖比は、EB 100、EB 500、EB 1000、EB 2000 の条件でそれぞれ約 70 倍、80 倍、110 倍、100 倍であった (Fig. 3.7)。すなわち、播種細胞密度の増加に伴って細胞増殖性は抑制されることから、その結果として、すべての条件のスフェロイドが一定のスフェロイドサイズに収束するのだろう。このような現象は、マイクロウェルという特殊な培養環境に依存することが推測される。一般的なフラットな培養基板と比べ、マイクロウェルのような微小空間内では淀み現象が発生するため、酸素の供給不足や老廃物の蓄積などが起こりやすい。播種細胞密度が高い条件ではこの影響が顕著に現れることから、細胞の増殖が抑制されるのだろう。事実、播種細胞密度が高い条件 (EB 1000 や EB 2000) で形成されたスフェロイド内部は培養初期から低酸素状態となっているという Lox-1 染色の結果 (Fig. 3.5) は、マイクロウェル内において酸素供給不足が発生していることを示唆するものである。

3.2.3.3. 分化マーカー遺伝子発現

各培養法におけるスフェロイド初期サイズの違いが iPS 細胞の分化特性に与える効果を明らかにするために、培養 10 日目における特異的分化マーカー遺伝子の評価を行った (Fig. 3.8)。

培養法の違いにおける肝分化マーカー (TTR および AFP) を比較すると、HD 法に比べマイクロウェルチップ培養ではどの条件においても高い発現比を示した。またマイクロウェルチップ培養下でのスフェロイドサイズの効果を比較すると、500cells 以上の条件ではほぼ同レベルであったが EB 100 の条件ではその発現は著しく抑制された。次に心筋分化マーカー (Nkx2.5 および α MHC) の発現は、培養法の違いによって十分な違いを示さなかった。しかし HD 法では 1000cells 以上で形成したスフェロイドにおいて高い発現を示したのに対して、マイクロウェルチップ培養では EB 500 の条件で最も高く、そして初期サイズの増加 (EB 1000 と EB 2000) に伴って減少した。また、EB 100 の条件の心筋分化マーカーの発現は、肝分化と同様に最も抑制された。一方で血管分化マーカーの発現は肝細胞分化マーカーとは逆の傾向を示し、マイクロウェルチップ培養に比べ HD 法で形成したスフェロイドで高い発現を示した。しかしスフェロイド初期サイズの効果を比較すると、両培養法において初期スフェロイドサイズに依存しており、EB 100 の条件で最も高く、初期サイズの増加に伴って順次減少した。

本研究よりマイクロウェルチップ培養では初期スフェロイド密度が 100cells と 500cells の条件を境界として幹細胞の分化の方向性がスイッチングすることが示され、EB 100 の条件では血管分化が促進されるのに対し、500cells 以上の条件は肝分化および心筋分化が促進

されることが実証された。一方、一般的なスフェロイド培養法であるハンギング・ドロップ法においても、初期サイズが小さなスフェロイドは大きなスフェロイドに比べ血球分化が促進されることや、逆に初期サイズが大きなスフェロイドは肝分化が促進された。したがって、マイクロウェルチップ培養においても従来のハンギング・ドロップ培養と同様な初期サイズ依存的な分化現象が起こることが明らかとなった。しかしマイクロウェルチップ培養はどの条件においても従来法に比べ肝細胞分化マーカーの発現を促進させ、一方で血管細胞分化マーカーは抑制されることを示した。

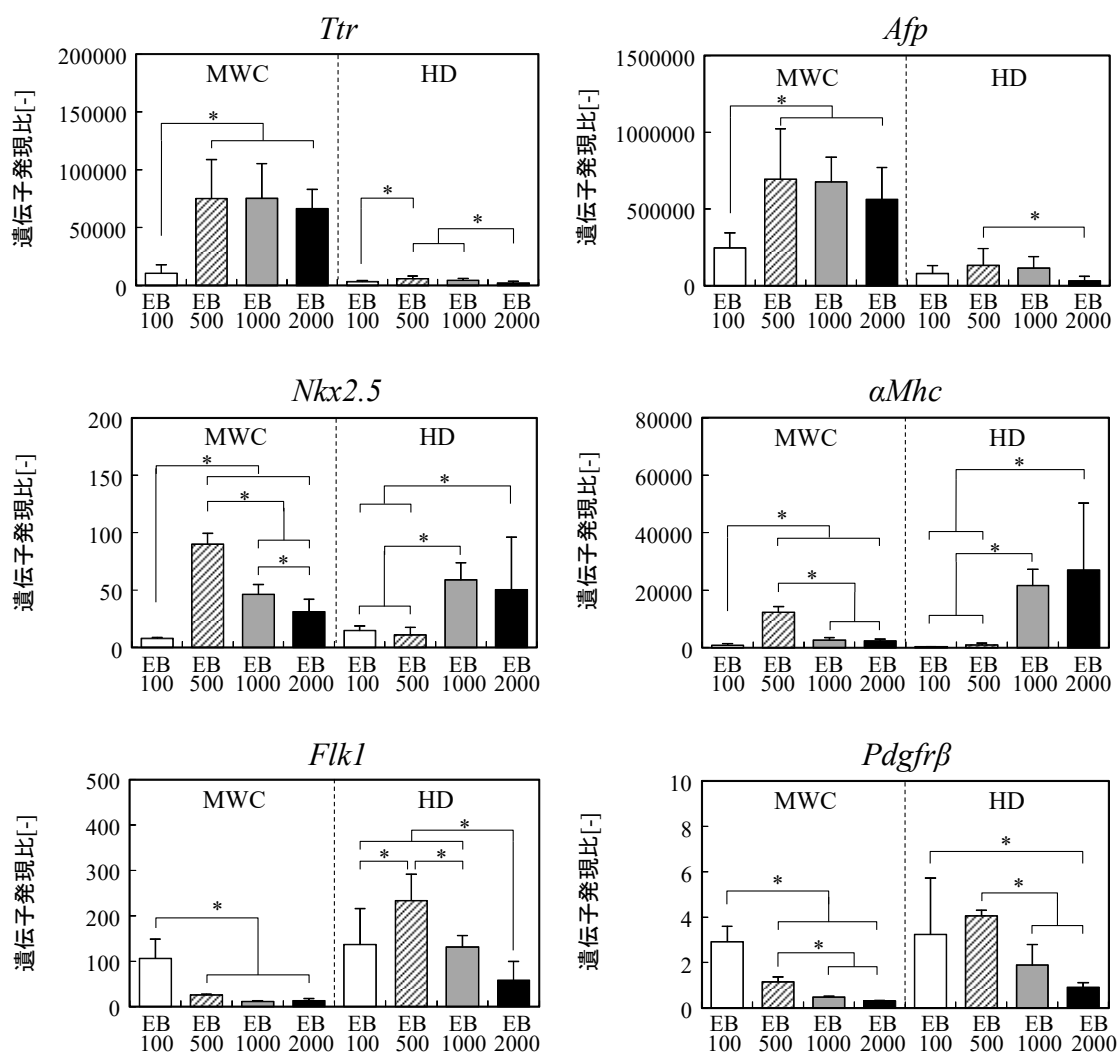


Fig. 3.8. 培養 10 日目におけるスフェロイドサイズに依存したマウス iPS 細胞分化特性。*P<0.05。

肝分化が促進された 500cells 以上の播種細胞密度が高い条件では、スフェロイド内部では低酸素化状態が形成されていた (Fig. 3.5)。これらの結果は、肝分化と低酸素環境が密接に関係していることを示唆するものであり、低酸素下培養によって幹細胞の肝分化が促進されるという近年の報告とよく一致している[8]。さらに、500cells 以上の条件では心筋分化も促進されており、肝分化と心筋分化の発現は連動してした。ここで生体内の発生過程では、

心筋分化領域から分泌される繊維芽細胞増殖因子（FGF）や骨形成タンパク（BMP）などの刺激によって肝分化が促進されることが知られている[9, 10]。したがって、低酸素環境の形成と心筋分化の進行から誘導される相乗効果によって、播種細胞密度が高い条件では肝分化が促進されると考えられる。

一方、播種細胞密度の低い EB 100 条件では血管分化が高発現した。EB100 条件のスフェロイドは他の条件と比較して大きく異なる形態学的特徴を有しており、空間構造を有するスフェロイドの形成が多数観察された。また、スフェロイド内部における空間構造の形成は、スフェロイド内細胞密度が極端に低いという結果からも支持されるものであり、EB100 条件のスフェロイドは *yolk-sac* 構造が形成されていると考えられる。この結果は、*yolk-sac* 構造の形成は血管分化を促進するという報告とよく一致している[11, 12]。初期サイズが小さいスフェロイドでは、その内部まで酸素や栄養素の供給が可能であり、活発な増殖性を維持できることから、他の条件とは異なる分化が進行すると考えられる。

3.2.4. 本節のまとめ

従来法である HD 法と本研究室で独自に開発してきたマイクロウェルチップ培養におけるスフェロイド初期サイズが分化特性に与える影響について評価した。両培養法においてもスフェロイド初期サイズに応じてマウス iPS 細胞特性が変化し、培養法の違いが与える幹細胞特性については以下のような結果を得た。

- (1) マイクロウェルチップ培養は HD 法に比べ増殖能を抑制させ、形成されるスフェロイドサイズおよび増殖能はウェルあるいはドロップ当たりの初期導入細胞数に依存した。
- (2) スフェロイドサイズが 200 μm 以上になると内部で低酸素環境を形成した。一方で EB100 のような yolk-sac 構造を形成させたスフェロイドでは一部分において細胞密度の低い部分においてスフェロイド内部での低酸素環境が緩和された。
- (3) マイクロウェルチップ培養はどのスフェロイド初期サイズにおいても HD 法に比べ肝細胞分化特性を向上させ、一方で血管系細胞分化特性を抑制させた。
- (4) マイクロウェルチップ培養ではウェル内に 500cells/well 以上のマウス iPS 細胞を導入することで肝細胞分化特性が促進され、一方 100cells/well でマウス iPS 細胞を導入することで血管系細胞分化特性が促進された。

以上の結果より、スフェロイドサイズに依存した内部の低酸素環境は肝細胞分化特性を向上させることが示唆された。また多数のスフェロイドが隣接するマイクロウェルチップ培養は肝細胞分化特性を促進させ、一方で液滴内に個々のスフェロイドを形成させる HD 法では血管系細胞分化特性が促進させることを示唆された。次節ではスフェロイドが隣接することで生じるスフェロイド近傍の微小環境の違いが幹細胞分化特性に与える影響を明確にする。

3.3. 培養法の違いがもたらす分化スイッチング現象の解明

3.3.1. 本節の目的

浮遊旋回法を除くスフェロイド培養法は、基本的には同様な静置培養系でありながら、マイクロウェルチップ培養は HD 法や U 型プレート法に比べて肝分化が促進されることを 3.2 節が明らかにしており、これらの結果は培養法の違いが分化の方向性に影響を与えることを示している。このような違いは、培養系内におけるスフェロイドの存在状態に起因すると考えられる。すなわち、HD 法は個々のスフェロイドが培養系内で独立しているのに対し、マイクロウェルチップ培養では多くのスフェロイドが同一培養系で存在している。したがって、このようなマルチ-スフェロイド培養という環境が細胞特性に作用していると考えられるが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

一方、細胞が自己分泌する糖タンパク質を介する Wnt シグナル経路は、幹細胞の分化運命を制御する重要なシグナル伝達経路の一つである[13, 14]。Hwang らは血管細胞分化および心筋細胞分化を制御している細胞内シグナル因子として Wnt5a および Wnt11 について報告した[15]。さらに Yu らは幹細胞を取り巻く酸素状態によって細胞内シグナル因子のひとつである Wnt5a は制御されていることを報告している[16]。したがって、このような細胞内シグナル伝達経路が培養法によって異なることが考えられる。

そこで本研究では、HD 培養とマイクロウェルチップ培養を用いてマウス iPS 細胞のスフェロイド培養を行い、培養法の違いがスフェロイドの増殖性や分化特性に与える効果を評価した。また、培養環境として両培養系の酸素化状態と基礎代謝の違いを比較した。さらに、Wnt 系シグナル因子の発現を評価し、培養法の違いによる細胞内シグナル経路の変化を解析した。これらの検討を通して、培養法の違いが幹細胞特性に与える効果を明らかにした。

3.3.2. 実験方法

3.3.2.1. マイクロウェルチップ設計条件および培養条件

24×24mm 角のポリメチルメタクリレート (PMMA) 基板の上に 195 個のマイクロウェル構造を有するマイクロウェルチップを微細加工機 (PMT Corp.) によって作製した。マイクロウェルの構造はウェル径およびウェル深さを 500、1000 μm の 2 種類あり、ウェル間距離をそれぞれ 500、1100 μm としている (Chip500 および Chip1000)。

作成したチップに培養 3 日目におけるマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) をウェルあたりに 1000 個になるように DMEM 培地で調整し、2-2 節と同様の操作で 10 日間培養を行った。同じく HD 法においても培養 3 日目におけるマウス iPS 細胞を 20 μL の培養培地に同様の細胞密度 (1000cells/drop) でスフェロイドを形成し 10 日間培養した。

3.3.2.2. スフェロイド増殖能

また培養経過に伴うスフェロイドサイズの変化を評価するため、培養 1、3、5、7、10 日目における各チップにおける位相差顕微鏡写真からそれぞれ 30 個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト (Win ROOF Ver 5.02; Mitani Corp., Japan) を利用してスフェロイドの粒径を測定した。スフェロイドの直径は、スフェロイドの面積から等価円直径 (equivalent circle diameter; ECD) 法により算出した。

また細胞数測定に関しては本研究室で改良を行った DNA-DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 蛍光測定法を利用して、培養 3、7、10 日目における細胞数を測定した。TEN buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5) に 100 $\mu\text{g/mL}$ proteinase K (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加して DNA 抽出液を調製した。DNA 抽出液で細胞を 37° C で 24 時間以上インキュベートして溶解させ、DNA を抽出した。TEN buffer に 1 $\mu\text{g/mL}$ の DAPI (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加した DAPI 溶液と抽出した DNA 溶液を 100 μL ずつ 96 ウェルプレート内で混合し、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent Thermo Labssystem; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) で測定した (Ex. 355 nm / Em. 460 nm)。サスペンションから抽出した DNA 溶液を用いて検量線を作成し、検量線を用いて測定した吸光度からスフェロイドあたりの細胞数を算出した。

3.3.2.3. 遺伝子解析

Total RNA は各条件の培養細胞を spin column (NucleoSpin RNAII; Nippon Genetics Co. Ltd.)を用いて説明書どおりに抽出した。cDNA は a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)を用いて説明書どおりに 20 μ g/mL の濃度で調製した。各サンプルはリアルタイム RT-PCR によって測定するまで-20°Cで保管した。PCR 解析においては StepOne Real-time PCR 装置を用いて cDNA と TaqMan Gene Expression Assay Kits (Applied Biosystems)と反応させ、解析した。各遺伝子の発現比は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH (Taqman プローブ、Mm99999915_g1) をハウスキーピング遺伝子として解析プロトコールの一つである $\Delta\Delta$ CT法を用いて解析を行った。解析した遺伝子としては特異的分化マーカー遺伝子；肝分化マーカー遺伝子であるトランスサイレチン；TTR (Taqman プローブ、Mm00443267_m1) および α フェトプロテイン；AFP (Taqman プローブ、Mm00431715_m1)、心筋分化マーカー遺伝子である NK2 転写因子；Nkx2.5 (Taqman プローブ、Mm00657783_m1) および α ミオシン重鎖； α MHC (Taqman プローブ、Mm00440354_m1)、血管分化マーカー遺伝子である胎児肝臓キナーゼ 1；Flk1 (Taqman プローブ、Mm01222419_m1) および血小板成長因子受容体 β ；PDGFR β (Taqman プローブ、Mm00435546_m1)、分泌糖タンパクである Wnt5a (Taqman プローブ、Mm00437347_m1) および Wnt11 (Taqman プローブ、Mm00437347_m1)、プロテインキナーゼ；AKT1 (Taqman プローブ、Mm01331626_m1)、肝細胞転写因子である核内受容体；Foxa2 (Taqman プローブ、Mm01976556_s1) および HNF4 α (Taqman プローブ、Mm01247712_m1)、ホメオボックス転写因子；Hex (Taqman プローブ、Mm00433954_m1) である。各遺伝子発現比については播種前に調製したマウス iPS 細胞の発現比を 1 とし発現比の変化を比較した。

3.3.2.4. 嫌氣的代謝活性

グルコース消費量および乳酸生成量は幹細胞の基礎代謝活性を評価するために測定した。培養 3,7,10 日目のグルコース消費量および乳酸生成量の解析には Glucose test Wako (Wako) と Lactate Assay Kit II (Bio Vision Inc. USA)を用いた。

3.2.2.5. 統計処理

データは平均±標準偏差で示し、各データは 3 点の比較を行っている。統計処理に関しては一元分散分析を行った。また P <0.05 の値は統計的に有意であると考えられる。

3.3.3. 実験結果および考察

3.3.3.1. スフェロイド形態と増殖能

両培養系において播種された iPS 細胞はすぐに集合・凝集化をはじめ、培養 1 日以内にスフェロイドを形成し、その後、培養経過に伴ってスフェロイドサイズは増加した。HD 法では培養 7 日目頃から多くのスフェロイドにおいて内部に空洞様構造の形成がみられ、その一部はいびつな構造を有する胚様体へと発達した。これに対し、マイクロウェルチップ培養では各ウェル内で一つのスフェロイドを形成し、培養期間を通して空洞様構造の形成はみられず、球状構造を維持した。マイクロウェルチップ培養 (Chip500, Chip1000) では形成されたスフェロイドは培養経過に伴いスフェロイドサイズが大きくなった。Chip500 ではスフェロイドの崩壊のみ確認したが Chip1000 においては一部のスフェロイドで拍動現象が生じており、また HD 法で確認したバルーン形状のスフェロイドも確認した (Fig. 3.9)。

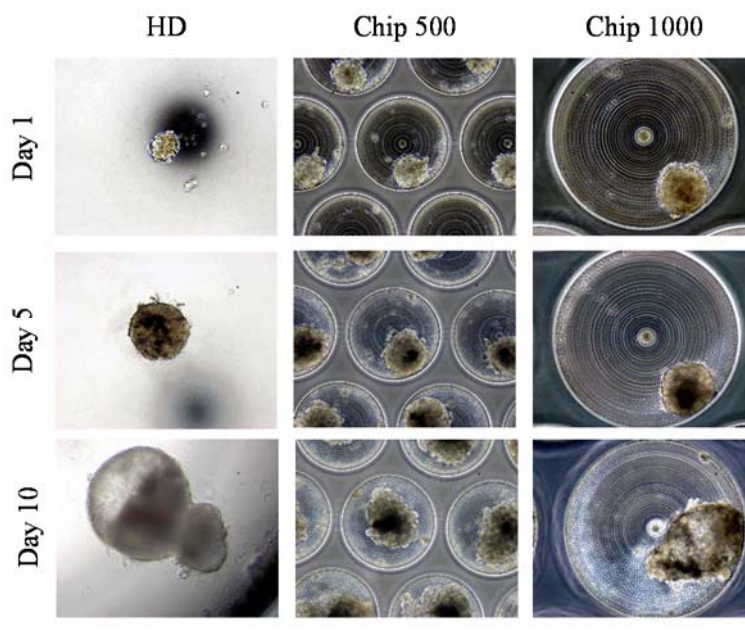


Fig. 3.9. 各培養法におけるマウス iPS スフェロイド形態の変化。スケール ; 500 μ m。

HD 法では培養 1 日目に 130 μ m のスフェロイドを形成し培養 5 日目までは緩やかな細胞増殖を示したが、培養 7 日目以降は劇的な増殖能を示し培養 10 日目では 700~800 μ m 程度のスフェロイドを形成した (Fig. 3.10-A)。ここでスフェロイドあたりの細胞数を測定してみる粒径サイズと同様に培養 7 日目以降で高い細胞増殖を示し、培養 10 日目まで細胞

数の増加が確認された (Fig. 3.10-B)。ここでスフェロイド粒径サイズおよびスフェロイドあたりの細胞数からスフェロイドあたりの細胞密度を算出したところ、培養 3 日目では 6×10^8 [cells/cm³] 程度の細胞密度を維持していたが培養 7 日目以降では 6×10^7 [cells/cm³] と培養初期の 1/10 程度まで減少した (Fig. 3.10-C)。

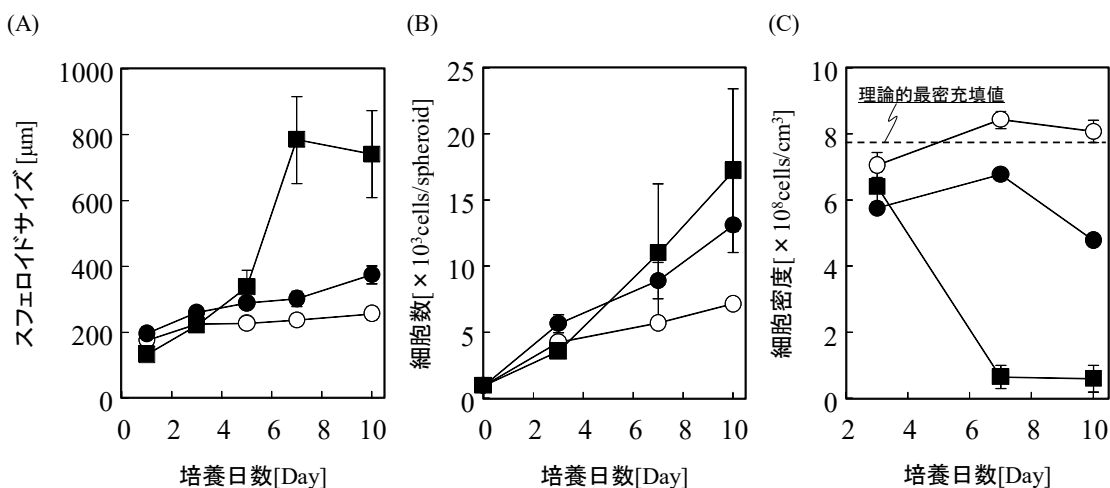


Fig. 3.10. 培養経過に伴うマウス iPS 細胞増殖能。(A) スフェロイドサイズ変化、(B) スフェロイドあたりの細胞数変化、(C) スフェロイドあたりの細胞密度変化。(■ ; HD 法、○ ; Chip500、● ; Chip1000)。

マイクロウェルチップ培養 (Chip500, Chip1000) では培養 1 日目に $180 \pm 5 \mu\text{m}$ 程度のスフェロイドを形成し培養 3 日目までスフェロイドサイズは大きくなり、培養 5 日目以降ではスフェロイドサイズはプラトーに達しており変化は見られなかった。しかし培養 10 日目までに形成されたスフェロイドの粒径は Chip500 では約 $250 \mu\text{m}$ 、Chip1000 では約 $350 \mu\text{m}$ とサイズに違いが生じた。つまりマイクロウェルチップ培養は HD 培養に比べ増殖能を抑制させ、増殖能の抑制現象はウェル径の小さい条件 (Chip500) においてその傾向が顕著である。スフェロイドあたりの細胞数においては Chip500 では HD 培養に比べ低い増殖能を示したが、Chip1000 では HD 培養に近い増殖能を示した (Fig. 3.10-B)。HD 培養と同様にスフェロイドあたりの細胞密度を算出したところ HD 培養に比べ、高い細胞密度を示した。また Chip1000 では細胞密度の減少が確認されたが、Chip500 では培養経過に伴い細胞密度の増加を示し理論的最密充填値 (7.77×10^8 [cells/cm³]) よりも高いことから密なスフェロイドを形成していることが示唆された (Fig. 3.10-C)。

HD 培養で形成されたスフェロイドは増殖能が高くバルーン形状に近い形状を示しているが、マイクロウェルチップ培養においては培養 3 日目で増殖抑制効果が生じより細胞密度の高いスフェロイドを形成した。マイクロウェルチップ培養においてはマイクロウェルという微小空間でスフェロイドを形成・培養を行っており、iPS 細胞への酸素などの物質供給量は低下することが考えられる [17]。またマイクロウェルチップ培養は HD 培養とは異なりマイクロウェルという物理的仕切りがあり、その表面が細胞非接着面であることで接触障害が生じスフェロイドサイズが制限される。その結果、マイクロウェルチップ培養によっ

て形成されるスフェロイドの増殖は中心部での増殖が起こることから細胞密度の高いスフェロイドを形成した。

3.3.3.2. 基礎代謝活性

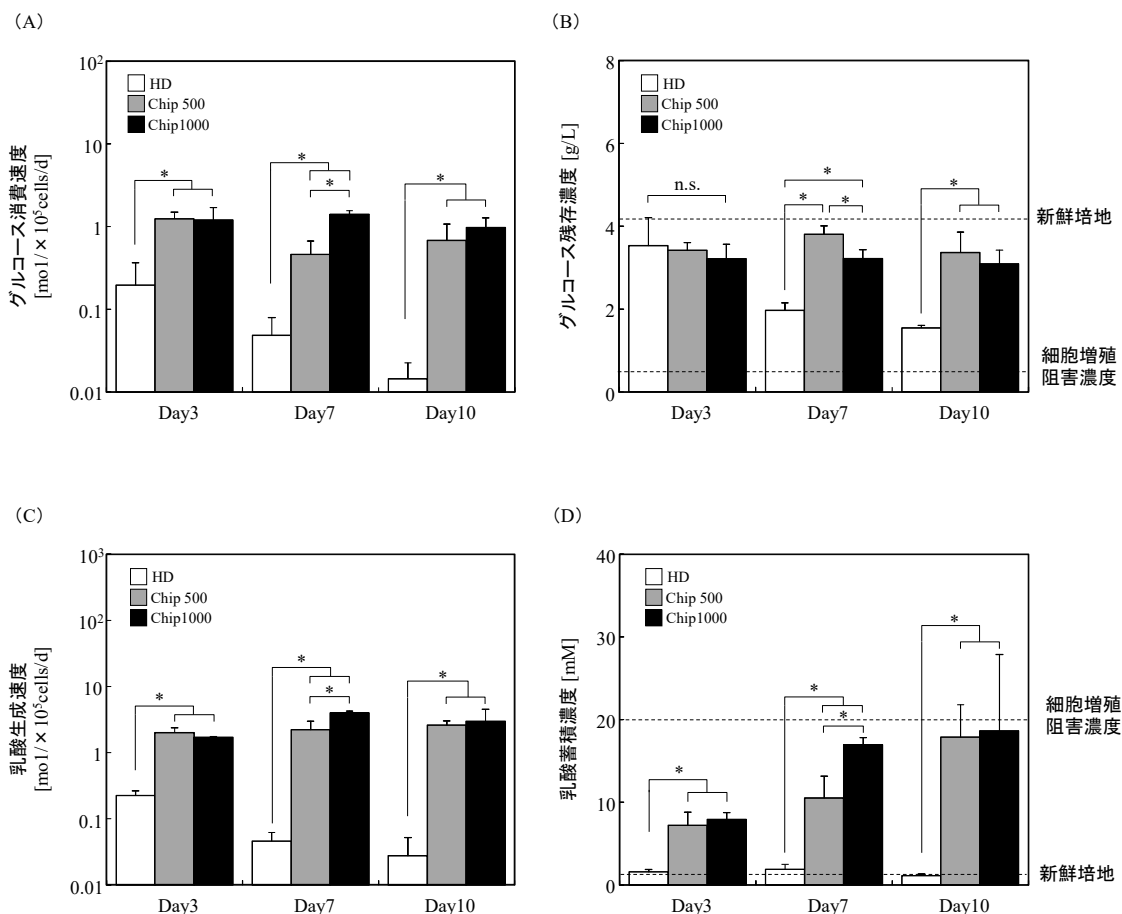


Fig. 3.11. 培養経過に伴うマウス iPS 細胞の基礎代謝活性。(A) 細胞あたりのグルコース消費速度、(B) 培養系内におけるグルコース残量濃度と細胞増殖阻害濃度の関係性¹⁸、(C) 細胞あたりの乳酸生成速度、(D) 培養系内における乳酸蓄積濃度と細胞増殖阻害濃度の関係性¹⁹。*P<0.05。

iPS 細胞を取り巻く培養環境を評価するために細胞代謝であるグルコース消費速度および乳酸生成速度の解析を行った。HD 培養ではグルコース消費速度は培養初期から培養 10 日目まで低い値を示した。また乳酸生成速度においてもグルコース消費速度と同様に低い値を示した。一方でマイクロウェルチップ培養では培養初期からグルコース消費速度および乳酸生成速度は高い値を示した。またウェル径の違いにおける変化はなくどちらの Chip 条件においても同等の値を示した (Fig. 3.11-A, C)。

細胞増殖を左右する因子としては培養系内の栄養源の枯渇あるいは代謝産物物質の蓄積

による増殖能抑制効果が考えられる。実際に培地中のグルコース濃度が 0.5g/mL 以下あるいは乳酸濃度が 20mM 以上になると細胞増殖阻害が発生することが報告されている[18, 19]。しかし培養系内のグルコースおよび乳酸濃度に関しては増殖阻害効果が発生する閾値に達しない (Fig. 3.11-B, D)。すなわち、マイクロウェルチップ培養における嫌氣的代謝活性の促進はスフェロイドを取り巻く酸素濃度の低下が作用していることが考えられる。マイクロウェルチップ培養はマイクロウェル構造内にスフェロイドを形成し培養基板上に多数のスフェロイド (195 個/Chip) を保持する。そのためマイクロウェル構造および培養系内に多数存在するスフェロイド同士によって嫌氣的代謝活性を促進させる培養環境を形成した。代謝活性は細胞を取り巻く培養環境を評価する指標であり、好氣的代謝活性の促進は正常酸素状態を示し、嫌氣的代謝活性の促進は低酸素環境を形成していることを示す。培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合、隣接するスフェロイド間において溶存酸素や栄養素の濃度低下や細胞分泌物の高濃度蓄積などの因子によってスフェロイド近傍の微小培養環境を構築することが考えられる。さらに、マイクロウェル構造は淀み空間となることから、この効果を助長するだろう。このような様々な因子の中でも、培地中への溶解度が極端に低い酸素は、干渉作用として働き易い因子である。つまり培養法の違いは形成される培養環境 (培養系内の酸素状態) の違いを誘導するファクターであり、この酸素状態の違いに応じて幹細胞特性に影響を与えることが考えられる。

3.3.3.3. マウス iPS 胚様体分化特性

培養法の違いが iPS 細胞の分化特性に与える効果を明らかにするために、培養 10 日目における特異的分化マーカー遺伝子の評価を行った (Fig 3.12)。

まず心筋細胞分化マーカー遺伝子においては培養法による違いは生じず、幹細胞増殖能の高い条件 (HD・Chip1000) で高い発現比を示した。しかし Chip500 では Chip1000 および HD に比べ、低い傾向を示した。次に血管形成細胞分化マーカー遺伝子ではこれまでとは逆で HD において高い傾向を示し、マイクロウェルチップではウェル径における違いはなく、培養法間のみの違いが生じた。一方で、肝細胞分化マーカー遺伝子の発現を比較すると、HD に比べマイクロウェルチップにおいて高い発現比を示した。またマイクロウェルチップ間においては細胞増殖能に比例して遺伝子発現比の向上が見られた。つまりマイクロウェルチップでは肝細胞分化を促進させる一方で HD では血管細胞分化を促進させた。

マイクロウェルチップ培養と HD 培養における幹細胞特性を比較したところ、マイクロウェルチップ培養では肝細胞分化を促進させ、HD 培養では血管細胞分化を促進させることを示した。心筋細胞分化においては培養系内で拍動現象が確認できた Chip1000 および HD において促進されており、マイクロウェルチップ培養と HD 培養で形成された 2 つの培養環境には依存しないことが考えられる。またマイクロウェルチップ培養でのチップ条件 (チ

チップ 500 とチップ 1000) における幹細胞分化特性を比較すると、チップ 500 では肝細胞分化を特異的に促進させているのに対してチップ 1000 では肝細胞分化および心筋細胞分化を促進させている。このことからチップ 1000 では発生過程に近い環境で肝細胞分化が行われていることが考えられる[9, 10]。

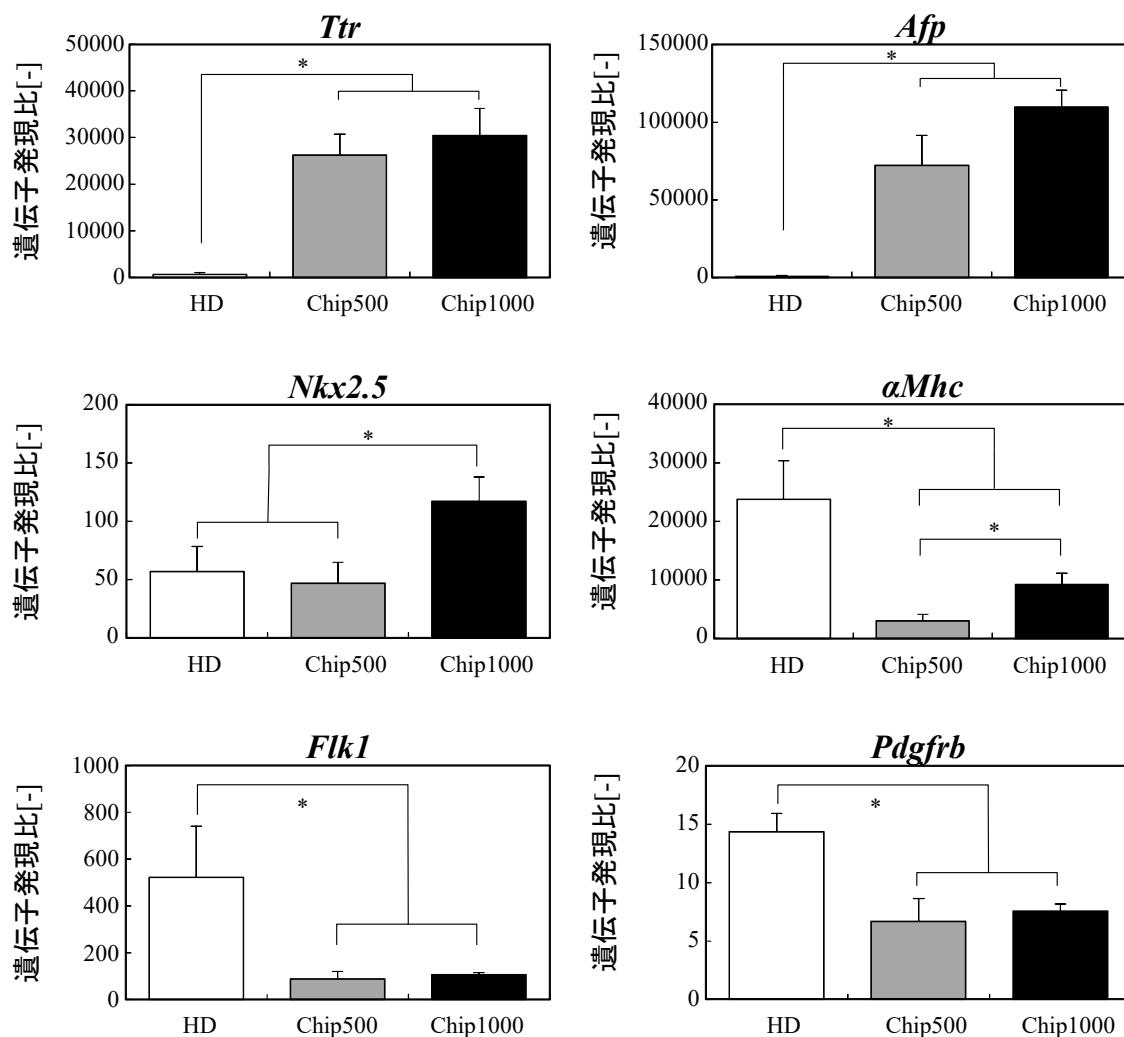


Fig. 3.12. 培養 10 日目におけるマウス iPS 細胞分化特性。*P<0.05。

3.3.3.4. 細胞内シグナル伝達経路

HD 培養においては核内受容体転写因子 (Foxa2・HNF4α) の発現は抑制され、Wnt タンパク (Wnt5a・Wnt11) および AKT-1 の発現が向上された。一方でマイクロウェルチップ培養では核内受容体転写因子 (Foxa2・HNF4α・Hex) の発現が向上するが Wnt5a および AKT-1 の発現はチップ 500 とチップ 1000 のどちらの条件においても抑制された。しかし Wnt11 の発現においてはチップ 500 では抑制されていたが、チップ 1000 においては

HD 培養より高い発現比を示した (Fig. 3.13)。

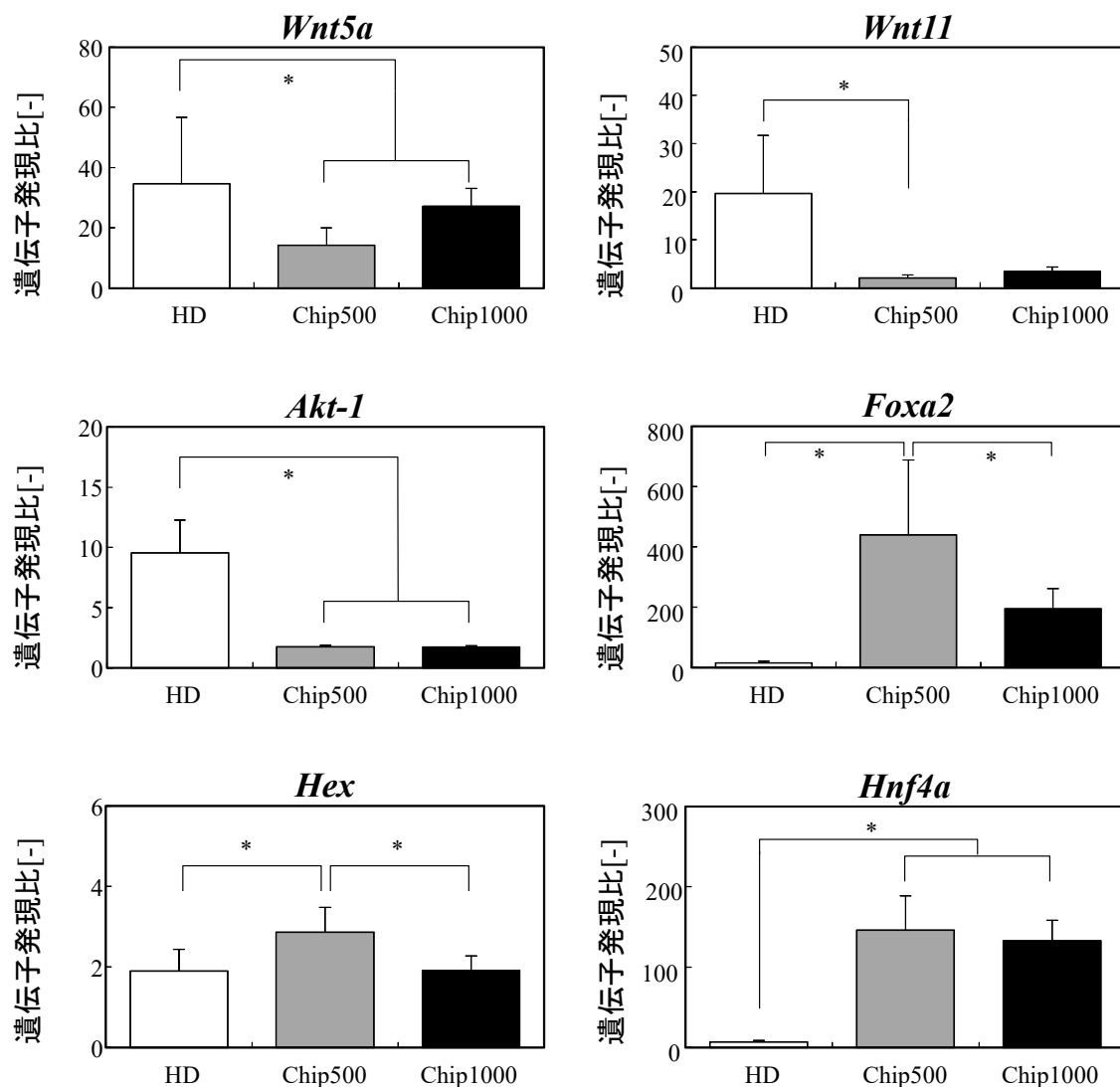
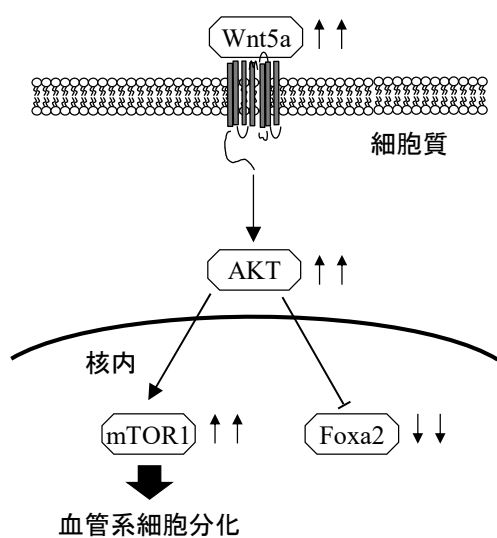


Fig. 3.13. 幹細胞分化特性に関与する Wnt タンパクと細胞内酵素の関係性。

Wnt タンパクと分化マーカー遺伝子の発現を比較すると心筋細胞分化マーカー遺伝子と Wnt11 の発現パターンが同じ傾向であり、また血管細胞分化マーカー遺伝子と Wnt5a の発現パターンが同じ傾向を示した。このことから心筋細胞分化および血管細胞分化においては Wnt タンパクの発現が関与することが考えられる[15]。また肝細胞分化においては Wnt5a の発現と肝細胞分化マーカー遺伝子の発現が反比例していることから Wnt5a シグナルが形成された培養環境に応じて肝細胞分化および血管細胞分化に影響を与えていることが考えられる。そこで Wnt5a の発現パターンに着目すると AKT-1 と同様な発現パターンを示し、一方で核内受容体転写因子 (Foxa2) の発現パターンは逆の傾向を示した。このことから Wnt5a をトリガーとし AKT シグナル経路が発現することによって Foxa2 および HNF4 α 、Hex の発現を制御されていることが考えられる (Fig. 3.14-A) [20]。しかし低酸素環境を形

成するマイクロウェルチップ培養においては Wnt5a の発現およびその下流にある AKT シグナルが抑制させることで、ブロックされていた Foxa2 および HNF4 α を発現し肝細胞分化を促進させていることが考えられる (Fig. 3.14-B)。この現象は Mclean らが報告した AKT1 阻害剤を添加することで肝細胞分化を促進させるという結果と同様のことを示していた [21]。つまりマイクロウェルチップ培養はスフェロイド近傍の低酸素状態の形成によって Wnt5a-AKT シグナルによる肝細胞分化阻害を開放することで自発的な分化を促すことを見出した。

(A)



(B)

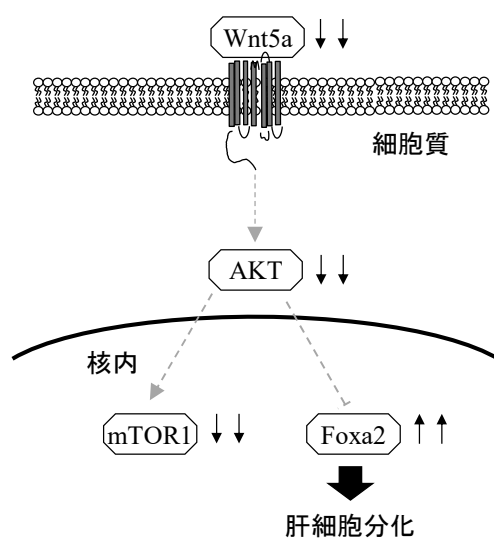


Fig. 3.14. 幹細胞分化特性に Wnt/AKT シグナル活性。(A) HD 法による血管分化経路活性、(B) チップ培養による肝細胞分化経路活性。

3.3.4. 本節のまとめ

従来法である HD 法と本研究室で独自に開発してきたマイクロウェルチップ培養の 2 種類がスフェロイド培養法の違いが分化特性に与える影響について評価した。培養環境に応じてマウス iPS 細胞特性が変化し、培養法の違いが与える幹細胞特性については以下のよう結果を得た。

- (1) マイクロウェルチップ培養は HD 法に比べ増殖能を抑制させ、またマイクロウェルチップ培養の増殖能はウェル径の違いに依存した。
- (2) マイクロウェルチップ培養は HD 法に比べグルコース消費速度および乳酸生成速度が向上しており、低酸素環境を形成していることが示唆された。
- (3) HD 法では血管系細胞分化特性が向上したのに対して、マイクロウェルチップ培養では肝細胞分化特性を向上した。
- (4) マイクロウェルチップ培養では低酸素環境を形成することで血管分化を促進させる Wnt/AKT シグナルを抑制し、肝細胞分化転写因子の発現を構造させる。またウェル径が 500 μm と小さい条件ほど肝細胞転写因子の発現が促進された。

以上の結果より、培養法の違いによって生じるスフェロイド近傍の微小酸素環境の変化が幹細胞分化特性を制御することを明らかにした。また肝細胞分化と血管系細胞分化のスイッチングは酸素環境に応じた Wnt/AKT シグナル活性が作用していることが示唆された。

3.4. 本章のまとめ

本章では、培養法の違いを利用して、マウス iPS スフェロイド近傍の微小培養環境を制御して、微小培養環境と幹細胞特性の関係性について種々の評価を行った。

まず、マウス iPS スフェロイドを様々なサイズで形成し、スフェロイドサイズに依存してスフェロイド内部の低酸素領域が変化することを実証し、またスフェロイドサイズに応じて肝細胞分化特性に影響を与えることを示した。またマイクロウェルチップと HD 法の両培養系においてはどちらもサイズ依存的に分化特性は変化するものの、培養法の違いによる影響がより顕著であることを示した。

次に、両培養系での細胞特性を比較すると、マイクロウェルチップ培養では HD 法に比べ細胞増殖能が抑制され、また嫌氣的代謝活性と共に低酸素環境を形成されることを明らかにした。また培養法の違いによる酸素環境の違いが発生させる分化スイッチング現象は酸素環境に応じた Wnt5a/AKT シグナル活性によって制御されることを明らかにした。

以上のことより、多数のスフェロイドが隣接する培養系においては隣接するスフェロイド間で生じる微小酸素環境に応じた細胞内シグナル伝達によって幹細胞の運命決定に影響を与えることを示した。

【参考文献】

1. **Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A.:** Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.*, **148**, 3–15 (2010).
2. **Ng, E. S., David, R. P., Azzola, L., Stanley, E. G., and Elefanty, A. G.:** Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation, *Blood*, **106**, 1601–1603 (2005).
3. **Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., and Kurosawa, H.:** Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 294–299 (2007).
4. **Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S.:** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells, *Nature*, **448**, 313–317 (2007).
5. **Nakazawa, K., Izumi, Y., Fukuda, J. and Yasuda, T.:** Hepatocyte spheroid culture on a polydimethylsiloxane chip having microcavities. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **17**, 859–873, 2006.
6. **Zhang, S., Hosaka, M., Yoshihara, T., Negishi, K., Iida, Y., Tobita, S., Takeuchi, T.:** Phosphorescent Light-Emitting Iridium Complexes Serve as a Hypoxia-Sensing Probe for Tumor Imaging in Living Animals, *Cancer Res*, **70**, 4490-4498, 2010.
7. **Sakai, Y., Yoshida, S., Yoshiura, Y., Mori, R., Tamura, T., Yahiro, K., Mori, H., Kanemura, Y., Yamasaki, M., and Nakazawa, K.:** Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 223–229, 2010.
8. **Katsuda, T., Teratani, T., Chowdhury, M. M., Ochiya, T., and Sakai, Y.:** Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic progenitor cells, *Biochem. Eng. J.*, **74**, 95–101, 2013.
9. **Ogawa, S., Tagawa, Y., Kamiyoshi, A., Suzuki, A., Nakayama, J., Hashikura, Y. and Miyagawa, S.:** Crucial Roles of Mesodermal Cell Lineages in a Murine Embryonic Stem Cell-Derived In Vitro Liver Organogenesis System. *Stem Cells*, **23**, 903–913, 2005.
10. **Katsuda, T., Sakai, Y. and Ochiya, T.:** Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes As an Alternative to Human Adult Hepatocytes. *Journal of Stem Cells*, **7**, 1-17, 2012.

11. **Wang, R., Clark, R. and Bautch, V. L.:** Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. *Development*, **114**, 303-316, 1992.
12. **Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H. G., Sasse, J., Ekblom, K., Kemler, R. and Doetschman, T.:** Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, **102**, 471-478, 1988.
13. **Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L. M. and Kuhl, M.:** Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*, **418**, 636-641, 2002.
14. **Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N. and Suemori, H.:** Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ β catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, **135**, 2969-2979, 2008.
15. **Hwanga, Y. S., Chunga, G. B., Ortmanna, D., Hattoria, N., Moellera, H. C. and Khademhossein, A.:** Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *PNAS*, **106**, 16978–16983, 2009.
16. **Yu, X. M., Wang, L., Li, J. F., Liu, J., Li, J., Wang, W., Wang, J. and Wan, C.:** Wnt5a inhibits hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation by downregulation of β -catenin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **304**, L103–L111, 2013.
17. **Randall, C. L., Kalinin, Y. V., Jamal, M., Manohar, T. and Gracias, D. H.:** Three-dimensional microwell arrays for cell culture. *Lab Chip*, **11**, 127-131, 2011
18. **Tannock, I. F. and Kopelyan, I.:** Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line, *Cancer Res.*, **46**, 3105-3110, 1986.
19. **Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M.:** Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **30**, 29-41, 1991.
20. **Belfiore, A. and Malaguamera, R.:** Insulin receptor and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **18**, R125-R147, 2011
21. **McClean, A. B., D'amour, K. A., Jones, K. L., Krishnamoorthy, M., Kulik, M. J., Reynolds, D. M., Sheppard, A. M., Liu, H., Xu, Y., Baetge, E. E. and Dalto, S.:** Activin A Efficiently Specifies Definitive Endoderm from Human Embryonic Stem Cells Only When Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Is Suppressed. *STEMCELLS*, **25**, 29–38, 2007

第4章：スフェロイド間距離と幹細胞分化の関係

4.1. 本章の目的

スフェロイド培養法としては個々のスフェロイドを形成させるハンギング・ドロップ法やU字型プレート法、バイオリアクターを利用して大量のスフェロイドを培養させる浮遊旋回培養法、微細加工によって培養基板上に形成された微小培養空間（マイクロウェル）内に細胞をトラップさせたマイクロチップ法など、多くの方法が開発されている。浮遊旋回培養を除くスフェロイド培養法は静置下であるため、培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合は隣接するスフェロイド間で生じる相互作用の効果によって細胞特性への影響が懸念されている。1.4節でも述べたように、培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合、隣接するスフェロイド間では酸素濃度や栄養源などの供給物質、代謝産物、分泌物質の濃度勾配が生じ、スフェロイドニッチの変化によって幹細胞特性に影響を与えることが考えられる。実際に3節ではスフェロイドニッチの違いによって幹細胞分化スイッチング現象が生じている。しかし既存のスフェロイド研究ではスフェロイド特性を制御するファクターとしてスフェロイドサイズに着目した研究が多く[1, 2]、スフェロイド間相互作用については十分に評価されていない。

そこで本章では、スフェロイドニッチによって生じる分化スイッチング現象とスフェロイド間距離の関係性の探索を目的とした。具体的には、4.2節ではマウスESスフェロイド間距離と幹細胞特性の関係性について評価した。また4.3節では多能性幹細胞ではないものの、細胞アッセイ研究において汎用的に利用されているHepG2細胞スフェロイドを同様のスフェロイドパターンニングチップを利用して培養し、肝細胞特性とスフェロイド周辺の酸素環境の関係性について評価した。

4.2. スフェロイド間距離が ES スフェロイド特性に与える影響

4.2.1. 本節の目的

培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合、スフェロイド間同士によって生じる干渉作用の影響が懸念されている。実際に培養系内に個々のスフェロイドが存在する HD 法と多数存在するマイクロウェルチップ培養の幹細胞特性を比較すると、細胞増殖能および分化特性に違いが生じた (3 章参照)。つまりスフェロイド培養においてはこの干渉作用の影響を十分に評価しなければならない。しかし、非接着担体法や旋回培養法などの既存のスフェロイド形成技術では、形成される個々のスフェロイド粒径はランダムである。また、一般的なスフェロイド培養法は担体-細胞間よりも細胞-細胞間の接着力の優位さを利用しているため、スフェロイドの固定化やアレイ化ができないといったチップ化への問題点が多い。マイクロウェルチップは、スフェロイドをウェル内で浮遊培養させているため、スフェロイド間の位置や距離を厳密に制御することはできない。本研究室ではスフェロイドの位置関係性を任意に制御することが可能であるマイクロパターンニングチップ培養法を開発した。詳細は 4.2.2.1 で述べるが、このチップは培養基板上における細胞接着/非接着部位を任意に形成されることでスフェロイドの位置関係性を自由に制御することが可能となる。

そこで、本節では、スフェロイド間距離の異なるマイクロパターンニングチップを用いてマウス ES 細胞を培養しスフェロイド間距離の違いがもたらす幹細胞特性 (増殖能および分化特性) について評価することを目的とした。またスフェロイド近傍の微小培養環境因子のひとつとしてスフェロイド周辺の酸素環境に着目し、スフェロイド近傍の酸素環境の違いによって生じる低酸素応答遺伝子の発現についても同様に評価した。

4.2.2. 実験方法

4.2.2.1. 細胞パターンニングによるスフェロイド間距離の位置関係の制御

スフェロイド間距離をサブミリメートル単位で制御させる方法として本研究室でこれまで開発してきたマイクロパターンニングチップを用いた[3,4]。このチップはマイクロコンタクトプリンティング法を用いて細胞接着部位（コラーゲンやゼラチンなど）を培養基板上に作成し、その周りを細胞非接着分子（ポリエチレングリコール；PEG や 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine；MPC など）で修飾させることで細胞パターンニング培養を行うことが可能である。つまりスフェロイド間距離はこの細胞接着部位の位置関係によって制御することができ、2.2 節で述べたように接着した細胞が伸展・増殖することでスフェロイドを形成させることで任意の位置関係を保ったままスフェロイド培養が可能となる。

4.2.2.2. マイクロパターンニングチップの作製

ガラス基板（24mm×24mm）に 91 個のゼラチンスポット（細胞接着部位）を有する Gelatin/PEG パターンニングチップをマイクロコンタクトプリンティング法によって作製した。このチップ表面を Pt 蒸着しコラーゲンスポットを形成後に、金属-チオール結合を介して細胞比接着分子であるポリエチレングリコール（PEG, 日油）を修飾した（Fig. 4.1）。ゼラチンスポット間の距離を 500、1000、1500 μm と設計したチップをそれぞれ Gap 500、Gap 1000、Gap 1500 とする。さらに各チップを 3つのエリア（Inside、Middle、Outside）に区分してスフェロイドが形成させる位置関係性についても同様に比較した（Fig. 4.2）。

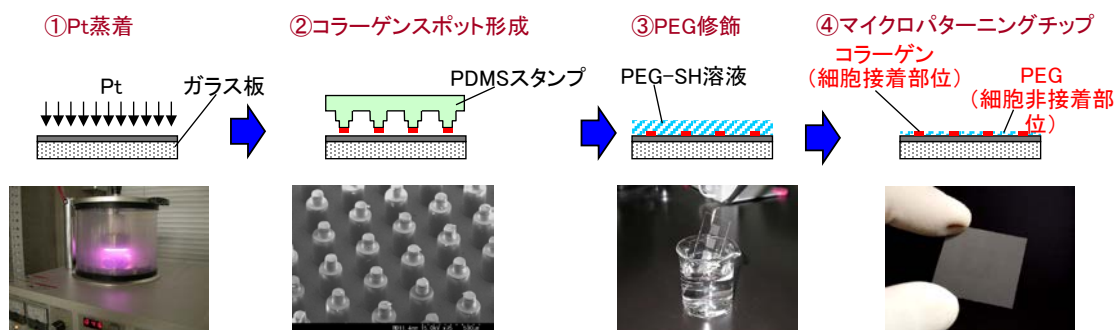


Fig. 4.1. マイクロパターンニングチップの作成過程。

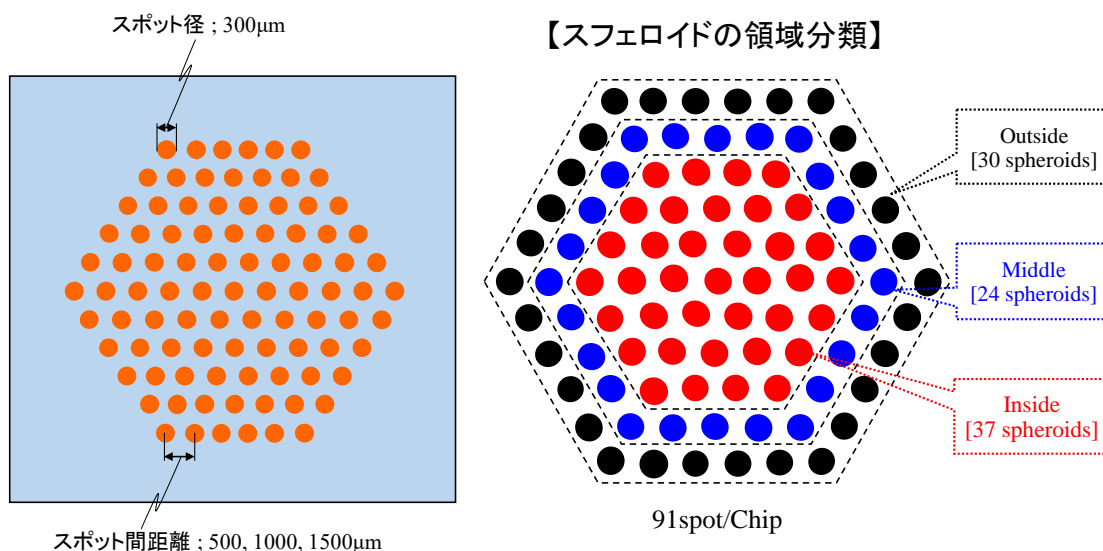


Fig. 4.2. マイクロパターンニングチップの設計条件とチップ上におけるスフェロイドの位置関係性

4.2.2.3. マウス ES 細胞の培養

マウスES細胞 (129SV; DS Pharma Biomedical, Japan) をマウス胚性線維芽細胞 (MEF; ReproCELL) 上でDMEM培地を用いて4日間単層培養を行った。このときのDMEM培地においてはDMEM基本培地 (MILLIPORE, Germany) 500mLに対して非必須アミノ酸 (MILLIPORE) 5mL、100 \times SPG (Gibco) 5mL、2-メルカプトエタノール (MILLIPORE) 5mL、ヌクレオチド溶液 (MILLIPORE) 5mL、血清 (MILLIPORE) 75mLを混合させた培養培地を使用している。単層培養におけるマウスES細胞では未分化状態を維持させたままの細胞増殖を目的としているため培養培地に対して未分化維持因子である白血病抑制因子 (LIF, Wako Pure Chemical Industries) を1000unit/mLを添加して培養を行った (Ref)。

培養4日目におけるマウスES細胞を1 \times PBSで2回洗浄後トリプシン溶液 (Gibco) 500 μ Lを添加して剥がし、前日プレインキュベーションしていたマイクロパターンニングチップに5 \times 10⁵ cells/dishの細胞密度で播種した。2~3時間にゼラチンスポットに細胞が接着したことを確認した後、マイクロパターンニングチップを培地で2回洗浄し滅菌済みのピンセットでチップを新しい35mmペトリディッシュに移した。接着した細胞が増殖するにつれて自発的にEBを形成させ、静置状態で10日間培養を行った。

4.2.2.4. 細胞形態およびSEM観察

スフェロイド形成過程および培養形態を評価するため、各チップの3つのエリア (inside,

Middle, Outside) のスフェロイドの位相差像を撮影した。

マイクロパターニングチップ表面におけるマウス ES スフェロイドの接着状態を評価するため、培養 14 日目の Chip1500 を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定化および様々な濃度のエタノールを用いて脱水操作を施し、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM, VE-8800; Keyence, Japan) で観察した。

4.2.2.5. 拍動率測定

培養 10 日目におけるスフェロイドの拍動率を評価するため、各チップでの 3 つのエリアに存在するスフェロイドを位相差顕微鏡でそれぞれ約 30 個のスフェロイドを無作為に観察し拍動率を算出した。

4.2.2.6. 遺伝子解析

Total RNA は各条件の培養細胞を spin column (NucleoSpin RNAII; Nippon Genetics Co. Ltd.)を用いて説明書どおりに抽出した。cDNA は a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)を用いて説明書どおりに 20 μ g/mL の濃度で調製した。各サンプルはリアルタイム RT-PCR によって測定するまで -20°C で保管した。PCR 解析においては StepOne Real-time PCR 装置を用いて cDNA と TaqMan Gene Expression Assay Kits (Applied Biosystems)と反応させ、解析した。各遺伝子の発現比は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH (Taqman プローブ、Mm99999915_g1) をハウスキーピング遺伝子として解析プロトコールの一つである $\Delta\Delta$ CT 法を用いて解析を行った。解析した遺伝子としては特異的分化マーカー遺伝子 ; 肝分化マーカー遺伝子であるトランスサイレチン ; TTR (Taqman プローブ、Mm00443267_m1) および α フェトプロテイン ; AFP (Taqman プローブ、Mm00431715_m1)、心筋分化マーカー遺伝子である NK2 転写因子 ; Nkx2.5 (Taqman プローブ、Mm00657783_m1) および α ミオシン重鎖 ; α MHC (Taqman プローブ、Mm00440354_m1)、血管分化マーカー遺伝子である胎児肝臓キナーゼ 1 ; Flk1 (Taqman プローブ、Mm01222419_m1) および血小板成長因子受容体 β ; PDGFR β (Taqman プローブ、Mm00435546_m1)、低酸素応答遺伝子であるグルコーストランスポーター (Glut1, Taqman プローブ ; Mm00441480_m1) および乳酸脱水素酵素 (LDH1, Taqman プローブ Mm01612132_g1) である。各遺伝子発現比については播種前に調製したマウス iPS 細胞の発現比を 1 とし発現比の変化を比較した。

4.2.2.7. 統計処理

データは平均±標準偏差で示し、各データは 3 点の比較を行っている。統計処理に関しては一元分散分析を行った。また $P < 0.05$ の値は統計的に有意であると考ええる。

4.2.3. 実験結果および考察

4.2.3.1. スフェロイド形態と細胞増殖能

播種されたマウス ES 細胞は培養 1 日目にゼラチンスポットに接着・伸展し、培養経過に伴いゼラチンスポット上にスフェロイドを形成した。培養 10 日目におけるスフェロイドについて SEM 観察を行ったところ、ゼラチンスポットに接着していたマウス ES 細胞はゼラチンスポットの一部分に接着したままスフェロイドを形成していた (Fig. 4.3)。

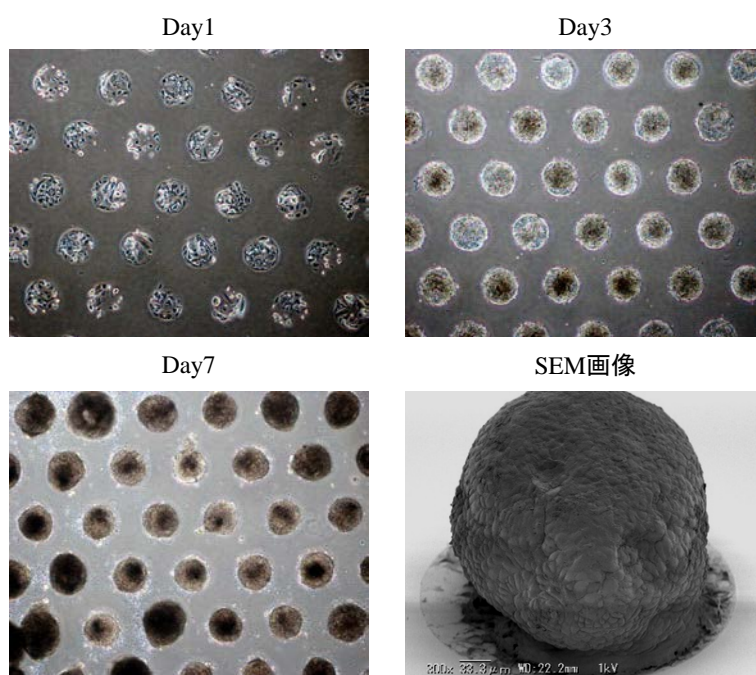


Fig. 4.3. 培養経過に伴う Gap 500 におけるマウス ES スフェロイド形態の変化、および培養 10 日目における SEM 画像。スケール；500 μ m。

ここで培養 10 日目における各チップのスフェロイド形態を比較すると、Gap 500 では外周部に比べ中心部ではスフェロイドサイズが抑制された (Fig. 4.4-A)。一方、Gap 1000 および Gap 1500 においては Gap 500 に比べ中心部と外周部のスフェロイドサイズに大きな

違いが生じていない (Fig. 4.4-B, C)。そこで Fig. 4.4-D に示すように各エリア (①~⑪) におけるスフェロイドサイズを比較すると、Gap 500 では外周部で形成されたスフェロイドはおよそ $450\ \mu\text{m}$ に達していたが、中心部に進むにつれてスフェロイドサイズは減少していき中心部ではおよそ $300\ \mu\text{m}$ にまで減少した。しかし Gap 1000 および Gap 1500 では外周部で形成されたスフェロイドの大きさはそれぞれ $600\ \mu\text{m}$ 、 $500\ \mu\text{m}$ と Gap 500 に比べ高い増殖能を示し、また中心部でのスフェロイドサイズはおよそ $400\ \mu\text{m}$ 程度となり増殖能の抑制が緩和されていた。外周部のスフェロイドとは異なり、中心部では四方八方を隣接するスフェロイドに囲まれていることによってスフェロイド間干渉作用の影響を受ける。またスフェロイド間距離が $500\sim 1000\ \mu\text{m}$ 程度ではマウス ES 細胞の増殖能の抑制効果が生じるものの、 $1500\ \mu\text{m}$ 以上離れることでその効果が緩和されることが考えられる。つまりスフェロイド間距離およびチップ内における位置関係性がマウス ES 細胞増殖能に影響があることが考えられる。

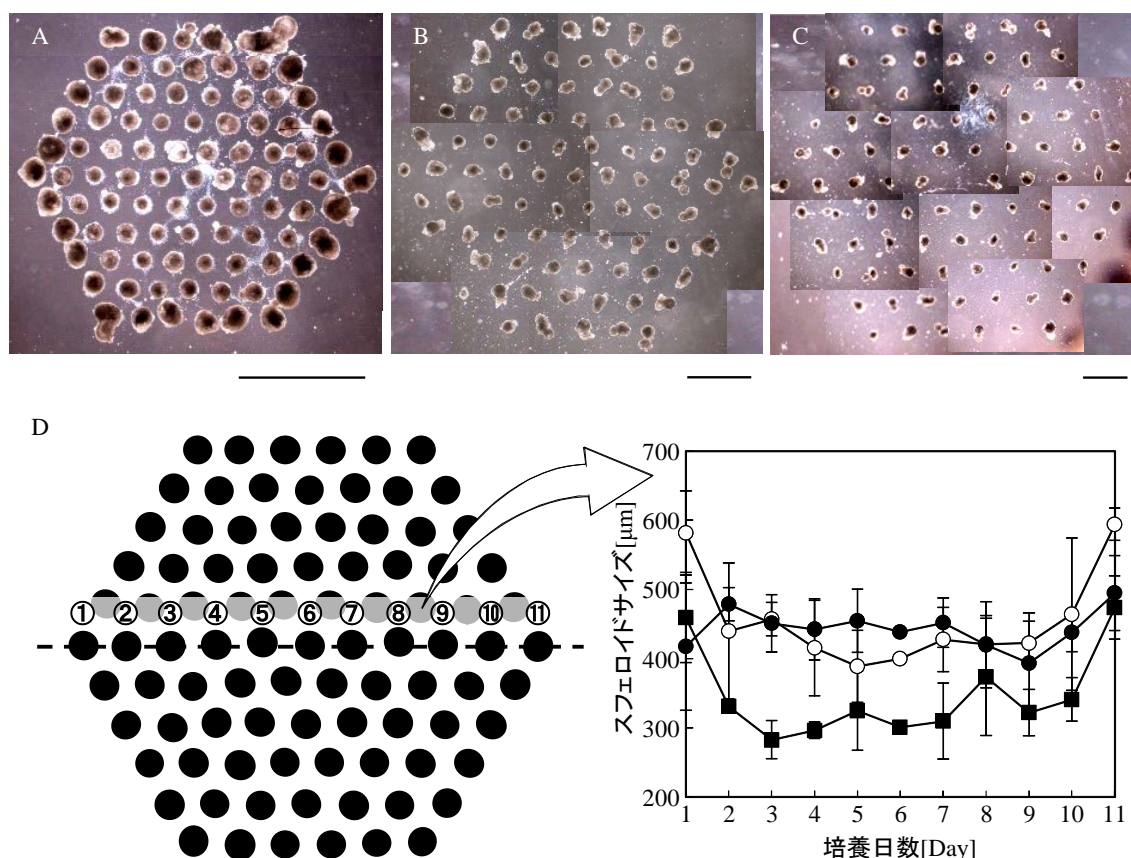


Fig. 4.4. 培養 14 日目のマウス ES スフェロイド形態 (A) Gap500、(B) Gap1000、(C) Gap1500 および (D) 各エリアでのスフェロイドサイズ (■ ; Gap500、○ ; Gap1000、● ; Gap1500)。* $P < 0.05$ 。スケール ; 1mm。

そこで培養経過に伴うスフェロイド間干渉作用の影響を評価するため各チップにおける中心部および外周部のスフェロイドサイズを測定した。培養 3 日目における Gap 500 では 260 から $280\ \mu\text{m}$ 程度のスフェロイドを形成し、その後チップ内部 (Inside および Middle)

におけるスフェロイドサイズは培養 7 日目におよそ $350\ \mu\text{m}$ となりその後プラトーに達した。しかし Gap500 における最外周部のスフェロイドは中心部に比べ高い増殖能を示し $450\ \mu\text{m}$ 程度のサイズに達した (Fig. 4.5-A)。次に Gap 1000 では Gap 500 と同様に培養 3 日目で 260 から $280\ \mu\text{m}$ 程度のスフェロイドを形成し、培養 5 日目以降の増殖能は Gap 500 と同様に中心部 (Inside および Middle) と外周部 (Outside) で違いが生じた。しかし Gap 500 と比較すると中心部 (Inside および Middle) および外周部 (Outside) では高い増殖能を示した (Fig. 4.5-B)。しかし Gap 1500 は Gap 500 および Gap 1000 とは異なり培養経過に伴うスフェロイドサイズはどのエリアにおいても違いが生じず、 $450\ \mu\text{m}$ 程度のサイズに達した (Fig. 4.5-C)。これらの結果よりスフェロイド間干渉作用は培養 5 日目以降のスフェロイド同士が $500\ \mu\text{m}$ 以下になることで発生し、幹細胞特性に影響を与えることが示唆された。

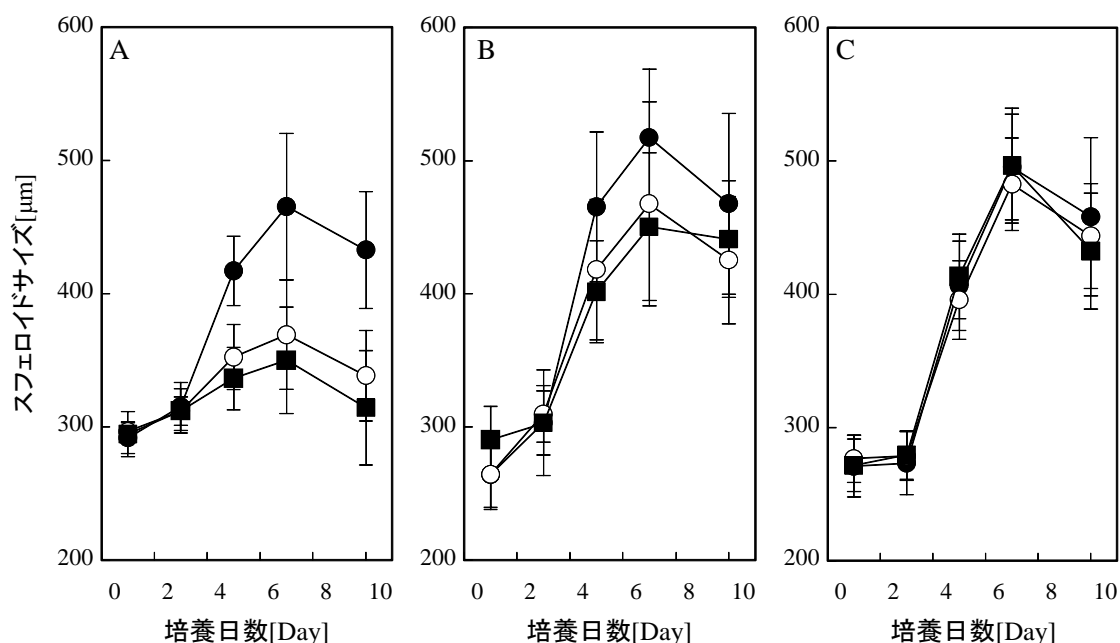


Fig. 4.5. 培養経過に伴うマウス ES スフェロイドの粒径変化 (A) Gap 500、(B) Gap 1000、(C) Gap 1500。 (■ ; Inside、○ ; Middle、● ; Outside)。

4.2.3.2. 拍動率変化

スフェロイド間距離の違いがマウス ES 細胞の分化速度に与える効果を明らかにするために、培養 10 日目における各エリアでの拍動率の評価を行った。

Gap 500 では Outside においてチップ全体の約 30% のスフェロイドが拍動し、中心部に行くにつれて拍動するスフェロイドが減少し中心部では 4% 程度だった。また Gap1000 においてもこの傾向は同様であるものの、Outside では 50% のスフェロイドが拍動し中心部

においても約 20%の拍動率を示した。一方で Gap 1500 ではこれまでと異なり、Inside および Middle で形成されたスフェロイドで 50%の拍動率を示したものの Inside では 30%程度まで減少したものの Gap 1500 で最も拍動現象が確認された (Fig. 4.6)。

拍動現象は心臓が血液を循環させるために起こる生理現象であり、ES/iPS 細胞の分化が促進され、特に心筋細胞へ分化することで発生する[5]。Fig. 4.6 で示す拍動率を比較すると Gap 1500 で最も高い傾向をであり、マウス ES 細胞の増殖能と同様の傾向を示す。筆者らの以前の研究においてはマウス ES 細胞の増殖能が促進されることで分化速度が向上し、高い遺伝子発現比を示した。幹細胞の分化現象は (1) 母細胞が細胞分裂する際に母細胞と性質の異なる娘細胞を形成させる現象あるいは (2) 細胞が持つ遺伝子発現パターンが変動し細胞特性が変化する現象といった様々な諸説があり、幹細胞分化と増殖能には関連があるといえる。

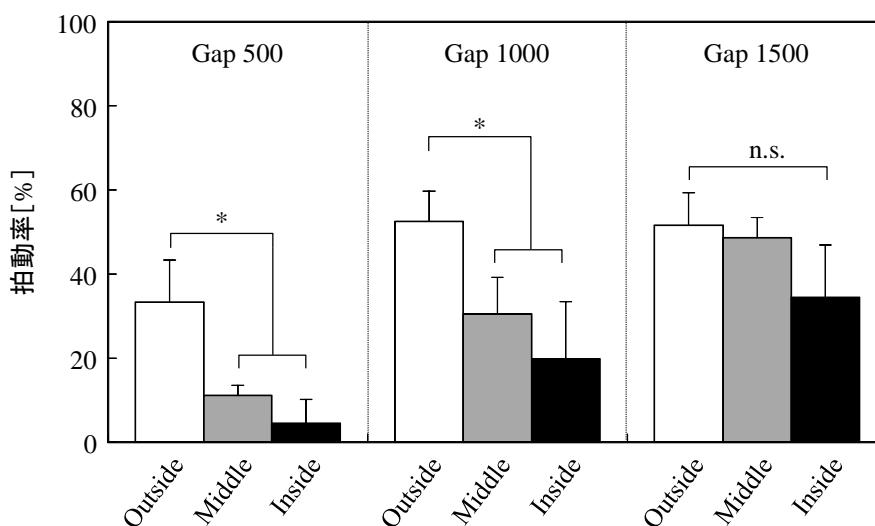


Fig. 4.6. 培養 10 日目におけるマウス ES スフェロイドの拍動率。*P<0.05。

4.2.3.3. 分化マーカー遺伝子発現および低酸素応答

スフェロイド間距離およびその位置関係性の違いが ES 細胞の分化特性に与える効果を明らかにするために、培養 7 日目における特異的分化マーカー遺伝子の評価を行った (Fig. 4.7)。

肝細胞分化マーカー遺伝子の発現を比較すると、Gap 500 で最も高い発現を示し、さらに Gap 500 における位置関係の違いでは Inside で形成されたスフェロイドで最も高い発現を示し外周部に行くにつれて遺伝子発現が減少した。次に心筋分化マーカー遺伝子においては Gap 500 に比べ Gap 1000 および Gap 1500 で高い傾向を示すものの位置関係性に関しては拍動率と異なる傾向となった。一方で、血管形成細胞分化マーカー遺伝子は心筋細胞

と同様の傾向を示した。つまりスフェロイド間距離および位置関係の影響は肝細胞分化マーカー遺伝子の発現に顕著に影響があるものの心筋細胞および血管系細胞分化には十分な影響を与えないことが示唆された (Fig. 4.7)。また低酸素応答遺伝子である *Glut1* および *LDH1* の遺伝子発現は *Gap 500* で最も高い傾向を示し、また *Gap 500* における *Glut1* の発現は外周部 (*Outside*) に比べ中心部 (*Inside* および *Middle*) においてより顕著に高い発現を示した (Fig. 4.8)。つまりスフェロイド間距離が $500 \mu\text{m}$ 以下あるいは周囲を他のスフェロイドで囲むことで生じるスフェロイド近傍での低酸素環境形成が促されることが示唆された。

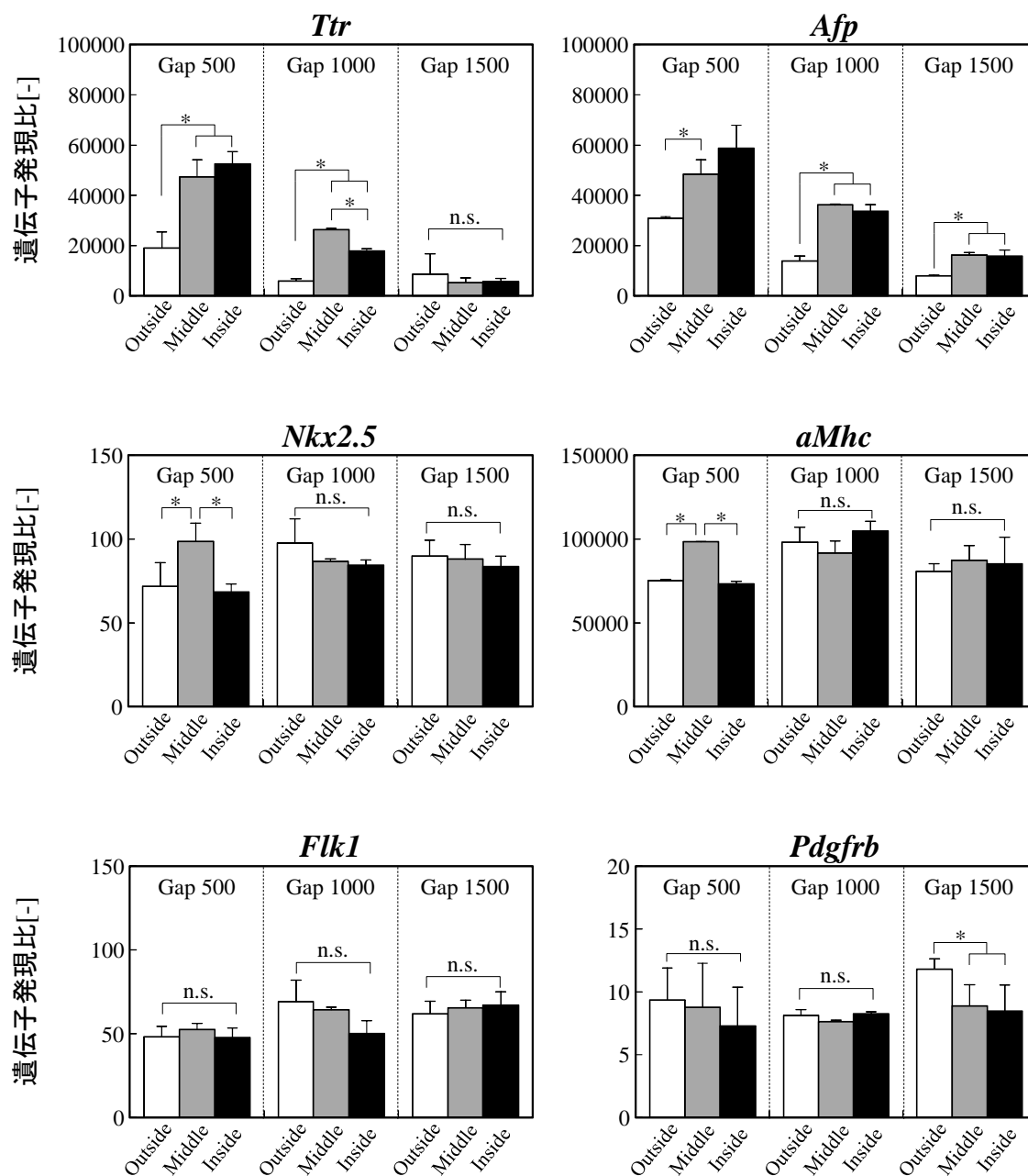


Fig. 4.7. 培養 10 日目におけるスフェロイド距離に応じたマウス ES スフェロイド分化特性。

低酸素環境の形成は肝細胞初期分化を誘導するうえで重要であり、また筆者らも 3-2 節でも低酸素環境の形成と肝細胞分化の関係性を明らかにしてきた。また血管系細胞分化においてもスフェロイド間干渉作用の影響を受けにくい Gap 000 あるいは Gap 1500 で高い発現を示しており、これまでの結果と同様の傾向を示す。一方で心筋細胞分化においては 3.3 節とは異なる傾向を示した。発生過程における心筋細胞分化は肝細胞系内胚葉と隣接して分化が起こり、肝細胞領域形成における重要なサイトカイン (FGF および BMP など) を分泌させる[6,7]。一方で心筋細胞分化においては中胚葉より血球血管前駆細胞と心筋前駆細胞に派生する分化経路をとることから肝細胞系内胚葉以外にも血球血管前駆細胞とも連動して分化が促進される[8]。また本研究で明らかにしたように肝細胞分化と血管系細胞分化は全く正反対の酸素環境によって誘導されている。このことからスフェロイド近傍の微小酸素環境が幹細胞分化と血管系細胞分化のスイッチング現象を引き起こすことが推測される。

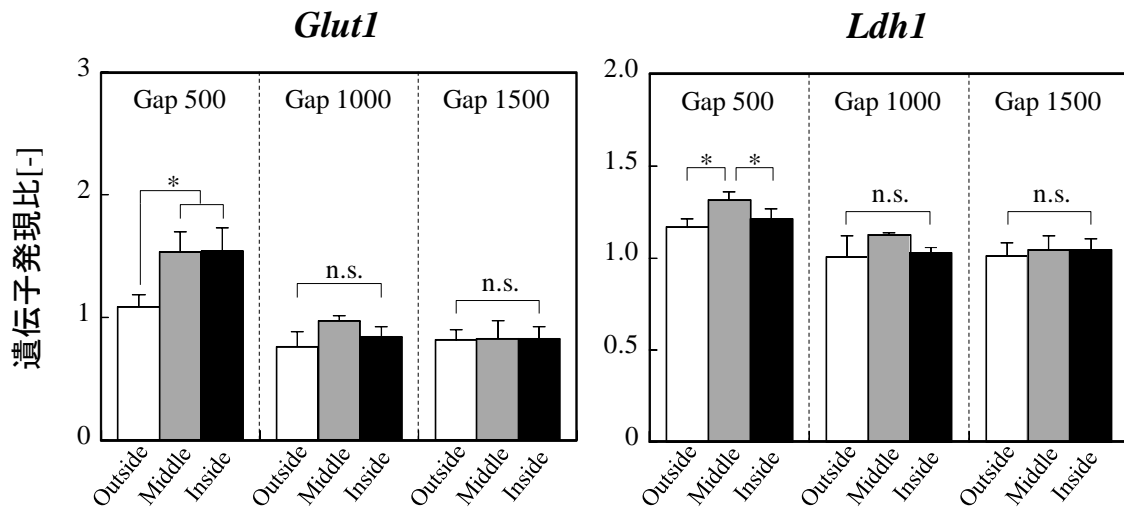


Fig. 4.8. 培養 10 日目におけるマウス ES スフェロイドの低酸素応答 (*Glut1* および *Ldh1*) の遺伝子発現比。

4.2.4. 本節のまとめ

マイクロコンタクトプリンティング法を利用した Gelatin/PEG チップを用いて、スフェロイド間距離をサブミリメートル単位で制御しその影響について評価した。さらにスフェロイドの位置関係性およびスフェロイド間距離の違いによってスフェロイド近傍のマイクロ酸素環境に応じてマウス ES 細胞特性が変化した。スフェロイド間距離の違いが与える幹細胞特性については以下のような結果を得た。

- (1) Gelatin/PEG チップはゼラチンスポットにマウス ES 細胞が接着・増殖することでスフェロイドを形成した。
- (2) 形成されたスフェロイドはスフェロイド間距離および形成される位置関係によって増殖能が変動し、スフェロイド間距離が $500\ \mu\text{m}$ 以下あるいはチップ中心部で形成されることで増殖能が抑制された。
- (3) スフェロイド間距離は中胚葉分化（心筋細胞および血管系細胞）に影響を与えないものの、スフェロイド間距離が $500\ \mu\text{m}$ 以下になると内胚葉分化（肝細胞分化）を促進させた。
- (4) Gelatin/PEG チップではバルクに隣接する外周部に比べ、スフェロイド同士が隣接する中心部では肝細胞分化が促進された。
- (5) スフェロイド間距離が $500\ \mu\text{m}$ 以下あるいは Gelatin/PEG チップの中心部で形成されることでスフェロイド間干渉作用の影響を受けて低酸素環境を形成した。

以上の結果より、スフェロイド間距離が $500\ \mu\text{m}$ 以下になることで低酸素環境の形成および肝細胞分化特性が向上することを実証され、隣接するスフェロイド間で生じる微小酸素濃度勾配は多能性幹細胞特性を制御することが示唆された。次節では、肝細胞スフェロイドを本節と同様のパターンニング培養を行い、肝細胞スフェロイドの特徴と酸素濃度の関係性を明確にする。

4.3. スフェロイド間距離が HepG2 スフェロイド特性に与える効果

4.3.1. 本節の目的

4.2 節ではこれまでにスフェロイド間距離を制御させる方法として表面修飾法を利用して細胞接着部位および非接着部位を培養基板上にアレイ化させたマイクロパターンングチップを開発してきた。このチップは細胞接着部位をマイクロコンタクトプリンティング法によって形成し、その周辺部分を細胞非接着分子によって修飾させることで培養基板上におけるスフェロイドの位置関係を制御させることが可能である。

そこで本節ではヒト肝芽腫瘍細胞株である **HepG2** 細胞を利用して細胞接着部位間の距離が異なるマイクロパターンングチップを作製し、この距離に依存したスフェロイド間距離が肝細胞特性に与える影響について解析した。また培養基板上におけるスフェロイドの位置関係性に着目し、チップ内部と最外周部におけるスフェロイドにおける細胞特性についても評価した。さらにスフェロイド間距離によって形成される培養環境を評価するため、肝細胞特性に影響を与えることが知られている環境因子の一つである酸素環境に着目し、スフェロイド間距離によって変化する周辺酸素環境を評価した。

4.3.2. 実験方法

4.3.2.1. Collagen/PEG パターニングチップ作製

ガラス基板 (24mm×24mm) に 37 個のコラーゲンスポット (細胞接着部位) を有する Collagen/PEG パターニングチップをマイクロコンタクトプリンティング法によって作製した。このチップは表面を Pt 蒸着しコラーゲンスポットを形成後に、金属-チオール結合を介して細胞比接着分子であるポリエチレングリコール (PEG, 日油) を修飾することで作製した。作製した Collagen/PEG パターニングチップは Fig. 4.9 で示す設計条件である。またコラーゲンスポット間の距離を 500、1000、1500 μm と設計したチップをそれぞれ Gap500、Gap1000、Gap1500 とする。さらに各チップを 2 つのエリア (Inside、Outside) に区分してスフェロイドが形成させる位置関係性についても同様に比較した。

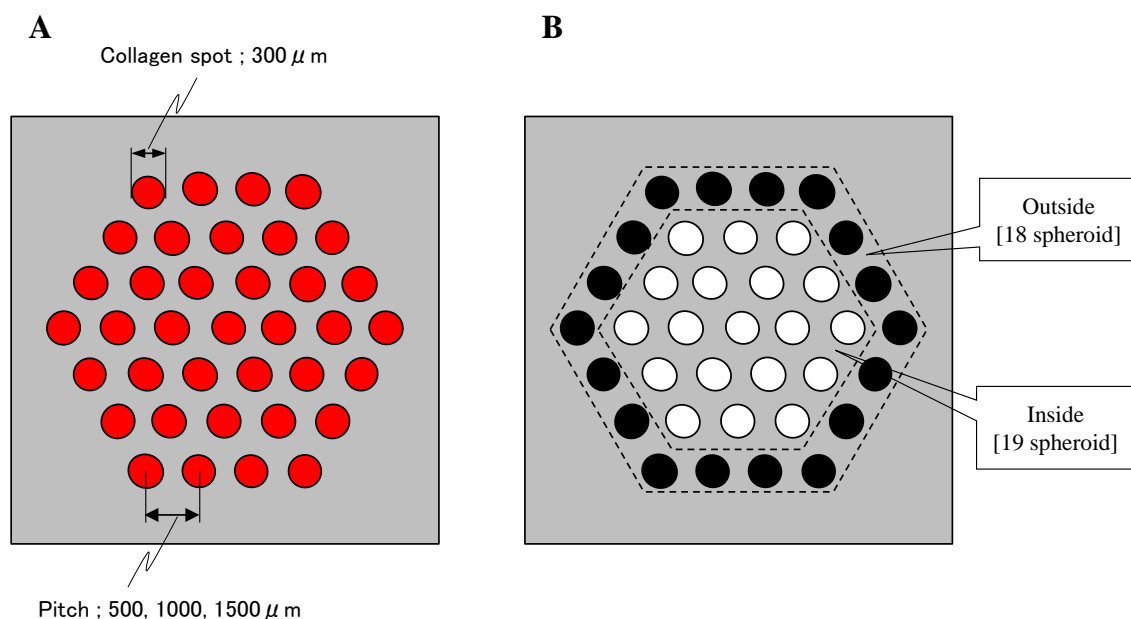


Fig. 4.9. パターニングチップ概念図。(A) パターニングチップ設計条件、(B) チップ条件における位置関係性。

4.3.2.2. HepG2 スフェロイドパターニング培養

培養 5 日目における HepG2 細胞 (RCB1648, 理研) を 1×PBS で 2 回洗浄後 0.05% トリプシン/EDTA 溶液 (Gibco) 1L を添加して剥がし細胞懸濁液を調整後、前日プレインキュしていたマイクロパターニングチップ内に播種した。チップに細胞懸濁液を添加し 2~3 時間後、コラーゲンスポット部分に細胞が接着していることを確認して 35mm 径のペトリ

ディッシュ内に入れているマイクロパターンニングチップを滅菌済みのピンセットで取り出し、DMEM 培地で 2 回程度洗浄後新たな 35mm 径のペトリディッシュに入れて培養を開始した。

4.3.2.3. 接着細胞数測定

播種後 4 時間後におけるコラーゲンスポット上の HepG2 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定化処理を行った。固定した試料を PBS 中の 1 μ g/ml の DAPI (同仁化学, 日本) とともに 30 分間インキュベートし、細胞内の核を染色した。染色された HepG2 スフェロイドを蛍光顕微鏡 (Bioevo BZ-9000; Keyence Corporation, Japan) で撮影し、細胞内の核の数を 2 次元画像分析プログラム (Win ROOF; Mitani, Japan) を用いて測定した。

4.3.2.4. スフェロイド増殖能

また培養経過に伴うスフェロイドサイズの変化を評価するため、培養 3、5、7、9、11、13、14 日目における位相差顕微鏡写真から各チップの 2 つのエリア (inside, Outside) それぞれ 30 個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト (Win ROOF Ver 5.02; Mitani Corp., Japan) を利用してスフェロイドの粒径を測定した。また培養 14 日目における各チップのエリア毎のスフェロイドサイズの関しては位相差顕微鏡写真から 10 個のスフェロイドを無作為に抽出し同様の方法によって測定した。スフェロイドの直径は、スフェロイドの面積から等価円直径 (equivalent circle diameter; ECD) 法により算出した。

また細胞数測定に関しては本研究室で改良を行った DNA-DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 蛍光測定法を利用して、培養 14 日目における細胞数を測定した。TEN buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5) に 100 μ g/mL proteinase K (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加して DNA 抽出液を調製した。DNA 抽出液で細胞を 37 $^{\circ}$ C で 24 時間以上インキュベートして溶解させ、DNA を抽出した。TEN buffer に 1 μ g/mL の DAPI (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加した DAPI 溶液と抽出した DNA 溶液を 100 μ L ずつ 96 ウェルプレート内で混合し、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent Thermo Labssystem; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) で測定した (Ex. 355 nm / Em. 460 nm)。サスペンションから抽出した DNA 溶液を用いて検量線を作成し、検量線を用いて測定した吸光度からスフェロイドあたりの細胞数を算出した。

4.3.2.5. ALB 分泌活性

肝細胞特異的機能発現としてアルブミン分泌活性を評価した。アルブミン分泌濃度は 24 時間培養後の培地を回収後、ELISA 法を用いて解析した。本研究では 2 種類の anti-ALB 抗体を利用したサンドイッチ法を利用した。この方法はまず、goat anti-rat albumin antibody (MP Biomedicals, Cappel Products, USA) を 96well プレーートの各ウェル底面に固定させ、その後各ウェル内で培地サンプルと 1 次抗体を反応させた。次に peroxidase-conjugated sheep anti-rat albumin antibody (MP Biomedicals) を各ウェル内に添加し培地サンプルと反応させた。我々は各ウェル内に ABTS (KPL; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., USA) を添加し microplate reader (Model 550, Bio-Rad Laboratories, USA) を利用して吸光度測定を行った。アルブミン分泌濃度はヒト albumin (MP Biomedicals) で作製したスタンダード曲線を利用して算出した。

4.3.2.6. レゾルフィン生成能解析

各培養条件におけるスフェロイド間距離の違いが薬物代謝に与える影響を評価するために培養 14 日目における HepG2 肝細胞の Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性を評価した。培養 14 日目に 2 μ M 3-Methyl Cholanthrene (3-MC) 添加培地 2 mL に置換し、シトクロム P450 (P450) を 24 時間誘導した。レゾルフィン反応溶液 2 mL に置換し、37°C で 1 時間、60 rpm で回転させながらインキュベータ内で反応させた。反応溶液上清 200 μ L を 96 穴ウェルプレートに入れ、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent Thermo Labsystem) で測定した (Ex. 544 nm / Em. 590 nm) (溶出レゾルフィン)。DNA 抽出液で細胞を溶解し、同様に蛍光プレートリーダーで測定した (蓄積レゾルフィン)。0.01 ~ 1.0 μ mol/L の範囲でレゾルフィンの検量線を作成し、反応溶液中及び細胞内のレゾルフィン量を算出した。細胞数で標準化し、単位細胞数あたりの EROD 活性を算出した。

4.3.2.7. 遺伝子解析

Total RNA は各条件の培養細胞を spin column (NucleoSpin RNAII; Nippon Genetics Co. Ltd.) を用いて説明書どおりに抽出した。cDNA は a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) を用いて説明書どおりに 20 μ g/mL の濃度で調製した。各サンプルはリアルタイム RT-PCR によって測定するまで -20°C で保管した。PCR 解析においては StepOne Real-time PCR 装置を用いて cDNA と TaqMan Gene Expression

Assay Kits (Applied Biosystems) と反応させ、解析した。各遺伝子の発現比は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH (Taqman プローブ、Hs02758991_g1) をハウスキーピング遺伝子として解析プロトコールの一つである $\Delta\Delta$ CT 法を用いて解析を行った。解析した遺伝子としては肝細胞特異的マーカー遺伝子であるアルブミン (ALB、 Taqman プローブ ; Hs00609411_m1)、薬剤代謝活性酵素 (CYP3A4、 Taqman プローブ ; Hs00609411_m1)、低酸素応答マーカー遺伝子であるグルコーストランスporter (Glut-1、 Taqman プローブ ; Hs00892681_m1) および乳酸脱水素酵素 (LDH-1、 Taqman プローブ ; Hs00855332_g1) である。各遺伝子発現比については播種前に調製したマウス iPS 細胞の発現比を 1 とし発現比の変化を比較した。

4.3.2.8. 酸素濃度測定

培養 14 日目における各チップのエリア毎におけるスフェロイド周辺の酸素濃度を測定するため、ニードル式酸素センサー (MicroxTX3, タイテック, Japan) を用いて酸素濃度を測定した。各スフェロイド周辺の酸素濃度は培養面から約 1mm の高さを測定部分とし、各エリアにおいて酸素濃度を約 1 分間測定した数値を平均化した。

4.3.2.9. 統計処理

データは平均±標準偏差で示し、各データは 4 点の比較を行っている。統計処理に関しては一元分散分析を行った。また $P < 0.05$ の値は統計的に有意であると考えられる。

4.3.3. 実験結果および考察

4.3.3.1. スフェロイドの形態とサイズ

播種された HepG2 細胞は播種後 4 時間後に細胞接着部位であるコラーゲンスポットに 368 ± 62 個の細胞が接着・伸展後 (Fig. 4.10)、細胞増殖に伴って培養 3 日目にスフェロイドを形成し培養経過に伴いスフェロイドサイズが増加した (Fig. 4.11)。

そこで培養経過に伴うスフェロイド変化をチップ内部と最外周部のスフェロイドサイズを測定したところ、Gap500 では培養 3 日目に $250 \mu\text{m}$ のスフェロイドを形成し、その後チップ内部におけるスフェロイドサイズは培養 5 日目におよそ $300 \mu\text{m}$ となりその後プラト

一に達した。しかし Gap500 における最外周部のスフェロイドは 5 日目以降でも増殖が抑制されずに 500 μm まで増加し続けた (Fig. 4.12-A)。次に Gap1000 では培養 3 日目に 300 μm のスフェロイドを形成したが、培養 5 日目以降は Gap500 と同様にチップ内部では細胞増殖能の抑制によっておよそ 400 μm となったが最外周部では 600 μm 程度にまで達した (Fig. 4.12-B)。しかし Gap1500 は Gap500 および Gap1000 とは異なり培養 3 日目で 250 μm のスフェロイドを形成された後培養 9 日目まではチップ内部および最外周部のスフェロイドサイズの違いは生まれなかった (Fig. 4.12-C)。

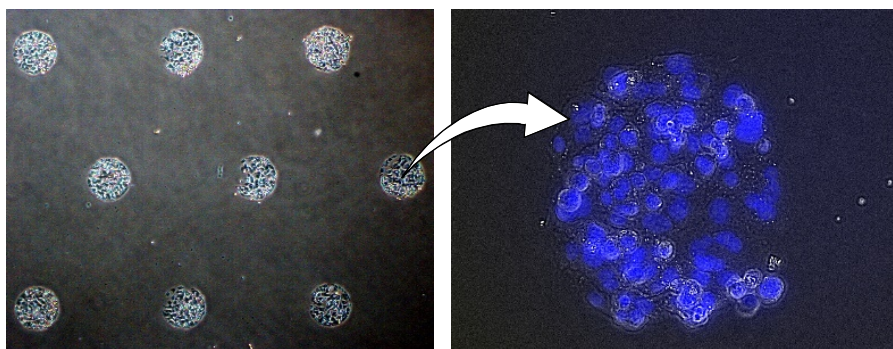


Fig. 4.10. 培養 4 時間後のコラーゲンスポット上の接着細胞の位相差増および DAPI 染色画像 (Gap1000)。

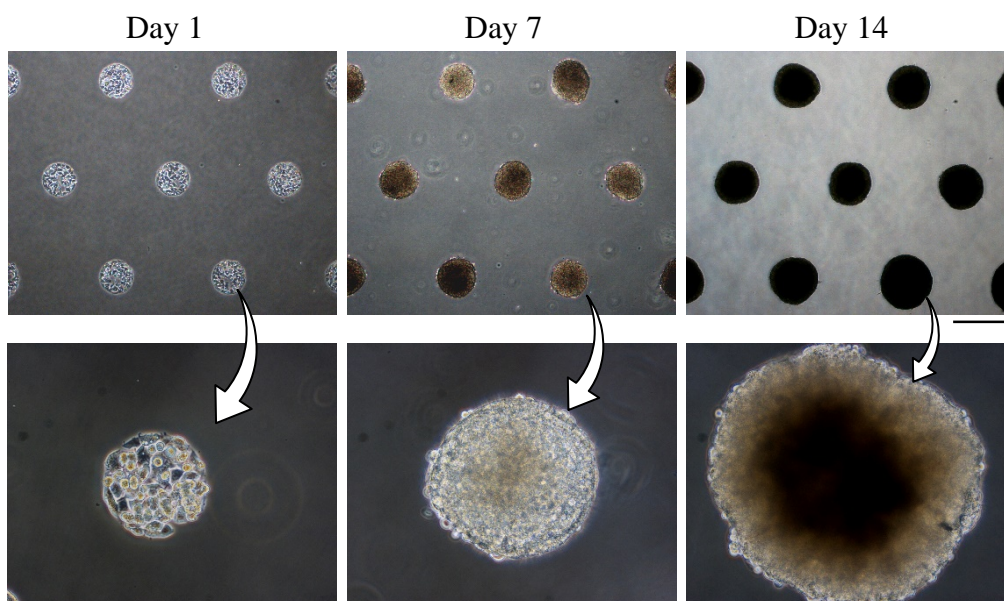


Fig. 4.11. 培養経過に伴う HepG2 スフェロイド形態変化 (Gap1000)。スケールバー ; 500 μm 。

さらに培養 14 日目における各チップのスフェロイドサイズを比較すると、Gap500 ではチップ内部と最外周部のスフェロイドサイズに違いが生じ、スフェロイド間距離が遠くなるにつれてその傾向が緩和されていくことが考えられる (Fig. 4.13-A)。そこで培養 14 日目における各チップの内部と最外周部のスフェロイドサイズを測定したところ、Gap500 で

は最外周部のスフェロイドサイズが $500\mu\text{m}$ であるのに対して内部のスフェロイドサイズはおよそ $300\mu\text{m}$ であった。しかし Gap1000 では最外周部のスフェロイドは $600\mu\text{m}$ であるものの、内部のスフェロイドサイズでは $500\mu\text{m}$ と G500 に比べ位置関係によって生じるスフェロイドサイズの違いは緩和されていた。さらに Gap1500 ではその影響がより緩和されていた (Fig. 4.13-B)。つまりスフェロイド間距離およびチップ内における位置関係性がスフェロイド増殖能に影響があることが考えられる。実際に培養 14 日目には Gap500 にはおよそ 20000 個程度の HepG2 細胞が存在しているのに対して Gap 1000 および Gap 1500 ではそれぞれ Gap 500 に比べ細胞数はおよそ 2 倍、4 倍となっており、増殖能の違いを示した (Fig. 4.13-C)。

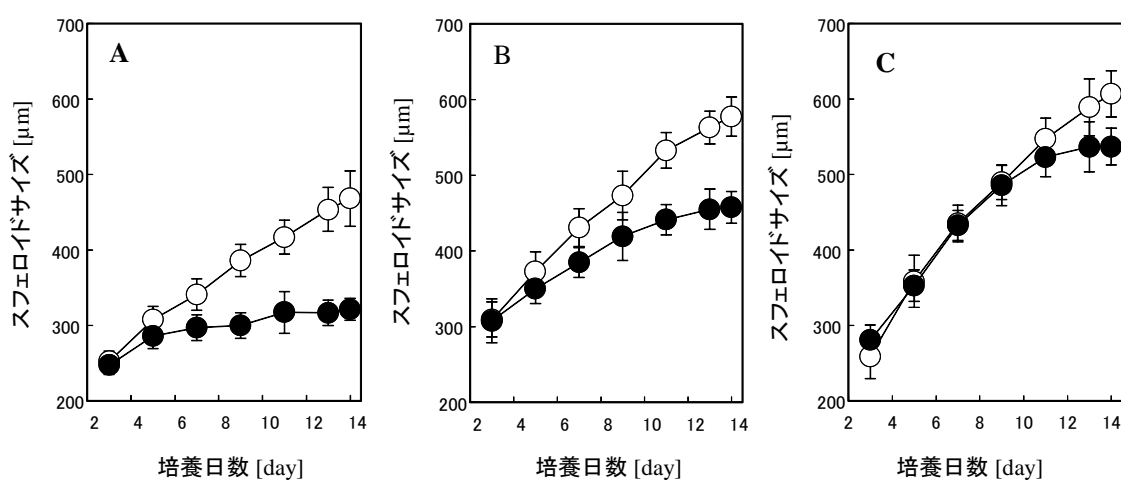


Fig. 4.12. 培養経過に伴う HepG2 スフェロイドサイズ変化、(A) Gap500、(B) Gap1000、(C) Gap1500 (● : Inside, ○ : Outside)。

スフェロイド間距離の増加とともに細胞増殖によるスフェロイド増殖が増加し、スフェロイド間のギャップを広げることによってスフェロイド周囲の培養環境が改善されることが示唆された。さらに、Gap 500 および Gap 1000 では、初期の培養段階では外側および内側のチップ領域のスフェロイド間でスフェロイドの顕著な差異が観察された。内側のスフェロイドは隣接するスフェロイドで囲まれていましたが、外側のスフェロイドはある方向にのみ隣接していました。したがって、外側スフェロイドは、内側スフェロイドよりも多くの酸素と栄養素を媒体から得ることができ、その結果、内側スフェロイドに比べて外側スフェロイドの成長が促進されると考えられる。さらに、スフェロイド間距離が $1000\mu\text{m}$ 以下になると HepG2 スフェロイドの成長が変化するという現象は、4.2 節での ES スフェロイドと類似しており、スフェロイドの成長が変化する間隙距離は、異なる細胞タイプにおいて一般的であると考えられる。

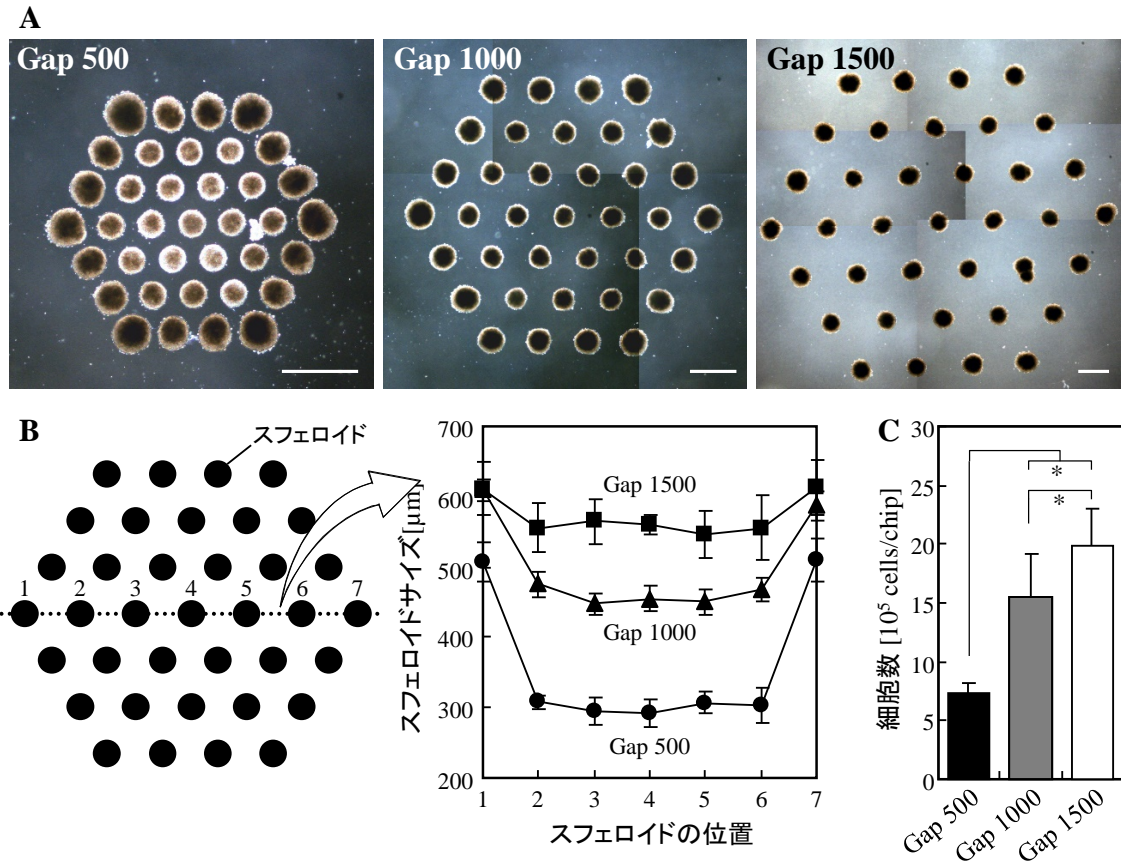


Fig. 4.13. 各 Collagen/PEG チップにおける HepG2 スフェロイド形態変化。(A) 培養 14 日目における各チップにおける HepG2 スフェロイド形態、スケールバー；1 mm。(B) 形成位置に依存した HepG2 スフェロイドサイズ変化。(●：Gap500, ▲：Gap1000, ■：Gap1500)。(C) 培養 14 日目におけるチップあたりの細胞数。* $P < 0.05$ 。

4.3.3.2. 肝細胞スフェロイド特性

HepG2 スフェロイド間相互作用が肝細胞特異的機能発現に与える影響を明らかにするために、培養 14 日目におけるスフェロイド当たりの細胞数およびチップあたりのアルブミン分泌濃度を評価した。さらに培養 14 日目における各エリアにおける肝細胞特異的マーカー遺伝子の評価を行った。

アルブミン分泌能および EROD 活性を比較すると細胞あたりの機能発現には違いがなく、チップあたりで比較すると増殖能の高い Gap1500 において両機能活性が最も高い傾向を示した。また各チップでの Inside と Outside における ALB および CYP3A4 の遺伝子発現に違いはなく、形成される位置関係性においては肝細胞特性に影響を与えないことが示唆された (Fig. 4.14)。肝細胞特性は酸素環境以外にスフェロイドサイズの効果が発生し、実際にスフェロイドサイズが $200 \mu\text{m}$ 以上になると内部の細胞は生存することができないこ

とが報告されている[9]。各チップではスフェロイドサイズがすべて $300\mu\text{m}$ 以上となりサイズ効果による影響が働き、機能発現には違いが発生しなかったのではないかと考えている。

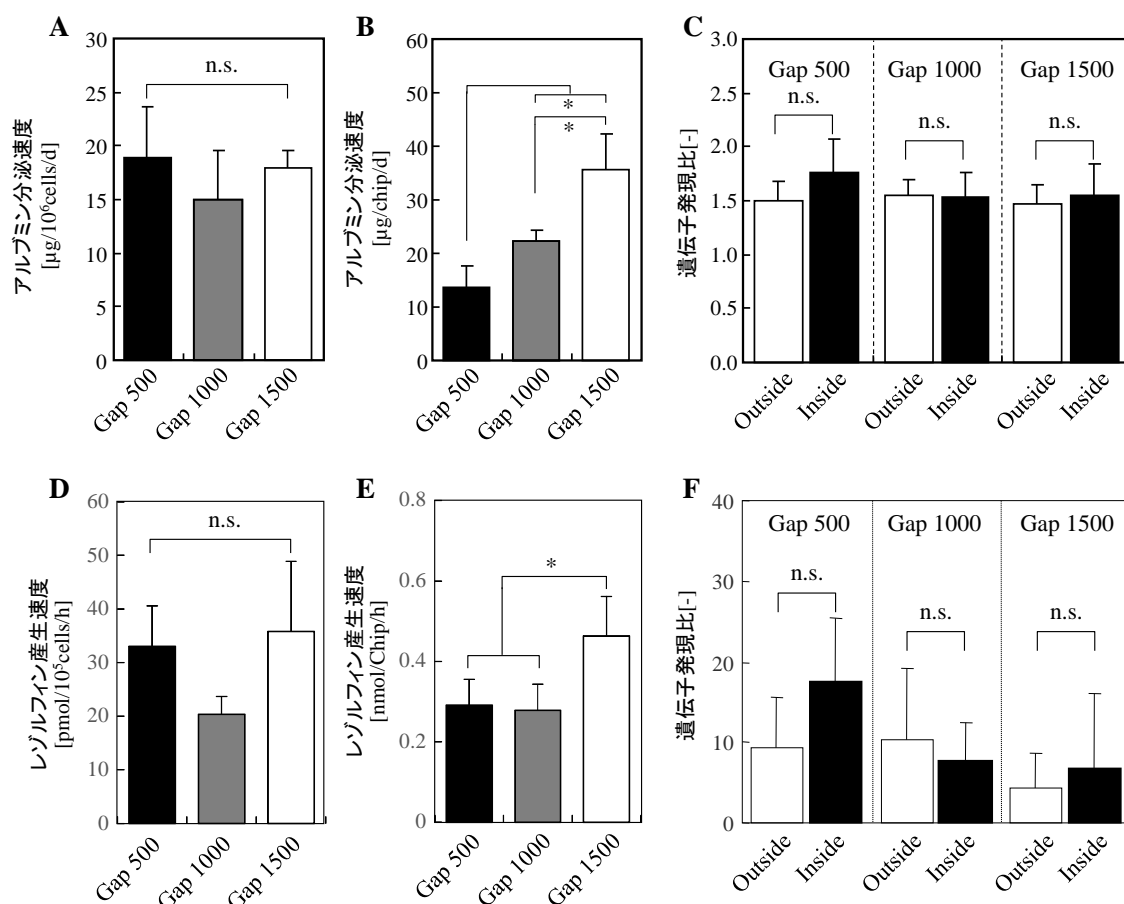


Fig. 4.14. 14 日目における肝細胞特異的機能発現変化。(A) 細胞あたりのアルブミン分泌活性、(B) Chip あたりのアルブミン分泌活性、(C) 各エリアにおける Albumin-mRNA 遺伝子発現比、(D) 細胞あたりの EROD 活性、(E) Chip あたりの EROD 活性、(F) 各エリアにおける CYP3A4-mRNA 遺伝子発現比。* $P < 0.05$ 。

4.3.3.3. 基礎代謝活性

HepG2 スフェロイド間相互作用における基礎代謝活性への影響を明らかにするために、培養 14 日目における細胞当たりのグルコース消費速度および乳酸生成速度の解析を行った。さらに培養 14 日目における各エリアにおける低酸素応答マーカー遺伝子についても評価した。

まず培養 14 日目における細胞当たりの乳酸生成量を比較すると、グルコース消費量および乳酸生成量はスフェロイド間距離が $500\mu\text{m}$ で高く、スフェロイド間距離が $1000\mu\text{m}$ 以上に広がることでグルコース消費量および乳酸生成量が低下した。しかしどの培養系においても乳酸生成あたりのグルコース消費量には違いはない。また培養 14 日目における各チ

アップ上での Inside および Outside におけるスフェロイドの Glut1 および LDH1 の遺伝子発現を比較すると、Gap1500 では違いがないものの Gap500 では Inside のスフェロイドで高い発現を示し Gap1000 では Outside のスフェロイドで高い発現を示した (Fig. 4.15)。

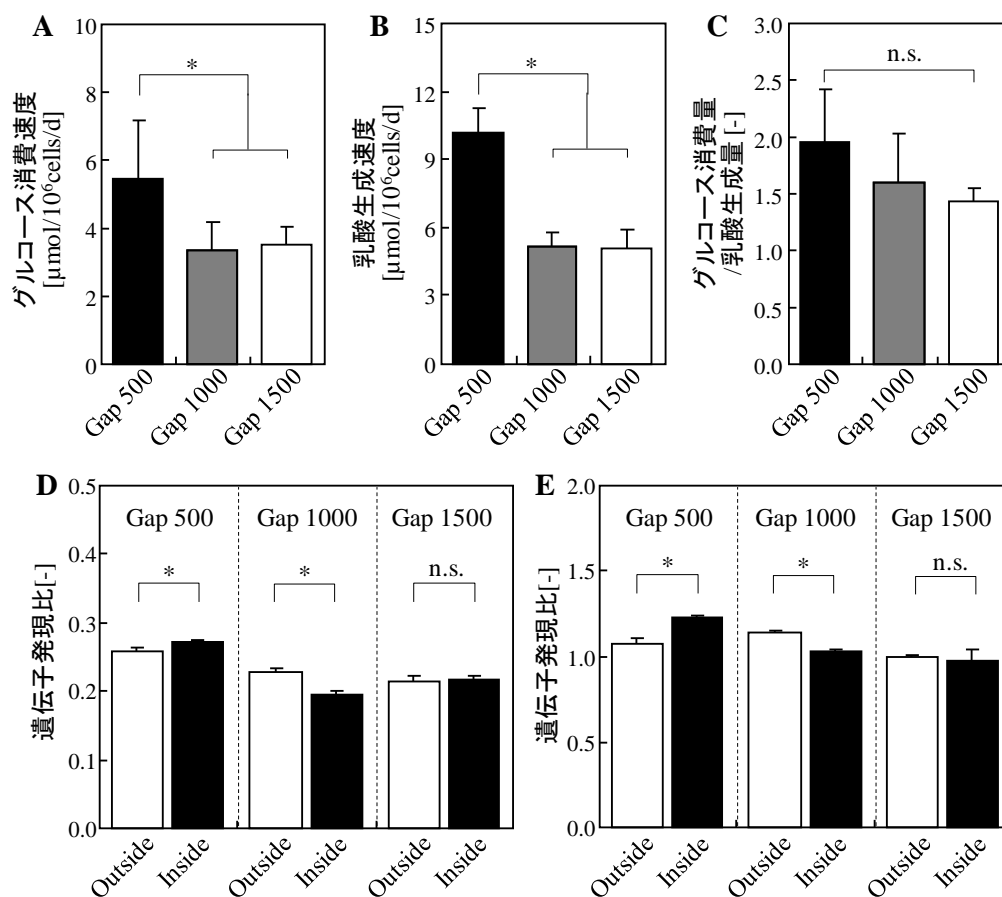


Fig. 4.15. 14 日目における HepG2 スフェロイド基礎代謝活性。(A) 細胞あたりのグルコース消費速度、(B) 細胞あたりの乳酸生成速度、(C) 乳酸生成あたりにおけるグルコース消費量、(D) 各エリアにおけ Glut1-mRNA 遺伝子発現比、(E) 各エリアにおけ LDH1-mRNA 遺伝子発現比。*P<0.05。

4.2 節では ES スフェロイドはスフェロイド間距離が 500μm 以下になることで低酸素環境を形成しており、HepG2 スフェロイドの代謝活性においても 500μm 以下でグルコース消費量および乳酸生成量が向上した。つまり HepG2 スフェロイド間距離が近づくことで低酸素環境を形成することが考えられ、実際に Gap500 では細胞増殖能が抑制されていた (Fig. 4.13-C)。一方で Gap1000 ではこれまでと逆に増殖能が高い Outside で高い遺伝子発現が向上しており、この現象としてはスフェロイドサイズが関連していることが考えられる。肝細胞スフェロイドはサイズが 100~200 μm 程度でなければ生存することはできない。しかし Gap1000 における Outside ではスフェロイドサイズが 600 μm 程度あり、Inside に比べスフェロイド内部で低酸素環境を形成したことが考えられる。

しかし細胞増殖阻害は酸素濃度以外にも培養培地の物質濃度の影響が考えられる。実際に3.4節でも述べたようにグルコース濃度が0.5g/mL以下あるいは乳酸濃度が20mM以上になることで発生する[10, 11]。しかし14日目の培養培地はiPSスフェロイド同様に栄養源の枯渇しておらず、また乳酸のほとんど蓄積されていない (Fig. 4.16)。つまり培地成分の影響は発生しておらず、HepG2スフェロイド培養系においてもスフェロイド周辺の微小酸素環境による影響が作用していることが推測できる。

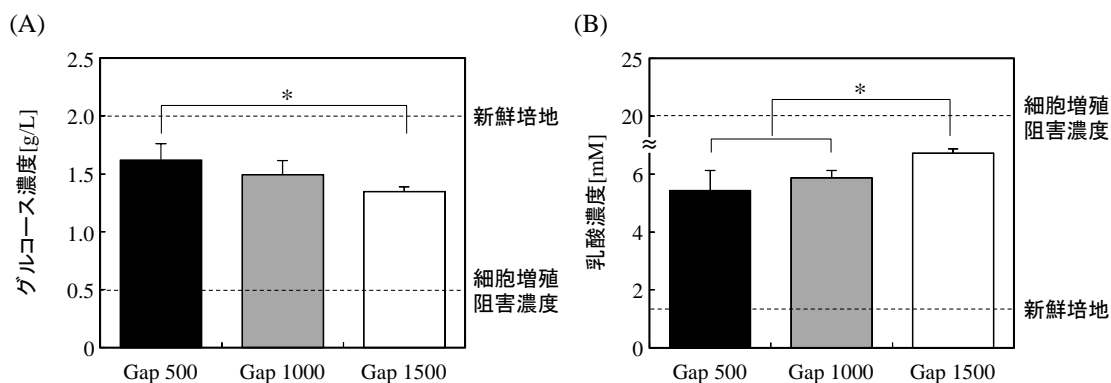


Fig. 4.16. 14日目における増殖阻害をもたらす培地成分濃度。(A)グルコース残存濃度¹⁰、(B)乳酸蓄積濃度¹¹。*P<0.05。

4.3.3.4. スフェロイド周辺の酸素化状態

そこでスフェロイドを取り巻く培養環境を評価するために培養14日目における各チップにおけるエリアごとの溶存酸素濃度を測定した (Fig. 4.17)。

スフェロイドが存在しないエリア (バルク領域) での酸素濃度は飽和酸素濃度 (6.86ppm) を示していたが、チップの外周部に位置するスフェロイドの周辺酸素濃度は5~6ppmにまで低下した。Gap 1000およびGap 1500ではスフェロイド形成位置1~3までは酸素濃度が低下していくものの、チップ中心部では一定の酸素濃度 (それぞれ約3ppm, 4ppm) を示した。一方でGap 500ではGap 1000およびGap 1500と同様に中心部になるにつれて酸素濃度は低下していき、さらにスフェロイド形成位置4および5でも酸素濃度が低下していき最終的に約2ppm程度まで低下していった (Fig. 4.17-C)。すなわち、静置下におけるスフェロイド培養は培養基板上の最外周部に比べ中心部におけるスフェロイド周辺の酸素濃度は低下し、その酸素濃度の低下はスフェロイド間距離によって制御されていることを示す。

各Collagen/PEGチップでは外周部に存在するスフェロイドはバルク部分に隣接することで飽和酸素状態に近い環境であるものの、中心部では各スフェロイドが四方八方を他のスフェロイドで囲まれていることで酸素濃度が低下とともにスフェロイド近傍の微小酸素環境の影響が発生する。実際にGap500の中心部では外周部に比べGlut1およびLDH-1の発現が向上し、さらにスフェロイド周辺の酸素濃度は*in vivo*における低酸素濃度 (2.6ppm

程度) 付近まで低下していた (Fig. 4.17-B)。つまりスフェロイド間相互作用の本質は互いの周辺酸素の奪い合いであるといえ、静置培養系におけるスフェロイドの大量培養は隣接するスフェロイド同士の距離および各スフェロイドを形成する位置関係によって自発的に形成するマイクロ酸素環境の影響を受けることが示唆された。

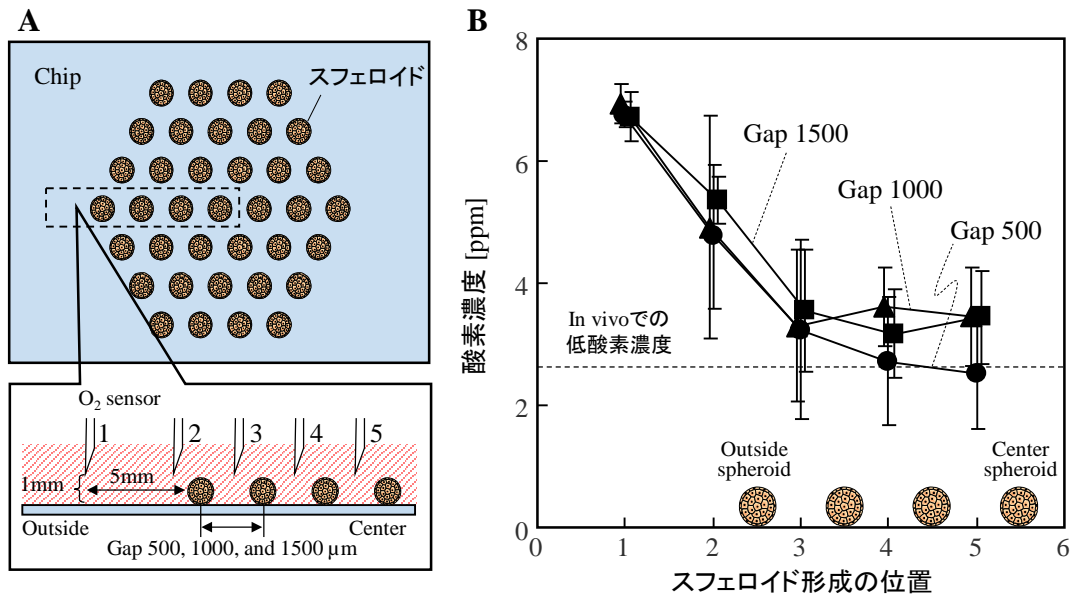


Fig. 4.17. 培養 14 日目における HepG2 スフェロイド近傍の酸素濃度、(A) 酸素濃度測定個所 (上面図および側面図)、(B) 各エリアにおける HepG2 スフェロイド近傍の酸素濃度 (● ; Gap 500、▲ ; Gap 1000、■ ; Gap 1500)。

4.3.4. 本節のまとめ

マイクロコンタクトプリンティング法を利用した Gelatin/PEG チップを用いて、HepG2 スフェロイド間距離をサブミリメートル単位で制御しその影響について評価した。さらに ES スフェロイドと同様にスフェロイド形成の位置関係性の違いによってスフェロイド近傍の微小酸素環境に応じて HepG2 細胞特性の増殖能および機能発現が変化し、スフェロイド間距離の違いが与える肝細胞特性については以下のような結果を得た。

- (1) Collagen/PEG チップは Colalgen スポットに 350 個程の HepG2 細胞が接着・増殖することでスフェロイドを形成した。
- (2) 形成されたスフェロイドはスフェロイド間距離および形成される位置関係によって増殖能が変動し、ES スフェロイドと同様にスフェロイド間距離が 500 μm 以下およびチップ中心部で形成されることで増殖能が抑制された。
- (3) スフェロイド間距離の違いは細胞あたりの肝細胞特異的機能発現に影響を与えないものの、グルコース消費および乳酸生成の活性はスフェロイド間距離が 500 μm 以下になるとことで促進された。
- (4) スフェロイド間距離が 500 μm 以下になるとパターンニングチップの中心部に存在するスフェロイド近傍の酸素濃度は *in vivo* 下での低酸素環境と同程度の環境を形成することを示した。

以上の結果より、スフェロイド間距離が 500 μm 以下になることでスフェロイド近傍の酸素濃度が低下し細胞特性に影響を与えることを実証され、細胞増殖能の抑制および肝細胞分化を促進させる条件では *in vivo* での低酸素環境と同様の環境を形成している可能性餓死された。

4.4. 本章のまとめ

本章では、スフェロイドパターンニングチップを利用して、スフェロイド間距離および位置関係性を制御し、ES スフェロイド分化特性および HepG2 スフェロイド特性とスフェロイド近傍の微小酸素環境の関係性について評価を行った。

まず、ES スフェロイドをターゲットに、細胞パターンニング技術を利用して隣接するスフェロイドの位置関係性を制御すると、スフェロイド間距離が近づくことで低酸素応答遺伝子発現が向上することを示した。また、ES 細胞の分化特性にスフェロイド間距離が近づくことで肝細胞分化特性が向上し、逆にスフェロイド間距離が遠くなることで血管系細胞分化が向上することを明らかにした。

次に、肝細胞スフェロイドにおいても同様に細胞増殖能や機能発現、嫌氣的代謝活性を評価すると肝細胞特異的機能発現には違いはなかったものの、スフェロイド間距離が 500 μ m 以下になると細胞増殖能の抑制および嫌氣的代謝活性が向上することを示した。

最後に、肝細胞スフェロイドのパターンニング培養下においてスフェロイド間距離が 500 μ m 以下になるとスフェロイド近傍の酸素濃度が低下していき、*in vivo* と同様の低酸素応答現象が発生することを明らかにし、スフェロイド自身が形成する微小酸素濃度勾配が細胞特性を支配することが示唆された。

以上のことより、スフェロイド距離に依存した近傍の酸素環境がスフェロイド特性に影響を与えることを示した。

【参考文献】

1. **Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A.:** Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.*, **148**, 3–15 (2010).
2. **Koike, M., Sakaki, S., Amano, Y., and Kurosawa, H.:** Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 294–299 (2007).
3. **Mori, R., Sakai, Y. and Nakazawa, K.:** Micropatterned Organoid Culture of Rat Hepatocytes and HepG2 Cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 237-242, 2008.
4. **Nakazawa, K., Shinmura, Y., Yoshiura, Y. and Sakai, Y.:** Effect of cell spot sizes on micropatterned cultures of rat hepatocytes. *Biochem. Eng. J.*, **53**, 85–91, 2010.
5. **Narazaki, G., Uosaki, H., Teranishi, M., Okita, K., Kim, B., Matsuoka, S., Yamanaka, S. and Yamashita, J, K.:** Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells From Mouse Induced Pluripotent Stem Cell. *Circulation*, **118**, 498-506, 2008.
6. **Katsuda, T., Sakai, Y. and Ochiya, T.:** Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes As an Alternative to Human Adult Hepatocytes. *Journal of Stem Cells*, **7**, 1-17, 2012.
7. **Ogawa, S., Tagawa, Y., Kamiyoshi, A., Suzuki, A., Nakayama, J., Hashikura, Y. and Miyagawa, S.:** Crucial Roles of Mesodermal Cell Lineages in a Murine Embryonic Stem Cell-Derived In Vitro Liver Organogenesis System. *Stem Cells*, **23**, 903–913, 2005.
8. **Yamashita, J, K., Takano, M., Hiraoka-Kanie, M., Shimazu, C., Peishi, Y., Yanagi, K., Nakano, A., Inoue, E., Kita, F. and Nishikawa, S.:** Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *The FASEB Journal*, **19**, 1534-1536, 2005.
9. **Tamura, T., Sakai, Y., Nakazawa, K.:** Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip. *J Mater Sci: Mater Med*, **19**, 2071-2077, 2008.
10. **Tannock, I. F. and Kopelyan, I.:** Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line, *Cancer Res.*, **46**, 3105-3110, 1986.
11. **Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M.:** Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **30**, 29-41, 1991.

第 5 章：ガス透過性培養基板を利用した幹細胞の分化

5.1. 本章の目的

本技術は 2.2 節で示したように、様々な設計条件でのマイクロウェルチップおよびマイクロパターンニングチップを用いてマウス ES/iPS スフェロイド培養を行い、スフェロイド周辺の微小培養環境を制御するという発想に基づいている。スフェロイド周辺の微小培養環境を制御する影響因子としてはスフェロイドニッチの影響を考慮することが重要である。またスフェロイド間干渉作用によって変化するマイクロ培養環境因子として培地への溶解性が非常に低く、さらには幹細胞分化特性における影響が多数報告されている「酸素状態」に着目した。

そこで本章では、マウス ES/iPS スフェロイド間干渉作用によって生じる分化スイッチング現象とスフェロイド周辺の酸素環境の関係性およびその閾値の探索を目的とした。具体的には、5.2 および 5.3 節ではチップ材質としてこれまで使用していた酸素非透過性材料である PMMA と酸素透過性に優れた PDMS を用いてスフェロイド自身が形成する酸素環境の違いが分化特性に与える影響について評価した。

5.2. 酸素透過性材料が iPS スフェロイド特性に与える効果

5.2.1. 本節の目的

培地への溶解度が低い酸素は培養細胞に様々な影響を与えることが多く報告され、実際に生体内に存在する多能性幹細胞は細胞周辺の酸素濃度の変化によって分化特性を制御されている[1,2]。つまり細胞周辺の酸素環境は細胞分化現象を理解するうえで重要な因子といえる。

培養細胞周辺の酸素環境を制御する手法としては培養系内への酸素供給量を制御する方法が挙げられる。Katsuda らはインキュベータを利用して iPS 細胞を低酸素下で培養することで効率的に肝細胞分化誘導を行えることを報告している[3]。さらに近年では細胞周辺の酸素環境をより厳密に制御するために培養基板の酸素透過性に着目され、Otsuji らはヒト多能性幹細胞培養下においてガス透過性培養バッグを用いることで増殖能および生存率が向上し大量培養が可能であることを報告している[4]。

そこで本研究では、多数のスフェロイドが隣接するマイクロウェルチップ培養と 1 つのスフェロイドが独立して存在する HD 法を用いてマウス iPS スフェロイド培養を行い、スフェロイド培養下で自発的に形成される酸素環境の違いが iPS 細胞特性に与える効果を評価した。さらに培養基板材質に依存した酸素環境の影響も評価するために酸素非透過性材料であるポリメタクリレート (PMMA) と酸素透過性材料であるポリジメチルシロキサン (PDMS) で作製したマイクロウェルチップを用いてマウス iPS スフェロイド特性についても同様に評価した。これらの検討を通して、スフェロイド自身が形成する酸素環境と幹細胞特性の関係性を明らかにした。

5.2.2. 実験方法

5.2.2.1. 気液/気固界面を介したスフェロイドへの酸素供給の概要

生体内の酸素環境は血液成分の一つであるヘモグロビンと酸素が結合することで酸素飽和度を 100% 近く確保しているのに対して *in vitro* 下の培養系では酸素は培養培地への溶解度が低く培養細胞への酸素供給が低下する。またスフェロイドは中心部において低酸素環境を形成しやすく、また培養系内に多数のスフェロイドが存在するマイクロウェルチップ培養では培養系全体の酸素濃度が低下しやすく低酸素環境を形成する[5]。そこで近年では培養細胞への酸素供給として培地を介した気-液界面以外にも酸素透過性材料を利用して気-固界面を介したに酸素を供給させることが重要となる。そこで本節ではチップ材質を酸素透過性に優れた PDMS を利用してチップ底面からスフェロイドへダイレクトに酸素供給させる培養系を発想した。本節で利用する各培養条件の酸素供給条件の概念図を Fig. 5.1 に示す。

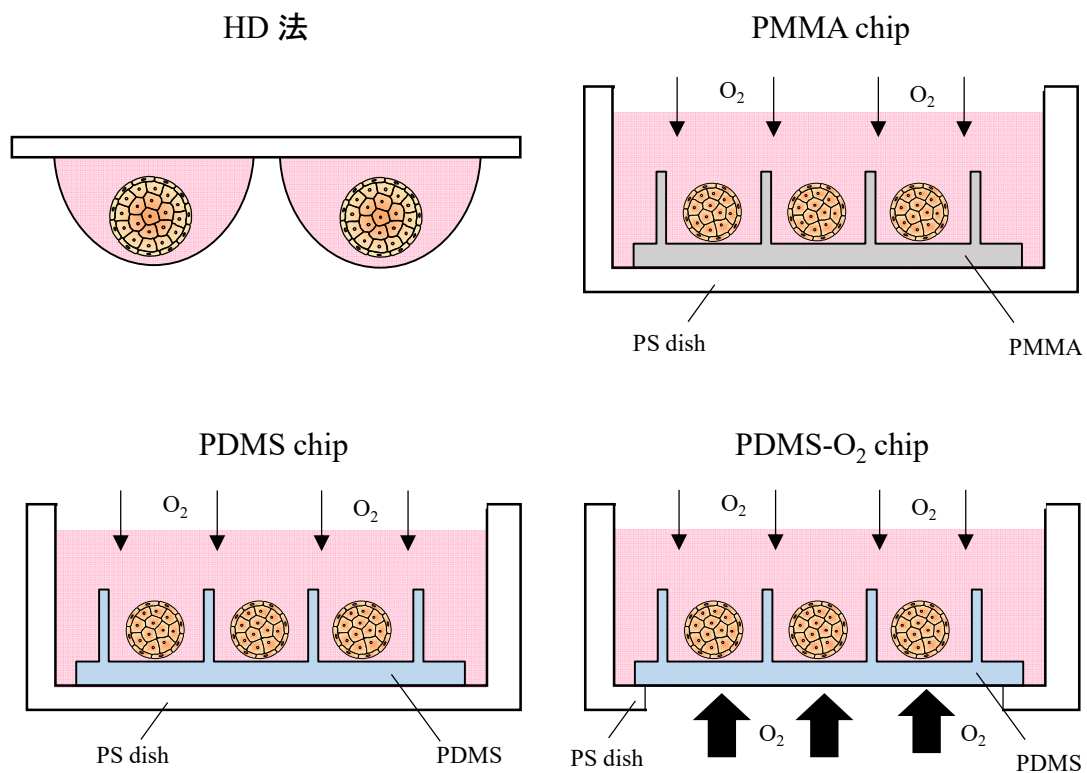


Fig. 5.1. マイクロウェルチップへの酸素供給の概念

5.2.2.2. PMMA/PDMS チップの作製

PMMA チップは PMMA 基板 (24mm×24mm) に 139 個のマイクロウェル構造を有するマイクロウェルチップを微細加工機 (PMT Corp.) によって作製した (Fig. 5.2)。マイクロウェルの構造はウェル径およびウェル深さを $500\ \mu\text{m}$ とし、ウェル間距離を $800\ \mu\text{m}$ としている。

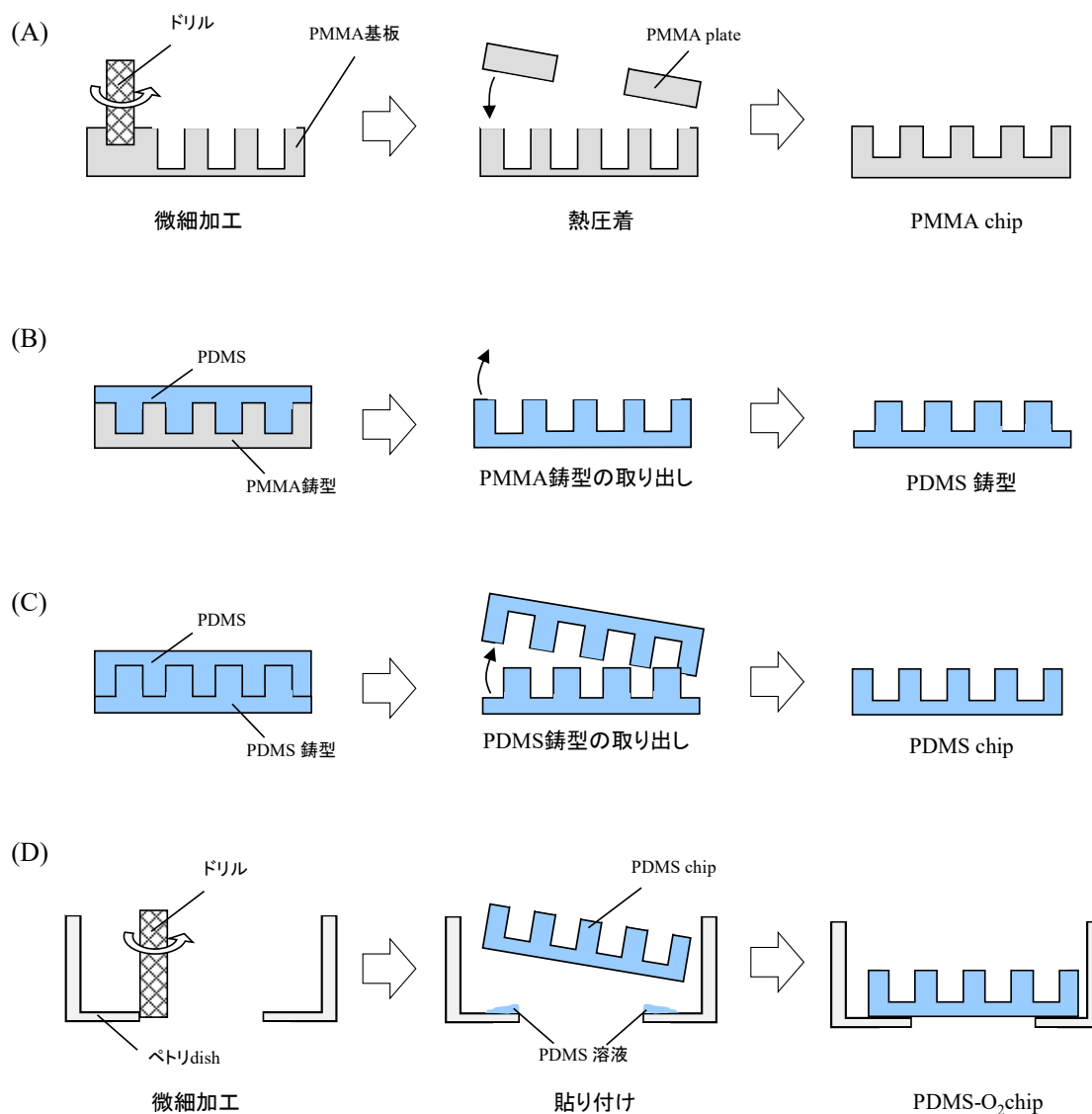


Fig. 5.2. 作製した PMMA/PDMS チップの作製工程。(A) PMMA チップ、(B, C) PDMS チップ、(D) PDMS-O₂ チップ。

また 1.5mm の厚みのある PMMA 基板を微細加工機によって径 7mm を切り出し、この貫通させた PMMA 基板と PMMA チップを乾燥機 (PMT Corp.) で熱圧着処理 (106°C 、2 時間) を行った。その後このチップ表面を Pt 蒸着した後に金属-チオール結合を介して細

胞比接着分子である PEG を修飾した。また PDMS チップは PDMS 溶液：架橋剤=10：1 になるように混合し、その混合溶液（9mL）に PMMA チップを埋め込み 3 日間乾燥させた。その後 PMMA チップを剥離させ、径 7mm で切り出し PDMS チップの鋳型を作製した[6]。その後この PDMS 鋳型を上記の混合溶液（12mL）に再度埋め込み 3 日間乾燥させた。3 日後鋳型を抜き取り、PDMS チップを作製した。PDMS チップを 35mmdish に入れたものを PDMS チップとし、微細加工機によって径 15mm の貫通させた 35mmdish に PDMS チップを混合溶液で貼り付けさせ、PDMS チップのマイクロウェル底面が露出させた培養デバイスを PDMS-O₂ チップとした。

5.2.2.3. 溶存酸素濃度測定

基板材質の違いによる酸素透過性を評価するために各チップにおける酸素移動加速度 (K_{La}) を求めた。0.25%wt/w 亜硫酸溶液 4mL を各チップに添加し、Firesting 酸素モニター (BAS, アメリカ) を用いて酸素濃度を測定した (Fig. 5.3)。各チップへの溶存酸素濃度はマイクロウェル上面に酸素センサーを置き、飽和酸素濃度に達するまで測定を行った。

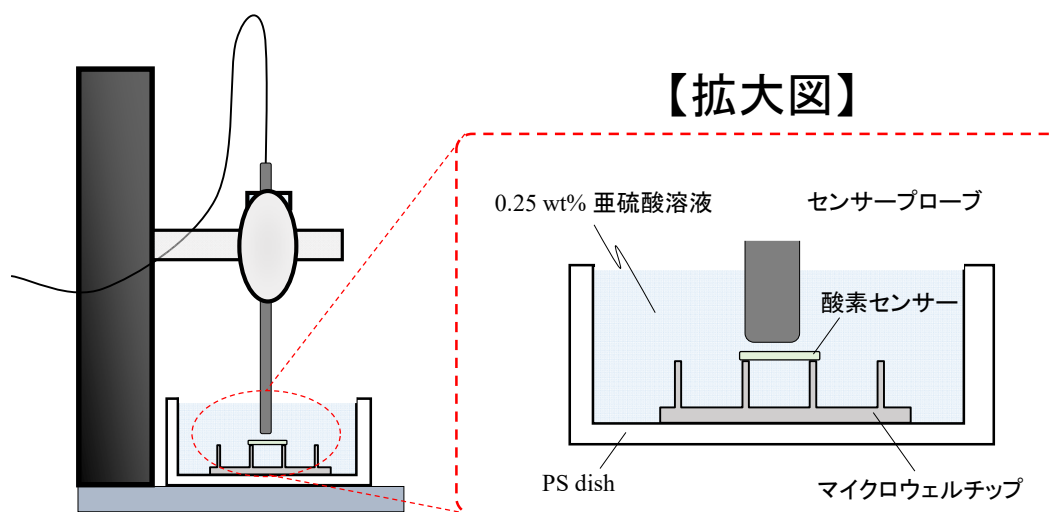


Fig. 5.3. マイクロウェルチップへの酸素供給の概念

5.2.2.3. マウス iPS 細胞(Nanog-GFP)の培養

培養 3 日目におけるマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17, 理研) を 1×PBS で 2 回洗浄後トリプシン溶液 (Gibco) 500 μL を添加して剥がし細胞懸濁液を調整後、前日プレインキュしていたマイクロウェルチップ内に播種した。マイクロウェル部分に PDMS で作製した枠の部分に細胞懸濁液を添加し 2~3 時間後、マイクロウェル内に細胞が沈殿している

ことを確認してチップ全体が培地に浸すように培地を追加し、さらにガラス板を用いて3日間マイクロウェルチップを培養ディッシュごと傾け自発的にスフェロイドを形成させた。培養3日後ガラス板を取り除きさらに静置状態で4日間培養を行った。同じくHD法においても培養3日目におけるマウスiPS細胞を20 μ Lの培養培地に同様の細胞密度(1000cells/drop)でスフェロイドを形成し7日間培養した。

5.2.2.4. スフェロイド増殖能

また培養経過に伴うスフェロイドサイズの変化を評価するため、培養1、3、5、7日目における各チップにおける位相差顕微鏡写真からそれぞれ30個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト(Win ROOF Ver 5.02; Mitani Corp., Japan)を利用してスフェロイドの粒径を測定した。スフェロイドの直径は、スフェロイドの面積から等価円直径(equivalent circle diameter; ECD)法により算出した。

また細胞数測定に関しては本研究室で改良を行ったDNA-DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole)蛍光測定法を利用して、各培養日数における細胞数を測定した。TEN buffer(50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5)に100 μ g/mL proteinase K(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)を添加してDNA抽出液を調製した。DNA抽出液で細胞を37 $^{\circ}$ Cで24時間以上インキュベートして溶解させ、DNAを抽出した。TEN bufferに1 μ g/mLのDAPI(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)を添加したDAPI溶液と抽出したDNA溶液を100 μ Lずつ96ウェルプレート内で混合し、蛍光プレートリーダー(Fluoroskan Ascent Thermo Labssystem; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)で測定した(Ex. 355 nm / Em. 460 nm)。サスペンションから抽出したDNA溶液を用いて検量線を作成し、検量線を用いて測定した吸光度からスフェロイドあたりの細胞数を算出した。

5.2.2.5. LOX-1染色

培養3、7日目のスフェロイド内部の酸素状態を評価するために低酸素プローブ(Lox-1, SCIVAX Life Sciences, Japan)で染色した。染色液はDMEM培地に4.9mLにLox-1染色液を100 μ L添加し、最終濃度を20 μ g/mLとした。培地交換の際に染色液に変更し、24時間前培養を行った。前培養後蛍光顕微鏡(Biorevo BZ-9000; Keyence)を用いて解析を行った。

5.2.2.6. Nanog-GFP 蛍光画像

培養経過に伴うスフェロイド内部の未分化状態を評価するために、培養 3、7 日目のスフェロイド内部の Nanog-GFP を蛍光顕微鏡 (Bioevo BZ-9000; Keyence, Japan) を用いて評価された。

5.2.2.7. フローサイトメトリー解析

培養経過に伴う未分化状態の変化を評価するために、培養 3、7 日目のスフェロイドを回収し Acumax 溶液 (Innovative Cell Technologies, Inc. アメリカ) で分散させた後、フローサイトメトリー (CytoFLEX S; Beckman Coulter, Inc, 日本) を用いて Nanog-GFP 陽性細胞数の測定を行った。

5.2.2.8. 遺伝子解析

Total RNA は各条件の培養細胞を spin column (NucleoSpin RNAII; Nippon Genetics Co. Ltd.)を用いて説明書どおりに抽出した。cDNA は a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)を用いて説明書どおりに 20 μ g/mL の濃度で調製した。各サンプルはリアルタイム RT-PCR によって測定するまで -20°C で保管した。PCR 解析においては StepOne Real-time PCR 装置を用いて cDNA と TaqMan Gene Expression Assay Kits (Applied Biosystems) と反応させ、解析した。各遺伝子の発現比は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH (Taqman プローブ、Mm99999915_g1) をハウスキーピング遺伝子として解析プロトコールの一つである $\Delta\Delta$ CT 法を用いて解析を行った。解析した遺伝子としては特異的分化マーカー遺伝子 ; 肝分化マーカー遺伝子であるトランスサイレチン ; TTR (Taqman プローブ、Mm00443267_m1) および α フェトプロテイン ; AFP (Taqman プローブ、Mm00431715_m1)、心筋分化マーカー遺伝子である NK2 転写因子 ; Nkx2.5 (Taqman プローブ、Mm00657783_m1) および α ミオシン重鎖 ; α MHC (Taqman プローブ、Mm00440354_m1)、血管分化マーカー遺伝子である胎児肝臓キナーゼ 1 ; Flk1 (Taqman プローブ、Mm01222419_m1) および血小板成長因子受容体 β ; PDGFR β (Taqman プローブ、Mm00435546_m1)、低酸素応答遺伝子であるグルコーストランスポーター (Glut1, Taqman プローブ ; Mm00441480_m1) および乳酸脱水素酵素 (LDH1, Taqman プローブ Mm01612132_g1)、分泌糖タンパクである Wnt5a (Taqman プローブ、Mm00437347_m1)、プロテインキナーゼ ; AKT1 (Taqman プローブ、Mm01331626_m1)、肝細胞転写因子である核内受容体 ; Foxa2 (Taqman プローブ、

Mm01976556_s1) である。各遺伝子発現比については播種前に調製したマウス iPS 細胞の発現比を 1 とし発現比の変化を比較した。

5.2.2.9. 統計処理

データは平均±標準偏差で示し、各データは 3 点の比較を行っている。統計処理に関しては一元分散分析を行った。また P < 0.05 の値は統計的に有意であると考ええる。

5.2.3. 実験結果および考察

5.2.3.1. 基板材質の違いにおける酸素供給能の違い

本研究では PDMS 膜の酸素透過性ではなく、作成した各チップ全体における酸素溶存速度を評価するために測定した酸素濃度変化 (Fig 5.4-A) を以下の式を利用して換算し、Fig 5.4-B 示した各グラフの勾配 (傾きの絶対値) より $K_L a$ を算出した[7]。

$$\frac{dC}{dt} = K_L \cdot a (C^* - C)$$

$K_L \cdot a$ 総括酸素移動容量係数 [h⁻¹]

初期条件 t=0, C=C₀ のもとで積分

$$\ln \frac{(C^* - C)}{(C^* - C_0)} = K_L \cdot a \cdot t$$

C* : 飽和溶存酸素濃度 [ppm]
C : 溶存酸素濃度 [ppm]
C₀ : 初期酸素濃度 [ppm]
t : 時間 [s]

酸素濃度の変化速度は PDMS-O₂ チップ、PDMS チップ、PMMA チップの順に増加した (Fig 5.4-A)。つまり培養系への酸素供給能は基板材質の違いによって制御することができることを示した。PDMS 基板は PMMA 基板のような従来の培養基板に比べ酸素透過性に優れており、また PDMS-O₂ チップのように気-液界面以外に気-固界面を介した酸素供給を行うことでスフェロイド周辺の酸素環境が改善されたことが考えられる。Kamoya らは PDMS 底面が気相に露出している培養系においては酸素非透過性基板に比べ溶存酸素濃度がおおよそ 2 倍程度まで向上することを報告している[8]。ここで算出した $K_L a$ を比較すると PDMS-O₂ チップは PMMA チップおよび PDMS チップに比べ 20~30 倍以上の値を示した (Table.3)。つまり、固-気界面を介した酸素供給によってスフェロイド周辺の酸素環境を

十分に制御することが期待できる。

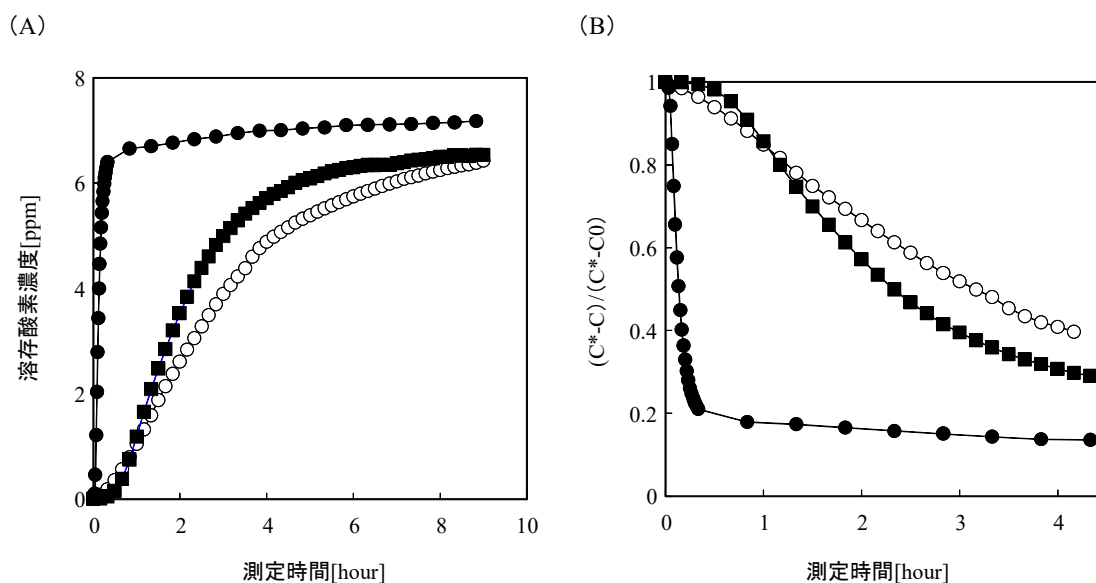


Fig 5.4. 各チップ条件における酸素供給能。(A) 測定時間に伴う酸素濃度変化のグラフ、(B) 積分式を用いた酸素濃度変化のグラフ (■ ; PMMA チップ、○ ; PDMS チップ、●PDMS-O₂チップ)。

Table.3.各チップにおける K_{La} 値

PMMAチップ	PDMSチップ	PDMS-O ₂ チップ
0.37±0.14	0.15±0.01	3.94±0.71

5.2.3.2. スフェロイド形態と増殖能

各培養系において播種された iPS 細胞はすぐに集合・凝集化をはじめ、培養 1 日目以内にスフェロイドを形成し、その後、培養経過に伴ってスフェロイドサイズは増加した (Fig 5.5-A)。ハンギング・ドロップ培養では培養 3 日目までは球状形態を維持していたものの培養経過に伴い、その内部で空洞様構造の形成しいびつな構造を有するスフェロイドへと発達した。また PMMA チップおよび PDMS チップでは各ウェル内で一つのスフェロイドを形成し、培養期間を通して球状構造を維持した。一方で PDMS-O₂チップにおいても各ウェル内に一つのスフェロイドを形成したものの、PMMA チップおよび PDMS チップとは異なり HD 法と同様に内部に空洞様構造の形成がみられ、またマイクロウェル径と同等のサイズにまで増殖した。

培養経過に伴うスフェロイド増殖能を比較した。形成されたスフェロイドサイズを比較すると、培養 1 日目での PMMA チップ、PDMS チップ、PDMS-O₂チップ、HD 法ではそれぞれ 120~140μm 程度のスフェロイドを形成し、培養経過に伴いスフェロイドサイズは

増加していった。しかし培養 3 日目までは同程度のサイズを維持していったものの培養 5 日目以降では PMMA チップおよび PDMS チップでは細胞増殖能が抑制し、逆に PDMS-O₂ チップおよび HD 法では高い増殖能を示した。培養 7 日目のスフェロイドサイズを比較すると、それぞれの条件で 290、330 μm、450 μm、550 μm となった (Fig 5.5-B)。

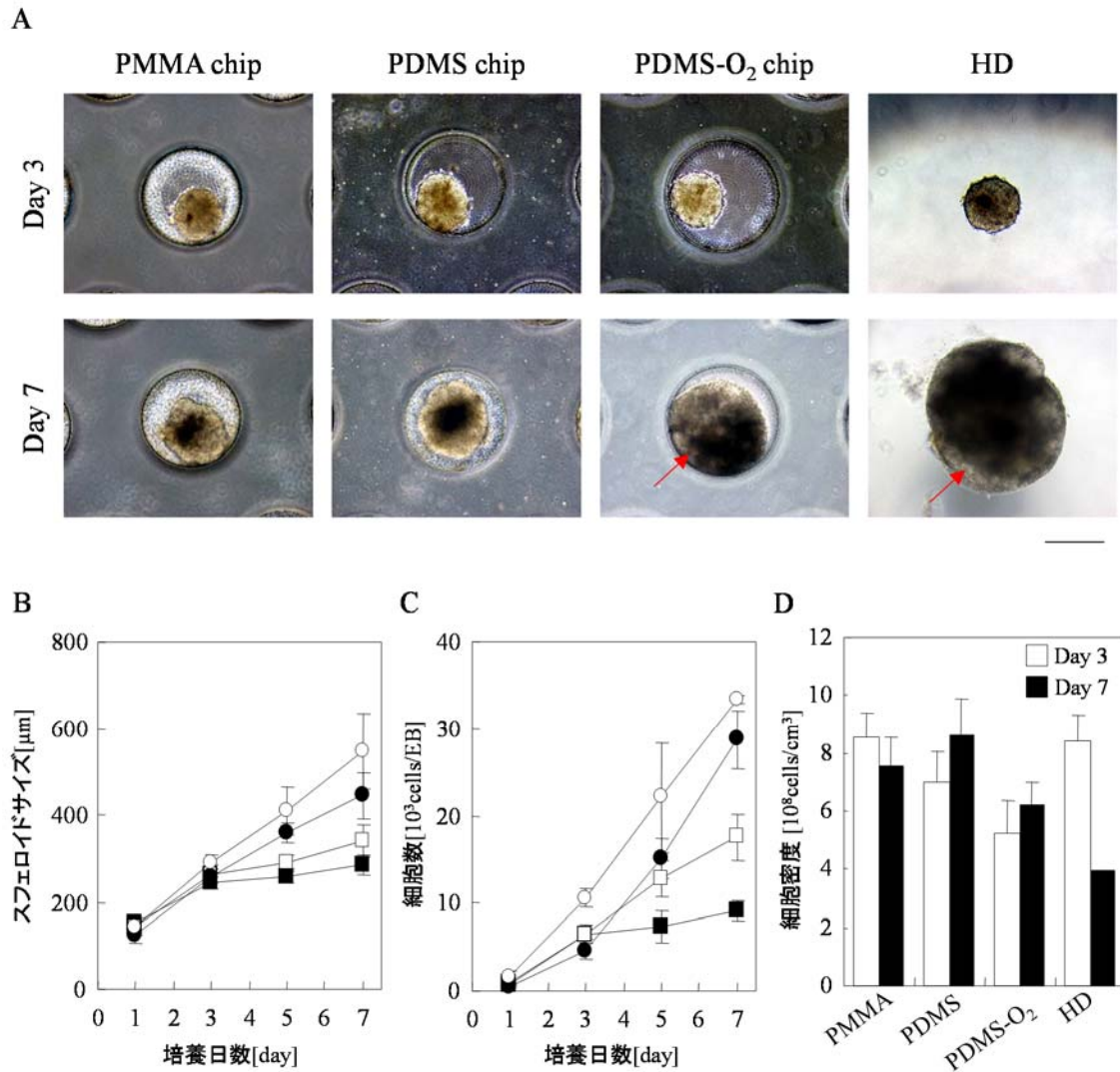


Fig 5.5. 培養経過に伴うスフェロイド増殖能。(A) 培養経過に伴うスフェロイド形態変化、赤矢印；yolk-sac 構造、スケール；500 μm。(B) スフェロイドサイズ、(C) スフェロイド当たりの細胞数、(D) スフェロイド当たりの細胞密度。(○、HD 法、■；PMMA チップ、□；PDMS チップ、●PDMS-O₂ チップ)。

次にスフェロイド当たりの細胞数を比較すると、PMMA チップではスフェロイド粒径と同様に培養 3 日目に細胞増殖能が抑制される傾向を示した。ほかの 3 条件では PMMA チップとは異なり培養 7 日間細胞増殖が起こり、また増殖能は粒径サイズと同様に HD 法、PDMS-O₂ チップ、PDMS チップの順であった (Fig 5.5-C)。ここで粒径サイズとスフェロイド当たりの細胞数よりスフェロイド当たりの細胞密度を算出したところ、HD 法は培養 1

日目に約 10×10^8 [cells/cm³] と最も高く、一方で 3 種類のマイクロウェルチップで形成されたスフェロイドはどの条件においても培養 1 日目には 5×10^8 [cells/cm³] であった。HD 法は培養経過に伴い細胞密度は低下していき、培養 7 日目にはおよそ 4×10^8 [cells/cm³] とおよそ 1/3 近くまで減少した。PMMA チップと PDMS チップでは培養経過に伴い細胞密度は増加していき、培養 7 日目ではそれぞれ 7.5×10^8 [cells/cm³]、 8.5×10^8 [cells/cm³] にまで増加した。しかし PDMS-O₂ チップでは培養 7 日目には 6×10^8 [cells/cm³] までしか増加せず、ほかの 2 つのチップ条件に比べ細胞密度は低かった (Fig 5.5-D)。

この現象はスフェロイド研究においても同様のことが報告されており、たとえば Anada らは気-固界面を介した酸素供給によって HepG2 スフェロイド増殖能が向上することを報告されている[9]。細胞は酸素を取り込むと電子伝達系および酸化的リン酸化に利用して、増殖シグナル伝達の活性や ATP 産生能を制御することで細胞増殖/生存を維持している。つまり培養基板の酸素透過性によるスフェロイド周辺の酸素環境と細胞増殖能は相関関係があり、スフェロイド周辺の酸素濃度が飽和酸素濃度を維持している PDMS-O₂ チップでは高い増殖能を示すことが考えられる。

5.2.3.3. スフェロイド周辺の酸素環境

培養基板材質の違いが細胞周辺の酸素環境に与える影響の解析を評価するために、培養 3、7 日目におけるスフェロイド内部の酸素状態の解析を行い、さらには培養 7 日目における低酸素応答遺伝子である Glut1 および LDH1 の遺伝子発現を解析した。まずスフェロイド内部の酸素化状態を把握するために、低酸素プローブ (Lox-1) 染色が行った (Fig.5.6-A)。培養 3 日目においてどの培養条件においても低酸素状態はみられなかったが、培養 7 日目ではすべての条件で低酸素状態が形成されたものの、特に PMMA チップ培養では顕著な低酸素状態が観察された。次に培養 7 日目における低酸素応答遺伝子の発現においてもこれまでと同様の傾向を示し HD 法に比べマイクロウェルチップ培養で高い発現を示した。またチップ間においても PMMA チップ、PDMS チップ、PDMS-O₂ チップの順に高い発現比を示した (Fig.5.6-B)。

一般的にスフェロイドのような血管様構造を持たない球状組織体では内部への酸素供給は物質拡散に依存するため中心部の細胞は低酸素環境の形成とともにネクロシスが生じる。しかし PDMS-O₂ チップ、HD 法のようにスフェロイド周辺が飽和酸素環境に近ければ内部まで十分に酸素供給することが可能となる。さらに HD 法は個々にスフェロイドが存在する培養系に対してマイクロウェルチップのように多数のスフェロイドが隣接する培養系では培地に溶解した酸素や栄養素などの様々な供給物質を共有するために培養系全体の酸素環境は低下しやすくこの効果が低酸素応答遺伝子発現を左右する要因と考えられる。

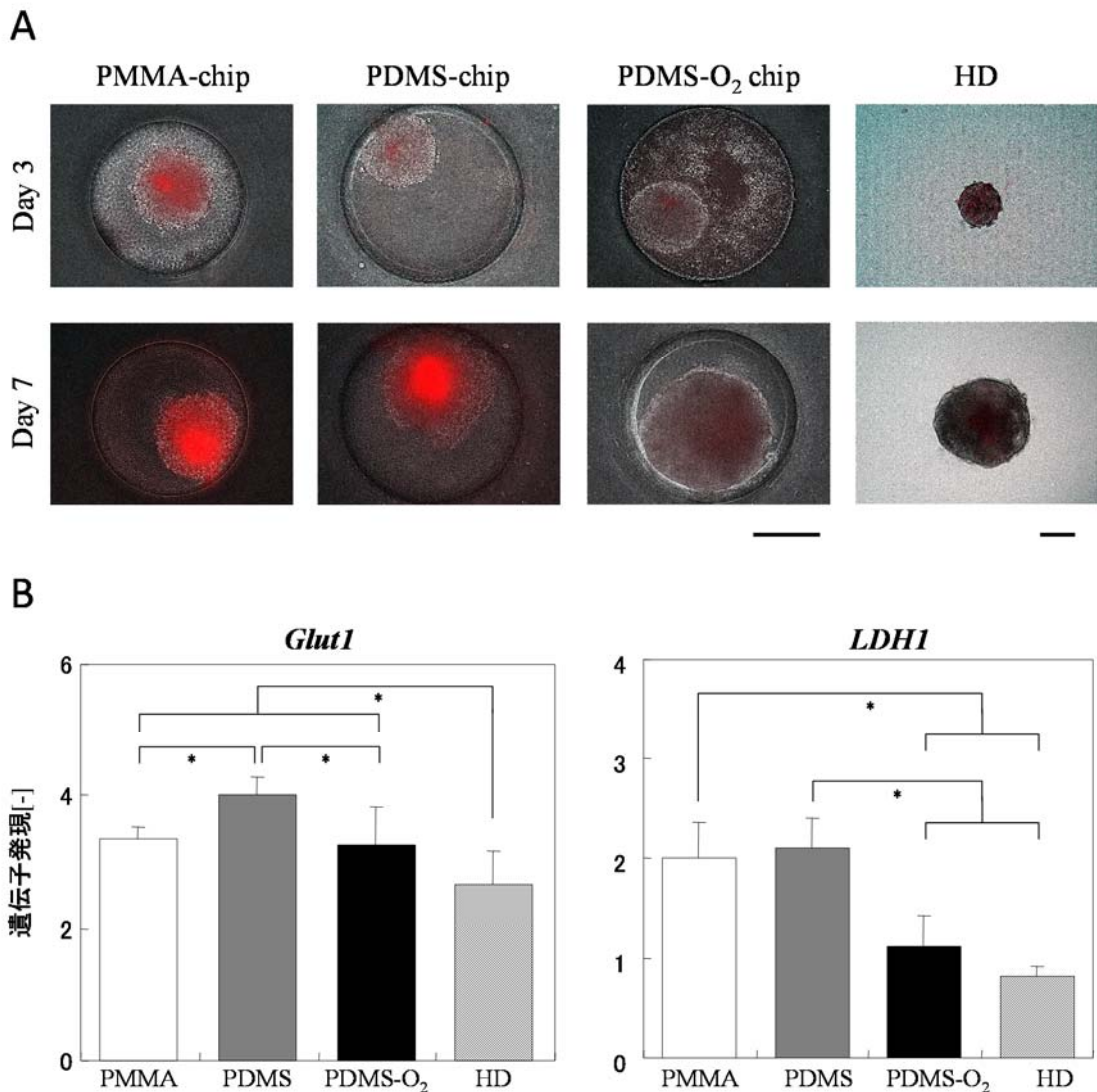


Fig 5.6. スフェロイド周辺の酸素環境評価。(A) 培養 3、7 日目における *Lox-1* 染色画像。スケール ; 500 μ m、(B) 培養 7 日目におけるマウス iPS スフェロイドの低酸素マーカー遺伝子発現。* $P < 0.05$ 。

5.2.3.4. スフェロイドにおける未分化状態の解析

培養経過に伴うスフェロイドの分化状態を評価するために、培養 3、7 日目における *Nanog-GFP* 発現を評価した。*Nanog-GFP* の発現は、スフェロイドの周辺で消失したが、*Nanog-GFP* ドメインは、培養 3 日目のすべての条件において、スフェロイドの中心にわずかに出現した。しかし、培養 7 日目の *Nanog-GFP* の発現は、すべての条件において、スフェロイドの内部の一部を除いて、スフェロイド上でほぼ消失した (Fig 5.7-A)。さらに、培養 3 日目における *Nanog-GFP* 陽性細胞の割合は、すべての条件において最初に調製した iPS 細胞と同じレベルであった (Fig 5.7-B)。しかし、培養 7 日目では培養 3 日目より

陽性細胞数は減少し、特に PMMA チップを除く 3 条件で Nanog-GFP 陽性細胞の 10%以下まで減少した (Fig 5.7-C)。

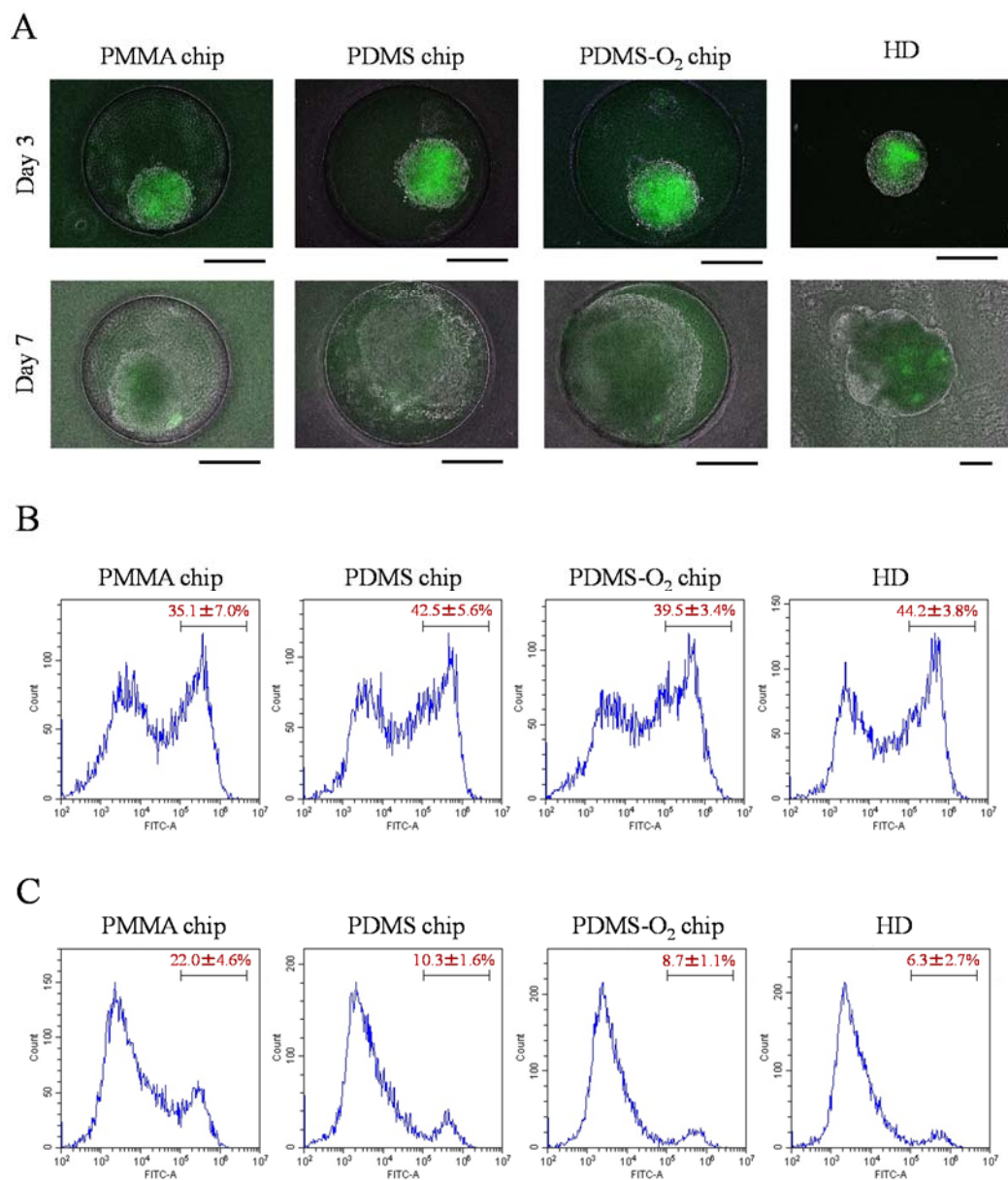


Fig 5.7. 培養経過に伴うスフェロイド未分化状態の変化。(A) 培養 3、7 日目における Nanog-GFP 陽性画像。スケール; 500 μ m、(B) 各条件下における培養 3 日目における未分化細胞陽性率、(C) 培養 7 日目における未分化細胞陽性率。

この現象は幹細胞増殖能が関連していることが考えられる。マウス iPS 細胞は非対称分裂することで分化細胞が形成され、またスフェロイドのような球状組織体では外周部に存在する細胞は M0/M1 期状態であるため高い増殖能を有している[10]。つまり細胞増殖が盛んに行われる周辺部の細胞より分化現象が開始されていき、中心部に存在する細胞は周辺部に比べて分化速度が低いことが考えられる。加えて各酸素環境の違いによる細胞増殖能

には違いに応じてあるものの、幹細胞分化速度はどの条件においても大きな違いは見られない。マウス iPS 細胞は未分化維持因子である LIF が存在していないと未分化状態を維持することができず、またスフェロイド形成は iPS 細胞分化のトリガーとして作用する[11]。つまり LIF 未添加でのスフェロイド培養では細胞増殖能に関係なく非対称分裂が優先的に発生していき、どの培養条件においても細胞分化が促進されることが考えられる。

5.2.3.5. 分化特性の評価

培養基板材質の違いが iPS 細胞の分化特性に与える効果を明らかにするために、培養 7 日目における特異的分化マーカー遺伝子の評価を行った (Fig 5.8)。

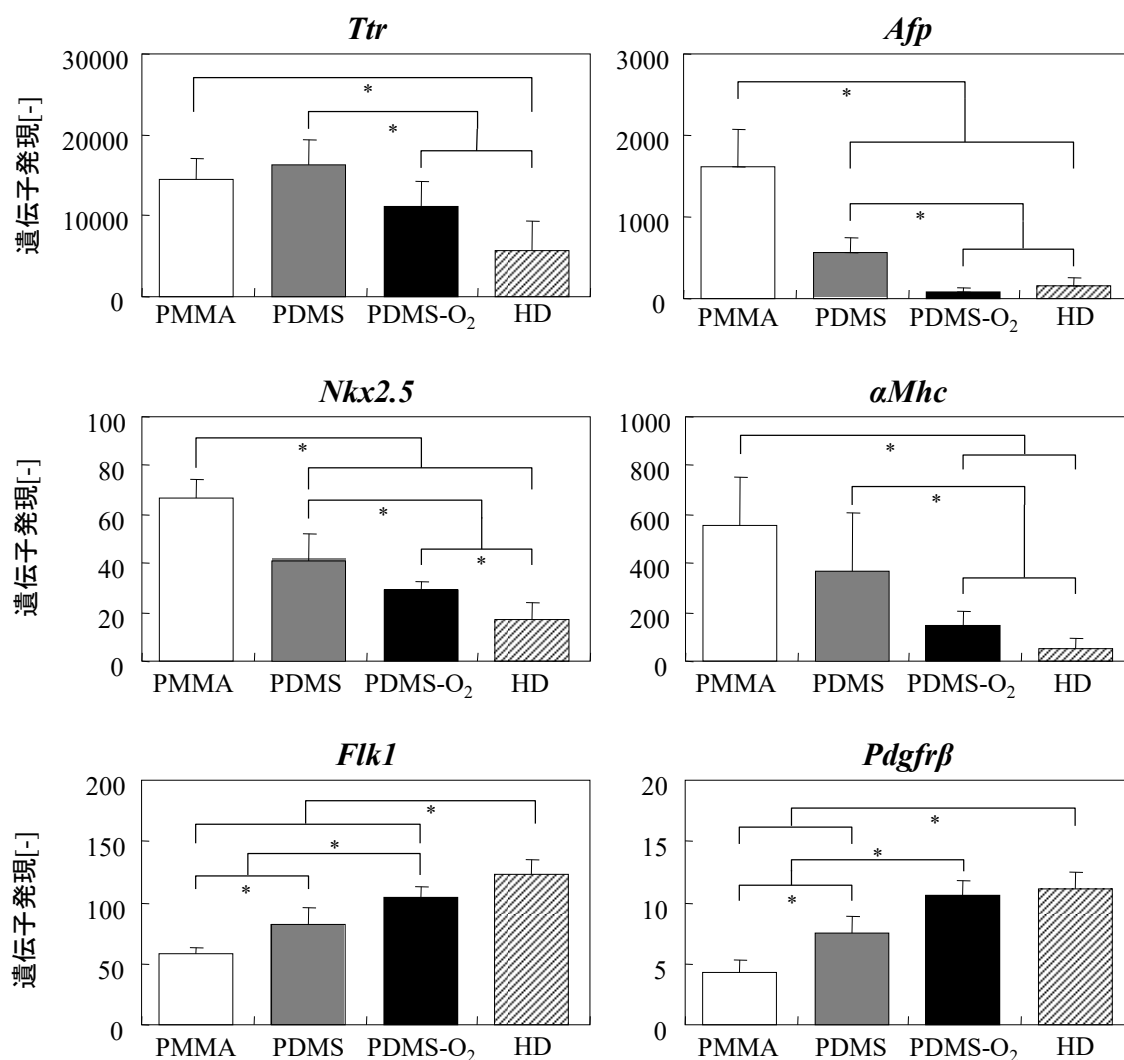


Fig 5.8. 培養 7 日目におけるマウス iPS スフェロイド分化特性。*P<0.05。

まず肝細胞分化マーカー遺伝子の発現を比較すると、HD 法に比べマイクロウェルチップ培養のほうが高い発現を示した。さらにチップ間では PMMA チップと PDMS チップにおいて高い発現を示した。次に心筋細胞分化マーカー遺伝子の発現では肝細胞分化マーカー遺伝子と同様の傾向を示した。一方で血管細胞分化マーカー遺伝子の発現においてはこれまでの傾向とは逆でマイクロウェルチップ培養に比べ HD 法において高い発現を示し、またチップ間においても PDMS-O₂ チップ、PDMS チップ、PMMA チップの順であった。PDMS チップ、PMMA チップの順であった。

肝細胞分化と低酸素環境の関係性に関してはこれまでに多く報告され、また筆者らは肝細胞分化および心筋細胞分化は低酸素環境の形成によって促進されることを以前の研究で報告している[12]。一方で血管細胞分化に関してはスフェロイド周辺の酸素環境が飽和状態を維持されることで促進され、実際に血管細胞分化過程に生じる *Yolk-Sac* 構造を形成している。発生過程において中胚葉系細胞である *Flk1* 陽性細胞は血管細胞（内皮細胞および壁細胞など）と血球細胞に分化する前駆細胞であり、また胚性幹細胞から血球系細胞への分化誘導には正常酸素環境の形成が重要であることが以前の研究によって報告されている[13]。つまり正常酸素環境の形成は血球系細胞分化と同様に血管細胞分化も促すことが考えられる。したがってこの現象はスフェロイド周辺の酸素環境と血管細胞分化には密接な関係性があることを裏付けられる。

5.2.3.6. 分化メカニズムの解明

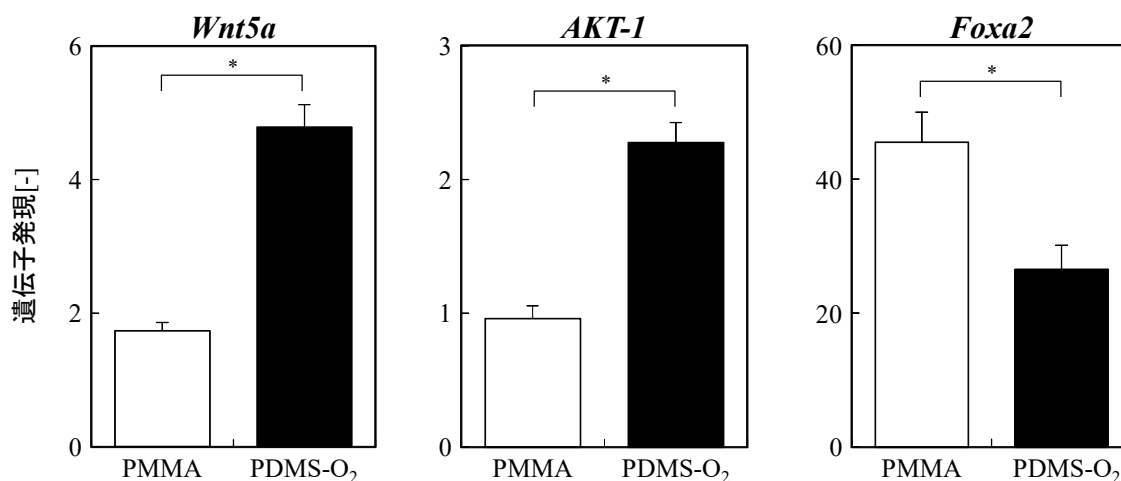


Fig 5.9. 培養 7 日目におけるシグナルマーカー遺伝子発現。*P<0.05。

培養基板材質の違いによる iPS 細胞の分化特性のメカニズムを明らかにするために、培養 7 日目における特異的シグナルマーカー遺伝子の評価を行った (Fig 5.9)。また今回の評価では PMMA チップおよび PDMS-O₂ チップに焦点を当てている。

PMMA チップでは *Foxa2* の発現が向上するが *Wnt5a* および *AKT-1* の発現は抑制された。一方で PDMS-O₂ チップにおいては *Foxa2* の発現は抑制され、*Wnt5a* および *AKT-1* の発現が向上された。3.3 節でも述べたように *Wnt5a* および *AKT1* は血管系細胞分化を促進させ、肝細胞分化を抑制させる作用が働く。これまでのマイクロウェルチップ培養では低酸素環境の形成によって肝細胞分化を促進させていたが、気-固界面を介した酸素供給によってスフェロイド近傍の酸素環境が正常酸素状態になったことで *Wnt5a/AKT* シグナルが活性化されたことが考えられる (Fig 5.10)。したがって、スフェロイド近傍の酸素濃度勾配と *Wnt5a-AKT* シグナルの関係性を明らかとなった。

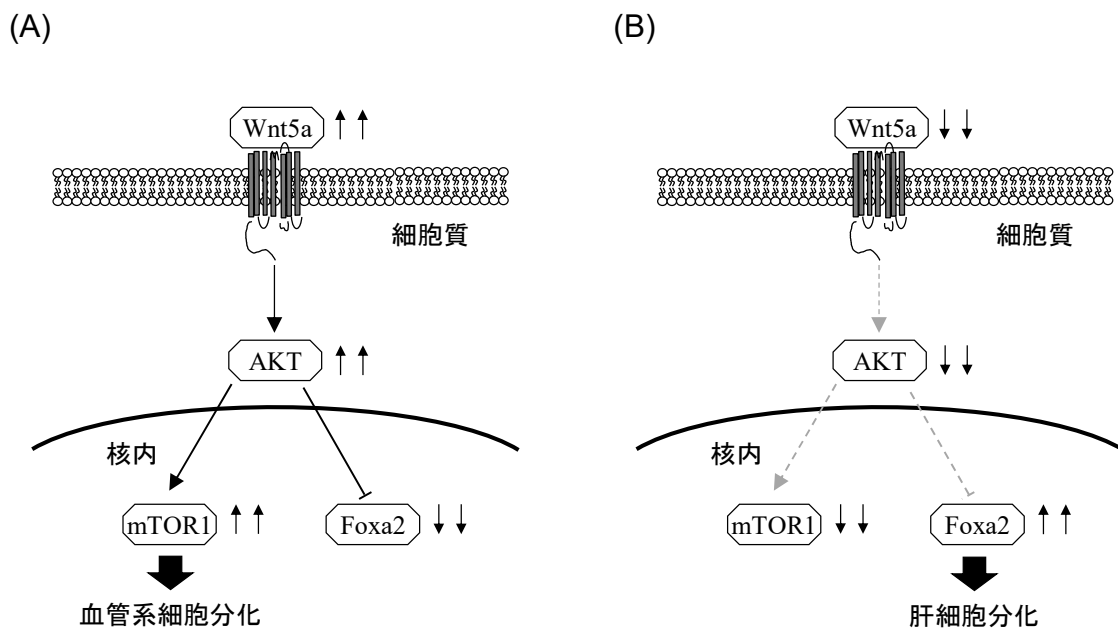


Fig. 5.10. 幹細胞分化特性に Wnt/AKT シグナル活性。(A) PDMS-O₂ チップ培養による血管分化経路活性、(B) PMMA チップ培養による肝細胞分化経路活性。

5.2.4. 本節のまとめ

微細加工技術と基板材質を利用して、マイクロウェルチップへの酸素透過性を制御した PDMS チップによってマウス iPS 細胞分化特性と酸素環境の関係性の解明に成功した。これまでの PMMA チップと PDMS チップ培養では酸素透過性の違いによってマウス iPS 細胞特性に違いが生じた。これらの酸素透過性の効果による違いによって以下の結果を得た。

- (1) 従来基板材料である PMMA と比較して PDMS で作製したチップでは増殖能が向上し、さらに気相からダイレクトに酸素を透過せさせることで増殖能が向上した。
- (2) スフェロイドを形成するマウス iPS 細胞は外周部より分化が発生し、マイクロウェルチップで形成したスフェロイドは培養 7 日目ではほとんどの細胞が Nanog 陰性を示した。
- (3) 酸素非透過性基板である PMMA チップでは 2-2 節と同様に肝細胞分化を促進させたのに対して、基板材質を PMMA から PDMS に変更することで肝細胞分化を抑制し逆に HD 法と同様に血管系細胞分化が促進した。
- (4) 酸素透過性材料を利用した気-固界面を介した酸素供給によって分化スイッチング現象を引き起こす Wnt5a/AKT シグナルを促進した。

以上の結果より、マウス iPS スフェロイドにおける酸素供給の変化によって幹細胞分化特性に違いが生じ、スフェロイド間ニッチの影響因子の本質は培養系内で生じる酸素濃度勾配の変化であることを実証した。次節では、培養系内のスフェロイド数の違いによって形成される微小酸素環境（スフェロイドの酸素消費量の違い）における幹細胞分化特性における遺伝子発現解析を行い、マウス iPS スフェロイドにおける酸素応答現象の特徴を明確にする。

5.3. スフェロイド数依存的な幹細胞分化特性の変化

5.3.1. 本節の目的

培養系内の酸素濃度を制御する因子としては外部からの酸素供給量あるいは細胞の酸素消費によって制御される。培養系内に多数のスフェロイドが存在する浮遊旋回培養法やマイクロウェルチップ培養法では多数のスフェロイドで一定量の培地を共有しており、培養系内の細胞数が増加するにつれて周辺の酸素濃度の低下が懸念される。

そこで本研究では、マイクロウェルチップ内のスフェロイド数が異なる 3 条件のチップを作製し、培養系内に存在するスフェロイド数に依存した細胞代謝活性の違いが iPS 細胞分化特性に与える影響について評価した。また酸素環境の違いを形成させるために酸素透過性材料である PDMS を用いて液相および気相から酸素供給させる条件と液相のみから供給させる 2 条件下におけるマウス iPS 細胞の基礎代謝活性の変化を比較した。これらの検討を通して、培養系内のスフェロイド数の違いがマウス iPS 細胞特性に与える影響を解明した。

5.3.2. 実験方法

5.3.2.1. マイクロウェルチップ設計条件および培養条件

PDMS 基板 (24×24mm 角) に様々な数 (101, 310, 515well/Chip) を有するマイクロウェルチップを作製した。マイクロウェル構造はウェル径およびウェル深さ 500 μm とし、ウェル間距離を 550 μm としている。チップの作製は Fig 5.2 と同様に、35mm 径ペトリディッシュ (Falcon, アメリカ) に入れた条件 (PDMS チップ) と、微細加工機によって径 15mm の貫通させたペトリディッシュに PDMS チップを混合溶液で貼り付けさせ PDMS チップのマイクロウェル底面が露出させた条件 (PDMS-O₂ チップ) をそれぞれ作製した。

作製したチップに培養 3 日目におけるマウス iPS 細胞を各細胞密度 (Table 4) に調整し、3.2 節と同様の操作で 7 日幹培養を行った。

Table4. マイクロウェルチップ設計条件

チップ条件	表記方法	チップあたりのウェル数	播種細胞数
PDMSチップ	EB-100	101well/Chip	1.01 × 10 ⁵ cells/chip
	EB-300	310well/Chip	3.10 × 10 ⁵ cells/chip
	EB-500	515well/Chip	5.15 × 10 ⁵ cells/chip
PDMS-O ₂ チップ	EB-100	101well/Chip	1.01 × 10 ⁵ cells/chip
	EB-300	310well/Chip	3.10 × 10 ⁵ cells/chip
	EB-500	515well/Chip	5.15 × 10 ⁵ cells/chip

5.3.2.2. スフェロイド増殖能

また培養経過に伴うスフェロイドサイズの変化を評価するため、培養 1、3、5、7 日目における各チップにおける位相差顕微鏡写真からそれぞれ 30 個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト (Win ROOF Ver 5.02; Mitani Corp., Japan) を利用してスフェロイドの粒径を測定した。スフェロイドの直径は、スフェロイドの面積から等価円直径 (equivalent circle diameter; ECD) 法により算出した。

また細胞数測定に関しては本研究室で改良を行った DNA-DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 蛍光測定法を利用して、各培養日数における細胞数を測定した。TEN buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5) に 100 $\mu\text{g/mL}$ proteinase K (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加して DNA 抽出液を調製した。DNA

抽出液で細胞を 37° C で 24 時間以上インキュベートして溶解させ、DNA を抽出した。TEN buffer に 1 μ g/mL の DAPI (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) を添加した DAPI 溶液と抽出した DNA 溶液を 100 μ L ずつ 96 ウェルプレート内で混合し、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent Thermo Labssystem; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) で測定した (Ex. 355 nm / Em. 460 nm)。サスペンションから抽出した DNA 溶液を用いて検量線を作成し、検量線を用いて測定した吸光度からスフェロイドあたりの細胞数を算出した。

5.3.2.3. LOX-1 染色

培養 7 日目のスフェロイド内部の酸素状態を評価するために低酸素プローブ (Lox-1, SCIVAX Life Sciences, Japan) で染色した。染色液は DMEM 培地に 4.9mL に Lox-1 染色液を 100 μ L 添加し、最終濃度を 20 μ g/mL とした。培地交換の際に染色液に変更し、24 時間前培養を行った。前培養後蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000; Keyence) を用いて解析を行った。

5.3.2.4. 嫌氣的代謝活性

グルコース消費量および乳酸生成量は幹細胞の基礎代謝活性を評価するために測定した。培養 7 日目のグルコース消費量および乳酸生成量の解析には Glucose test Wako (Wako) と F-キット L-乳酸 (Roche/R-Biopharm 社、ドイツ)を用いた。

5.3.2.5. Nanog-GFP 蛍光画像

培養経過に伴うスフェロイド内部の未分化状態を評価するために、培養 3、7 日目のスフェロイド内部の Nanog-GFP を蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000; Keyence, Japan) を用いて評価された。

5.3.2.6. フローサイトメトリー解析

培養経過に伴う未分化状態の変化を評価するために、培養 7 日目のスフェロイドを回収し Acumax 溶液 (Innovative Cell Technologies, Inc. アメリカ) で分散させた後、フローサイ

トメトリー (CytoFLEX S; Beckman Coulter, Inc, 日本) を用いて Nanog-GFP 陽性細胞数の測定を行った。

5.3.2.7. 遺伝子解析

Total RNA は各条件の培養細胞を spin column (NucleoSpin RNAII; Nippon Genetics Co. Ltd.) を用いて説明書どおりに抽出した。cDNA は a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) を用いて説明書どおりに 20 μ g/mL の濃度で調製した。各サンプルはリアルタイム RT-PCR によって測定するまで -20°C で保管した。PCR 解析においては StepOne Real-time PCR 装置を用いて cDNA と TaqMan Gene Expression Assay Kits (Applied Biosystems) と反応させ、解析した。各遺伝子の発現比は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH (Taqman プローブ、Mm99999915_g1) をハウスキーピング遺伝子として解析プロトコールの一つである $\Delta\Delta$ CT 法を用いて解析を行った。解析した遺伝子としては特異的分化マーカー遺伝子 ; 肝分化マーカー遺伝子である核内受容体 ; HNF4 α (Taqman プローブ、Mm01247712_m1) および α フェトプロテイン ; AFP (Taqman プローブ、Mm00431715_m1)、心筋分化マーカー遺伝子である NK2 転写因子 ; Nkx2.5 (Taqman プローブ、Mm00657783_m1) および α ミオシン重鎖 ; α MHC (Taqman プローブ、Mm00440354_m1)、血管分化マーカー遺伝子である胎児肝臓キナーゼ 1 ; Flk1 (Taqman プローブ、Mm01222419_m1) および血小板成長因子受容体 β ; PDGFR β (Taqman プローブ、Mm00435546_m1) である。各遺伝子発現比については播種前に調製したマウス iPS 細胞の発現比を 1 とし発現比の変化を比較した。

5.3.2.8. 統計処理

データは平均±標準偏差で示し、各データは 3 点の比較を行っている。統計処理に関しては一元分散分析を行った。また $P < 0.05$ の値は統計的に有意であるとする。

5.3.3. 実験結果および考察

5.3.3.1. スフェロイド形態と増殖能

両培養系において播種された iPS 細胞はすぐに集合・凝集化をはじめ、培養 1 日以内に

スフェロイドを形成し、その後、培養経過に伴ってスフェロイドサイズは増加した (Fig 5.11)。PDMS チップでは各ウェル内で一つのスフェロイドを形成し、培養期間を通して球状構造を維持した。これに対し、PDMS-O₂チップでは培養 7 日目頃から多くのスフェロイドがウェルサイズと同等の細胞増殖能がみられ、特に EB 100 および EB 300 の条件では内部に空洞様構造を有するスフェロイドへと発達した。

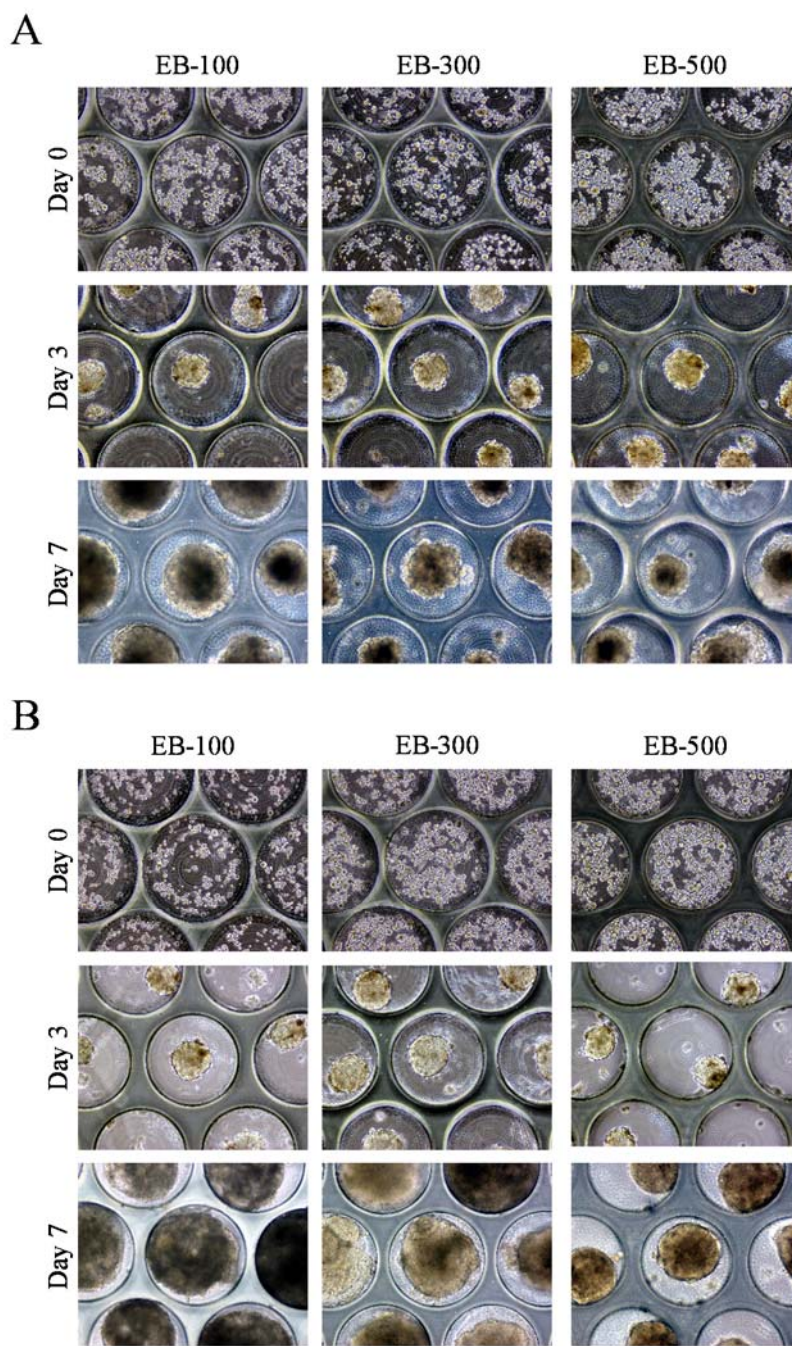


Fig 5.11. 培養経過に伴う各培養条件でのスフェロイド形態変化、(A) PDMS チップ、(B) PDMS-O₂ チップ。スケール ; 500 μ m。

PDMS チップでは培養 1 日目におよそ $120\mu\text{m}$ 程度のスフェロイドを形成し培養 3 日目まではすべての条件で同等のサイズを示したが、培養 5 日目以降は EB 500 の条件において細胞増殖能の低下が確認され、培養 7 日目におけるスフェロイドサイズは EB 100 条件では $330\mu\text{m}$ 、EB 300 条件では $300\mu\text{m}$ 、EB 500 条件では $280\mu\text{m}$ であり、ウェル数の増加に伴い形成されるスフェロイドサイズは減少した (Fig 5.12-A)。スフェロイドあたりの細胞数を測定してみる粒径サイズと同様に EB 100 条件では高い増殖能を示すものの、EB300 および EB500 条件で細胞増殖能が抑制された (Fig 5.12-B)。スフェロイド粒径サイズおよびスフェロイドあたりの細胞数からスフェロイドあたりの細胞密度を算出したところ、培養 1 日目では EB100 条件で最も高い細胞密度を示したものの培養経過が伴うにつれて細胞密度が減少していき培養 7 日目では EB100、EB300、EB500 の順に高い値を示した (Fig 5.12-C)。

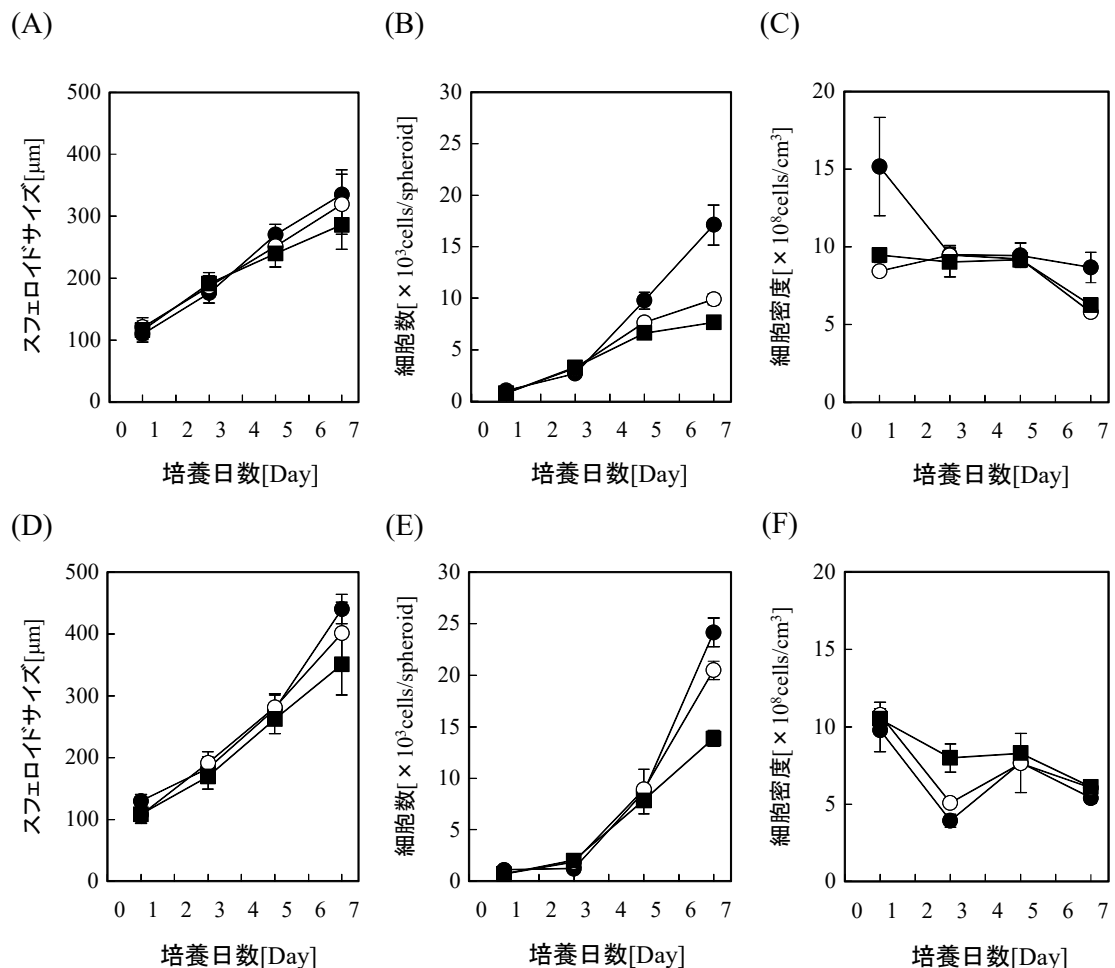


Fig 5.12. 培養経過に伴う PDMS チップ (A-C) および PDMS-O₂ チップ (D-F) におけるスフェロイド増殖能。(A, D) スフェロイドサイズ、(B, E) スフェロイドあたりの細胞数、(C, F) スフェロイド細胞密度。●; EB-100、○; EB-300、■; EB-500。

次に PDMS-O₂チップにおいても同様に培養 1 日目におよそ 120 μ m 程度のスフェロイドを形成し培養 5 日目までウェル数の違いによる影響はなかった。しかし培養 7 日目には PDMS チップと同様にウェル数の違いによる効果によってスフェロイドサイズはそれぞれ EB 100 条件では 440 μ m、EB 300 条件では 400 μ m、EB 500 条件では 350 μ m を示し、さらに PDMS-O₂チップは PDMS チップに比べ高い細胞増殖能を示した (Fig 5.12-D)。

またスフェロイドあたりの細胞数を比較するとスフェロイドサイズと同様の傾向を示し、チップあたりのスフェロイド数に応じて細胞増殖能は低下し、また PDMS-O₂チップは PDMS チップに比べ高い細胞増殖能を示した (Fig 5.12-E)。ここでスフェロイドあたりの細胞数とスフェロイドサイズよりスフェロイド当たりの細胞密度を比較すると、PDMS チップにおいては EB300 および EB500 では培養初期に約 10×10^8 [cells/cm³] を維持したものの培養 7 日目には約半分にまで減少した。また EB100 の条件において培養 1 日目に約 1.5×10^8 [cells/cm³] と高い値を示したものの培養 3 日目には EB300 および EB500 と同様の値まで低下し、培養 7 日目まで細胞密度を維持した。しかし PDMS-O₂チップにおいては培養 1 日目にすべての条件で約 10×10^8 [cells/cm³]を示し EB500 の条件は緩やかに減少していき培養 7 日目には約半分の細胞密度を示した。一方で EB100 および EB300 の条件では培養 3 日目におよそ 1/3 程度まで低下したものの培養 5 日目以降は EB500 と同じレベルの細胞密度を示した (Fig 5.12-F)。

PDMS チップおよび PDMS-O₂チップの両培養系においてチップ内のスフェロイドの数に応じて細胞増殖能に違いが生じた。PDMS チップにおいては 300 スフェロイド以上において細胞増殖抑制効果が働いたのに対して、PDMS-O₂チップにおいては 500 スフェロイド以上になることで細胞増殖抑制が働いた。これらの違いを生じさせた要因として培養系内における酸素供給と細胞の酸素消費の関係性に依存することが考えられる。PDMS チップのような酸素非条件下では iPS 細胞の酸素消費に比べ上面からの酸素供給では十分な酸素濃度を確保することができずに低酸素環境を形成しやすくなる[14]。一方で PDMS-O₂チップのような酸素透過条件下では溶存酸素濃度が 2 倍以上なため十分な酸素を確保することができ、それに伴い酸素非透過条件下で細胞増殖抑制効果が働いた 300 スフェロイド以上においても細胞増殖抑制効果が働かなかったことが推測される。

5.3.3.2. スフェロイド数における基礎代謝活性

スフェロイド内部の酸素化状態を把握するために、低酸素プローブ (Lox-1) 染色が行われた (Fig 5.13)。培養 3 日目において PDMS-O₂チップではどの条件においても低酸素環境を確認できなかった。また PDMS チップではどの条件においても同等のスフェロイドサイズを形成したものの、EB500 条件のみでスフェロイド中心部の一部で低酸素領域が観察

された。また培養 7 日目ではすべての条件において、スフェロイド中心部の低酸素状態が確認された。しかし PDMS-O₂チップと PDMS チップを比較すると、PDMS チップではより強い蛍光強度が確認でき、またチップ内のスフェロイドの数が増加するにつれてより広い低酸素領域が形成されていた。

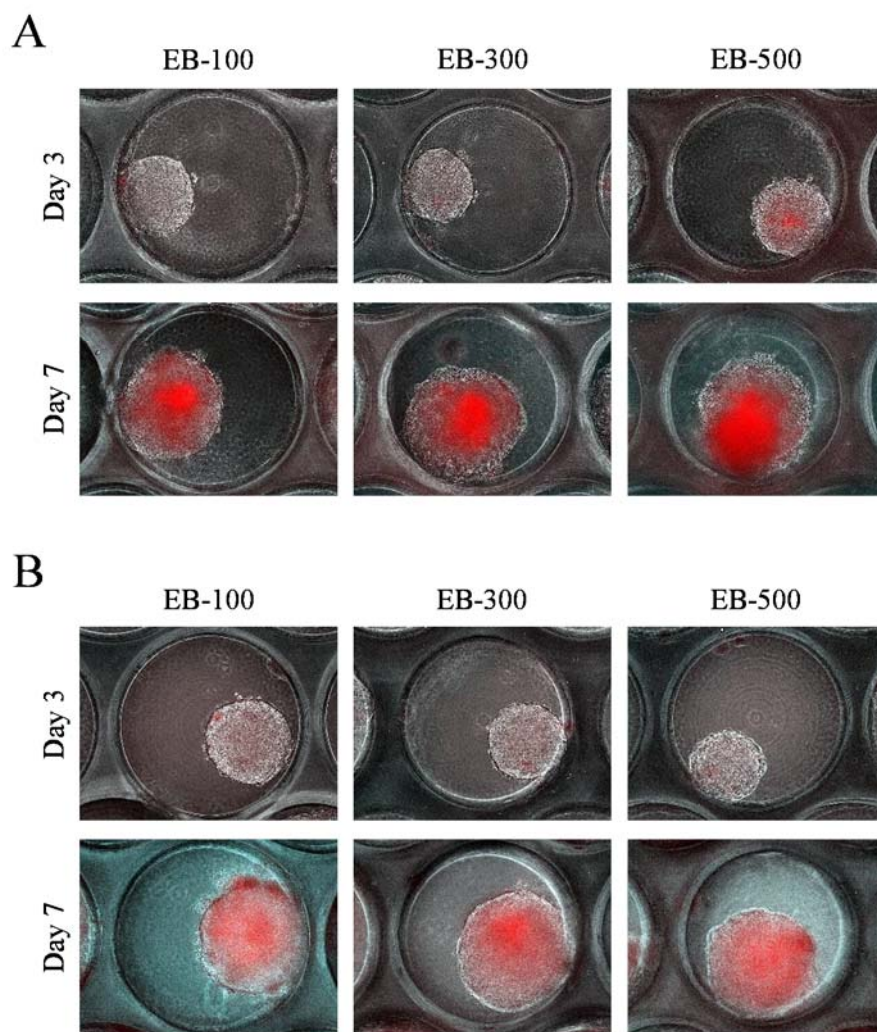


Fig 5.13. 培養経過に伴う各培養条件でのスフェロイド形態変化、(A) PDMS チップ、(B) PDMS-O₂チップ。スケール ; 500 μ m。

さらに低酸素応答性を解析するために培養 7 日目におけるグルコース消費速度および乳酸生成速度の解析を行った。PDMS チップでは EB100 および EB300 は EB500 に比べ高いグルコース消費量を示した。一方で PDMS-O₂チップでは PDMS チップと同様にスフェロイドが増加することにつれてグルコース消費量は低下しているものの、PDMS チップに比べどの条件でも低い値を示した (Fig 5.14-A)。次に乳酸生成量を比較すると、PDMS チップでは逆にスフェロイド数が増加するにつれて増加した。しかし PDMS-O₂チップではグ

グルコース消費量と同様にスフェロイド数の減少と共に乳酸生成能も低下し、またグルコース消費量と同様に乳酸生成量においても PDMS チップに比べどの条件でも低い値を示した (Fig 5.14-B)。ここでグルコース消費量と乳酸生成量よりグルコースあたりの乳酸生成量を比較すると、PDMS チップおよび PDMS-O₂ チップの両条件においてチップ内のスフェロイドが増加するにつれて高い値を示した (Fig 5.14-C)。また培養培地におけるグルコース残量濃度および乳酸蓄積濃度においては酸素透過性における違いはなく、培養系内のスフェロイド数が 300 個を境に有意な違いが生じた (Fig 5.15)。

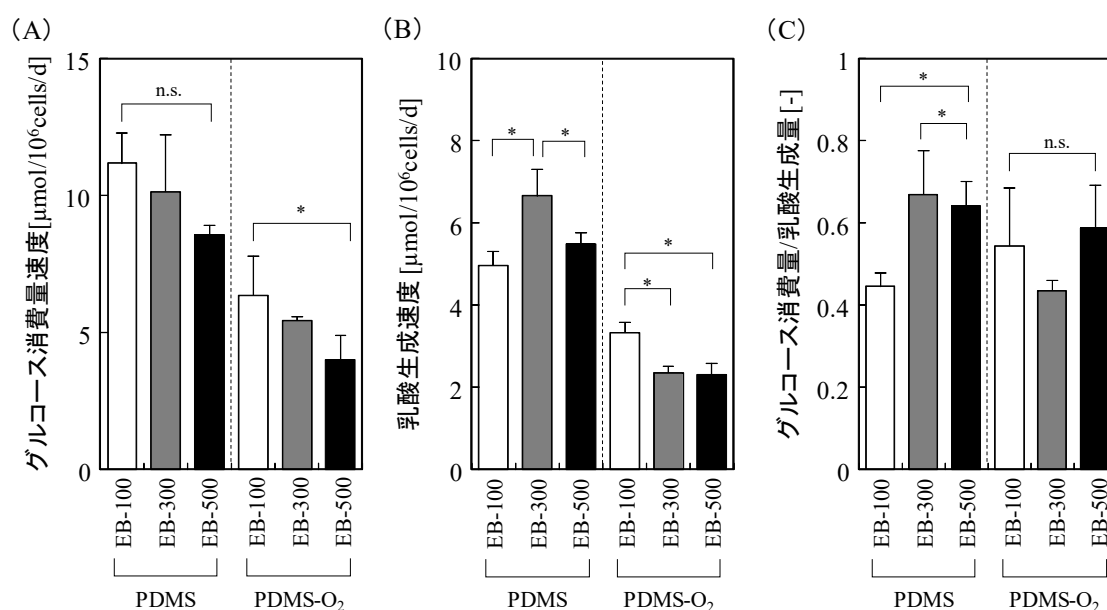


Fig 5.14. 培養経過に伴う各培養条件でのスフェロイド基礎代謝活性、(A) グルコース消費速度、(B) 乳酸生成速度、(C) グルコース消費あたりの乳酸生成量。* $P < 0.05$ 。

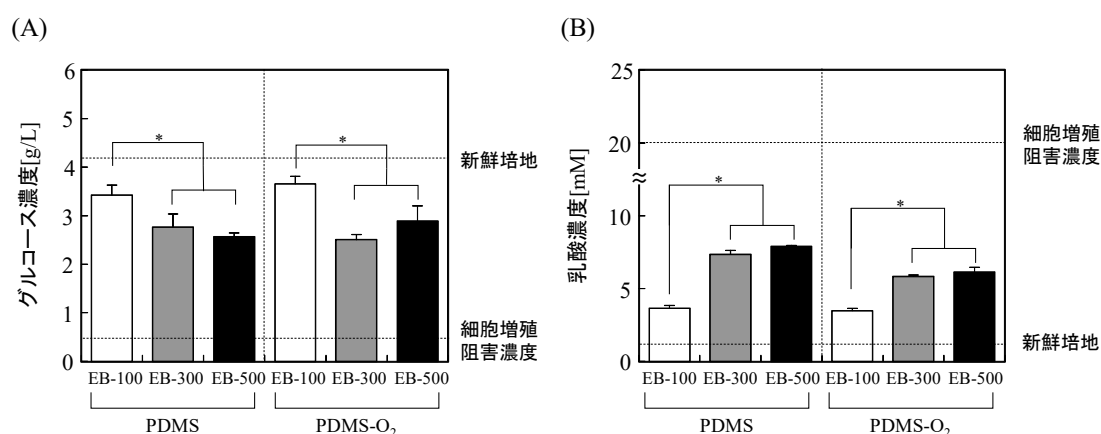


Fig 5.15. 培養 7 日目における増殖阻害をもたらす培地成分濃度^{15,16}、(A) グルコース残量濃度、(B) 乳酸蓄積濃度。* $P < 0.05$ 。

チップ底面の材質が PS 面から PDMS に変わることによってスフェロイド内部の低酸素環境は

緩和されるものの、マイクロウェルチップ内に存在するスフェロイドの数が増加するとどちらの条件においても嫌気低代謝活性は促進された。これは培養系内のスフェロイド数が増加することでスフェロイド 1 個への酸素や栄養素の供給濃度は低下することが考えられる。実際にスフェロイド数が増加することで培養系内のグルコース濃度が低下し、乳酸蓄積量が急激に増大した。つまり *in vitro* 下における iPS 細胞周辺の酸素環境は細胞の酸素消費量によって制御されていることが考えられる。

5.3.3.3. Nanog-GFP 発現の変化

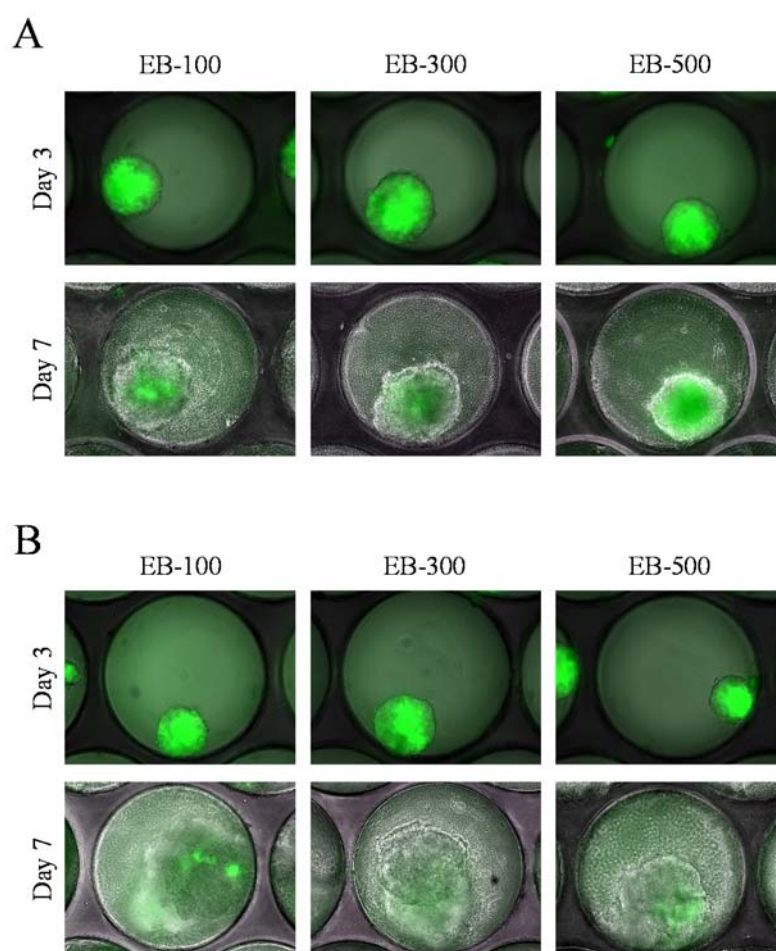


Fig 5.16. 培養 7 日目における iPS スフェロイド内部の Nanog-GFP 発現、(A) PDMS チップ、(B) PDMS-O₂ チップ。スケール：500 μ m。

スフェロイド内部の分化状態を把握するために、Nanog-GFP の発現を評価した。培養 3 日目においてどの条件においても未分化マーカーである Nanog-GFP の発現はスフェロイ

ド外周部に発現が抑制されているものの、スフェロイド中心部では強い発現が確認された。一方で、培養 7 日目では PDMS-O₂ チップではほとんど Nanog-GFP 発現は確認できなかったものの、PDMS チップでは中心部に一部発現が確認され、さらには EB500 条件ではより顕著に発現が確認された (Fig 5.16)。

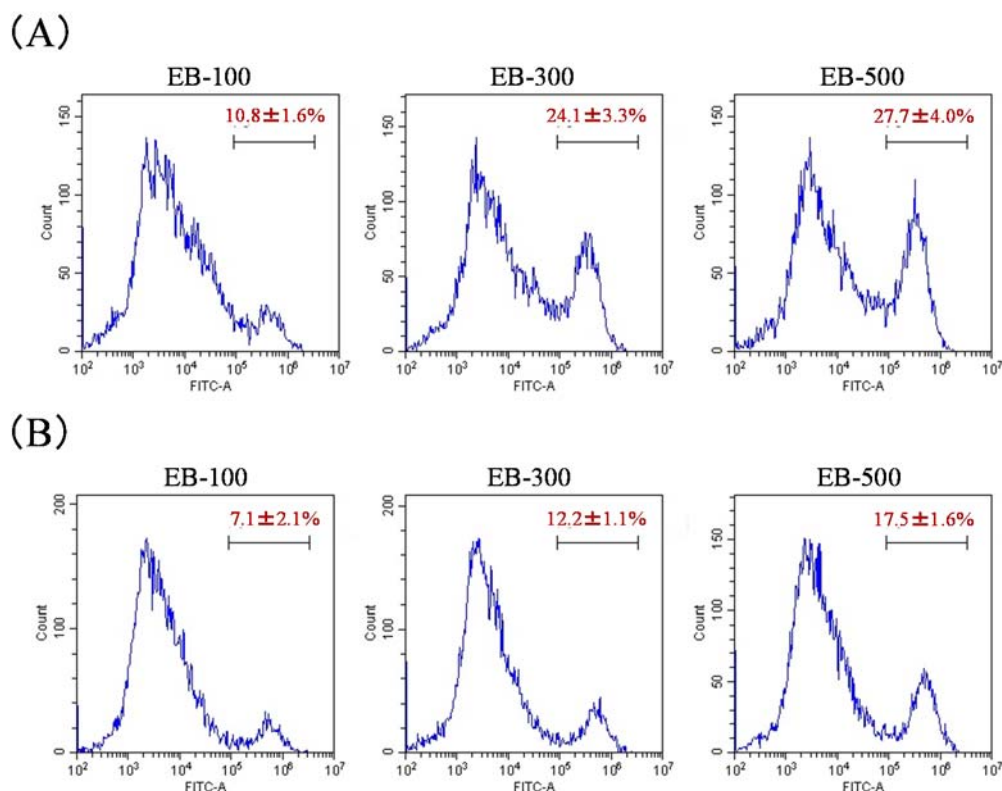


Fig 5.17. 培養 7 日目の Nanog-GFP 陽性細胞率、(A) PDMS チップ、(B) PDMS-O₂ チップ。

そこで培養 7 日目における播種細胞状態を基準とした Nanog-GFP 発現の変化を比較すると、PDMS-O₂ チップではどの条件においても播種時に比べ 20%以下まで低下していた。しかし PDMS チップでは EB100 の条件において PDMS-O₂ チップと同様に 20%以下まで低下していたものの、EB300 および EB500 の条件においては約 30%程度の Nanog-GFP 陽性細胞が確認された (Fig 5.17)。

どの培養条件においても中心部に Nanog-GFP 陽性細胞が確認でき、また陽性細胞率を比較すると細胞増殖抑制効果が働いた PDMS チップの EB-300 と EB-500 においてほかの条件の倍近い値を示し、これらの現象より細胞増殖能抑制効果は幹細胞分化速度と関連があることが考えられる。幹細胞は細胞分裂時に起こる非対称分裂によって未分化細胞と分化細胞を生成することが知られている [17]。つまり細胞増殖能が向上すると分化細胞が生まれやすくなり、逆に細胞増殖抑制効果が強く働いた条件である PDMS チップの EB-300 と EB-500 では高い Nanog-GFP 陽性細胞率を示したと考えられる。

5.3.3.4. 分化マーカー遺伝子

培養系内のスフェロイド数の違いが iPS 細胞の分化特性に与える効果を明らかにするために、培養 7 日目における特異的分化マーカー遺伝子発現の評価を行った (Fig 5.18)。

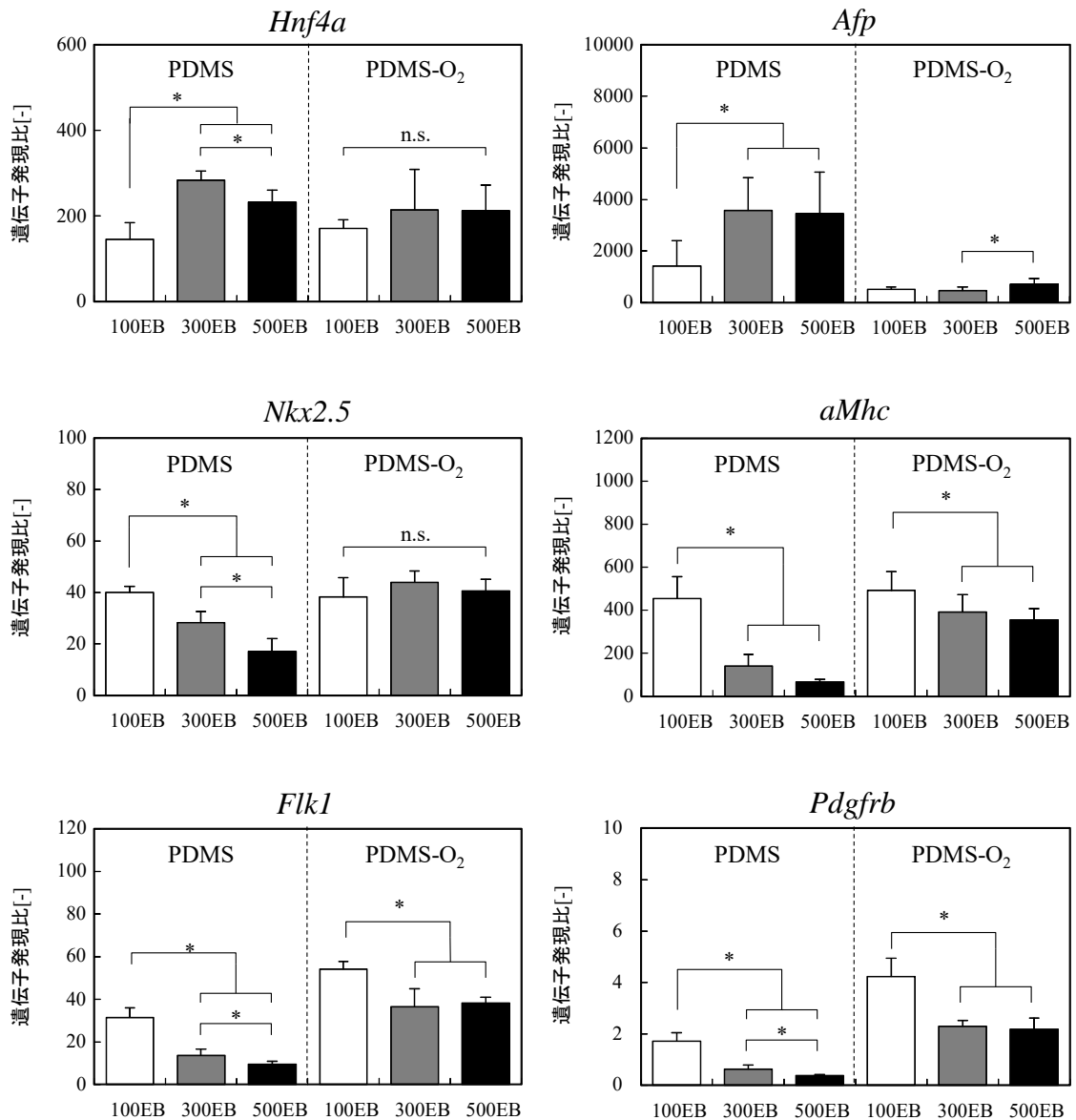


Fig 5.18. 培養 7 日目におけるマウス iPS スフェロイド分化特性。*P<0.05。

心筋細胞分化マーカー遺伝子の発現を比較すると、PDMS チップおよび PDMS-O₂ チップのどちらにおいてもウェルするが増加するにつれて遺伝子発現の低下を示した。次に血管形成細胞分化マーカー遺伝子においても心筋細胞分化と同様に PDMS チップおよび PDMS-O₂ チップともにウェルするが増加するにつれて遺伝子発現の低下を示した。一方で、

肝分化マーカー遺伝子ではこれまでとは逆で PDMS チップおよび PDMS-O₂ チップのどちらにおいてもウェルするが増加するにつれて高い遺伝子発現比を示した。また HD 法に比べてマイクロウェルチップでは高い遺伝子発現を示し、さらにマイクロウェルチップの酸素透過性の違いにおいては酸素透過性の低い PDMS チップは PDMS-O₂ チップに比べ高い発現を示した。

培養系内のスフェロイド数が増加するにつれて肝細胞分化が特異的に向上するのに対して心筋細胞および血管細胞分化に関しては抑制された。肝細胞分化は iPS 細胞が低酸素環境下であると分化促進され、逆に正常酸素下では分化が抑制されることがこれまでに多く報告されている。培養系内の酸素環境は供給量の変化以外に細胞自身が消費することでも変化する。つまり培養系内に存在するスフェロイド数が増加する消費される酸素量は大きくなり、低酸素環境を形成しやすくなることが考えられる。実際に iPS 細胞の分化速度および分化特性は培養系内のスフェロイド数が 100 個の条件と 300 個の条件を境界線に大きな違いが生じている。

この結果より、多数のスフェロイドが隣接する培養系では培養系内の酸素供給量とスフェロイド自身の酸素消費量のバランスによって独自の微小酸素環境を形成し、自発的分化特性を制御していることが示唆された。

5.3.4. 本節のまとめ

マイクロウェルチップ技術を利用して、培養系内のスフェロイド数の違いによって生じる酸素環境の違いがマウス iPS 細胞特性に与える影響を評価した。スフェロイド数の違いは培養系内の酸素濃度変化をもたらし、マウス iPS 細胞特性に影響を与えることを示した。スフェロイド数と酸素環境の関係性については以下の結果を得た。

- (1) スフェロイド増殖能は基板材質および培養系内のスフェロイド数に依存し、スフェロイド数の増加は細胞増殖能の低下を誘導した。
- (2) スフェロイド内部の酸素環境はスフェロイド数に依存してスフェロイド数の増加は内部で低酸素環境を形成するものの、酸素透過性基板においては内部の酸素環境が緩和された。
- (3) スフェロイド代謝活性は培養基板の酸素透過性の違いによって変動し、培養系内のスフェロイド数が増加すると嫌氣的代謝活性が促進された。
- (4) スフェロイド内部の未分化状態はスフェロイド周辺の酸素環境に依存し、また嫌氣的代謝活性が促進される条件では分化速度は低下した。
- (5) スフェロイド分化特性は培養基板および培養系内のスフェロイド数に依存して変化し、低酸素環境を形成する条件では肝細胞分化が促進された。

以上の結果より、培養基板の酸素透過性と培養系内のスフェロイド数によってスフェロイド周辺の酸素環境は変化し、形成された培養環境の違いに応じてマウス iPS 細胞特性を制御できた。このように、培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合は培養材料のみでなく細胞自身で形成する微小酸素環境によって幹細胞特性を自由に制御することが示唆された。

5.4. 本章のまとめ

本章では、スフェロイド近傍の酸素濃度勾配を制御するファクターである培養基板の酸素透過性及び培養系内のスフェロイド数とマウス iPS 細胞特性の関係性について種々の評価を行った。

まず、酸素透過性のことなるマイクロウェルチップを作製し、酸素供給能の向上は細胞増殖、血管系細胞分化を促進させることを示した。また、酸素供給の違いによって Wnt5a/AKT シグナル活性が変化し、それに伴って分化スイッチング現象を誘導することを明らかにした。

次に、培養系内のスフェロイド数は培養系およびスフェロイド内部における酸素環境を制御し、細胞増殖能および分化特性に影響を与えることを示した。さらに、スフェロイド数が 100 個と 300 個を境界線として細胞特性が変動する閾値であることを示唆している。

以上のことより、多数のスフェロイドが隣接する培養系においては酸素供給および細胞の酸素消費のバランスによって自発的に形成される微小酸素濃度勾配が多能性幹細胞分化特性を支配すること明らかにした。

【参考文献】

1. Prado-lopez, S., Conesa, A., Armin˜a˜n, A., Marti˜nez-losa, M., Escobede-lucea, C., Gandia, C., Tarazona, S., Melguizo, D., Blesa, D., Monraner, D., Sanz-gonza˜lez, S., Sepu˜lveda, P., Go˜tz, S., O˜connor, J., Moreno, R., Dopazo, J., Burks, D, J. and Stojkovic, M.: Hypoxia Promotes Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Functional Endothelium. *STEM CELLS*, **28**, 407–418, 2010.
2. Maltepe, E., Krampitz, G, W., Okazaki, K, M., Red-Horse, K., Mak, W., Simon, M, C. and Fishe, S, J.: Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development*, **132**, 3393-3403, 2005.
3. Katsuda, T., Teratani, T., Chowdhury, M. M., Ochiya, T., and Sakai, Y.: Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic progenitor cells. *Biochem. Eng. J.*, **74**, 95-101, 2013.
4. Otsuji, T, G., Bin, J., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J, E., Nishino, T., Hasegawa, K. and Nakatsuji, N.: A 3D Sphere Culture System Containing Functional Polymers for Large-Scale Human Pluripotent Stem Cell Production. *Stem Cell Reports*, **2**, 734-745, 2014.
5. Nakazawa, K., Yoshiura, Y., Koga, H. and Sakai, Y.: Characterization of mouse embryoid bodies cultured on microwell chips with different well sizes. *J. Biosci. Bioeng*, **116**, 628-633, 2013.
6. Nakazawa, K., Izumi, Y., Fukuda, J. and Yasuda, T.: Hepatocyte spheroid culture on a polydimethylsiloxane chip having microcavities. *J. Biomater. Sci. Polym. Edi.*, **17**, 859-873, 2006.
7. 黒澤 尋: 培養細胞への酸素供給、*生物工程*, **91**, 646-653, 2013.
8. Kamoya, T., Anada, T., Shiwaku, Y., Yamamoto-T, T., Suzuki, O.: An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Sensors and Actuators B*, **232**, 75–83, 2016.
9. Anada, T., Fukuda, J., Sai, Y., Suzuki, O.: An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids, *Biomaterials*. **33**, 8430-8441, 2012.
10. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W. and Kunz-Schughart, L, A.: Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, **148**, 3-15, 2010.
11. Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, J, P., Meacham, A, M., Zon, L, I. and Terada, N.: Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro.

FEBS Letters, **497**, 15-19, 2001.

12. **Miyamoto, D. and Nakazawa, K.**: Differentiation of mouse iPS cells is dependent on embryoid body size in microwell chip culture. *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 507-512, 2016.
13. **Hofmann, N, A., Ortner, A., Jacamo, R, O., Reinisch, A., Schallmoser, K., Rohban, R., Etchart, N., Fruehwirth, M., Beham-Schmid, C., Andreeff, M. and Strun, D.**: Oxygen Sensing Mesenchymal Progenitors Promote NeoVasculogenesis in a Humanized Mouse Model *In Vivo*. *PLOS ONE*, **7**, e44468, 2012.
14. **Randall, C, L., Kalinin, Y, V., Jamal, M., Manohar, T. and Gracias, D, H.**: Three-dimensional microwell arrays for cell culture. *Lab Chip*, **11**, 127-131, 2011
15. **Tannock, I. F. and Kopelyan, I.**: Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line, *Cancer Res.*, **46**, 3105-3110, 1986.
16. **Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M.**: Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia, *Appl. Biochem. Biotechnol*, **30**, 29-41, 1991.
17. 丹波仁史：幹細胞研究の生物学、再生医療業書 1 幹細胞、1-15、2013.

第 6 章：結論

6.1. 本論文のまとめ

近年、iPS 細胞を含む多能性幹細胞を再生医療や細胞アッセイ研究、発生/病理研究へ応用させるためには *in vitro* においていかに分化特性の制御かが重要な課題である。多能性幹細胞を含むあらゆる培養細胞は生体類似構造あるいは発生過程である三次元球状組織体（スフェロイド）を模倣することで細胞特性が向上することが知られており、現在では幹細胞スフェロイド培養法が注目されている。しかしスフェロイドは細胞の集合体であるため、スフェロイド内部では酸素や液性因子の濃度、細胞-細胞間相互作用、細胞-細胞外マトリクス間相互作用、力学的作用といった細胞ニッチの影響が考えられるためにサイズの制御が重要であることが多くの研究によって報告されている。さらに近年では、幹細胞スフェロイド研究においてはスフェロイドを取り巻く培養環境（スフェロイドニッチ）を制御することが重要とされ、培地成分や培養装置を利用した人為的に培養環境を整えるアプローチが行われている。

しかし培養系内に多数のスフェロイドが存在する場合、スフェロイド近傍の微小培養環境においては隣接するスフェロイド同士が作用することで独自のスフェロイドニッチを形成することが懸念されているものの、この観点から取り組んだ研究はほとんどない。その要因としては既存のスフェロイド培養では「単一スフェロイドの形成させる培養系」あるいは「不均一なサイズのスフェロイドがランダムに存在する培養系」での研究が中心であるためスフェロイド近傍の微小培養環境を十分に制御出来ないという問題点が挙げられる。

そこで本研究では、幹細胞スフェロイド自身で形成する微小培養環境とその応答性の関係性を評価することを目的とした。本研究では幹細胞スフェロイドをサブミリメートル単位で配列し自発的微小培養環境の作用を独自のスフェロイドパターンニング培養を利用し、各章の取り組んだ研究の位置づけを Fig.6.1 に示した。以下に本研究で得られた結果を示す。

第 1 章では、本研究の背景について述べ、本研究の目的を明らかにした。また、第 2 章では、既往のスフェロイドニッチ制御技術について述べ、本研究の位置づけと達成すべき事項を明らかにした。

第 3 章では、培養法の違いによって生じるスフェロイドニッチは幹細胞分化特性を制御するという発想から、シングル-スフェロイド培養系（単一スフェロイドが独立した培養系）とマルチ-スフェロイド培養系（多数のスフェロイドが隣接した培養系）を用いてマウス iPS

スフェロイド特性を評価したところ、マルチ-スフェロイド培養系では低酸素環境の形成に伴い肝細胞分化が向上し、逆にシングル-スフェロイド培養系では血管系細胞分化を促進させるといった分化スイッチング現象を誘導することを明らかにした。またそのメカニズムとしてはスフェロイドを取り巻く微小酸素環境に依存した「Wnt5a/AKT シグナル伝達経」が作用している可能性が示唆された。

第4章では、スフェロイド間ニッチの発生領域、および酸素環境との関係性を明らかにすることを目的にスフェロイドパターンニングチップを用いてスフェロイド間距離および位置関係性の影響を評価した。マウス ES スフェロイドはスフェロイド間距離が 500 μm 程度になると幹細胞特性に影響を与えることを実証した。また株化細胞である HepG2 スフェロイドの検討においても同様の現象が発生し、その際のスフェロイド近傍の酸素濃度が *in vivo* 下における低酸素環境を再現していることを解明した。

第5章では、第3,4章で得られたスフェロイド近傍の酸素環境の影響に着目し、培養基板の酸素透過性の違い(人為的刺激因子)を利用してスフェロイドを取り巻く酸素環境を変化させ、スフェロイド間ニッチの本質がスフェロイド近傍の酸素環境変化であることを実証することを目的とした。酸素供給能の違いはマウス iPS スフェロイドの分化スイッチング現象を引き起こし、また Wnt5a/AKT シグナルについても酸素環境依存的であることを明らかにした。また培養系内に存在するスフェロイド数が酸素状態を制御するファクターであり、その境界線が 300 個付近であることを実証した。

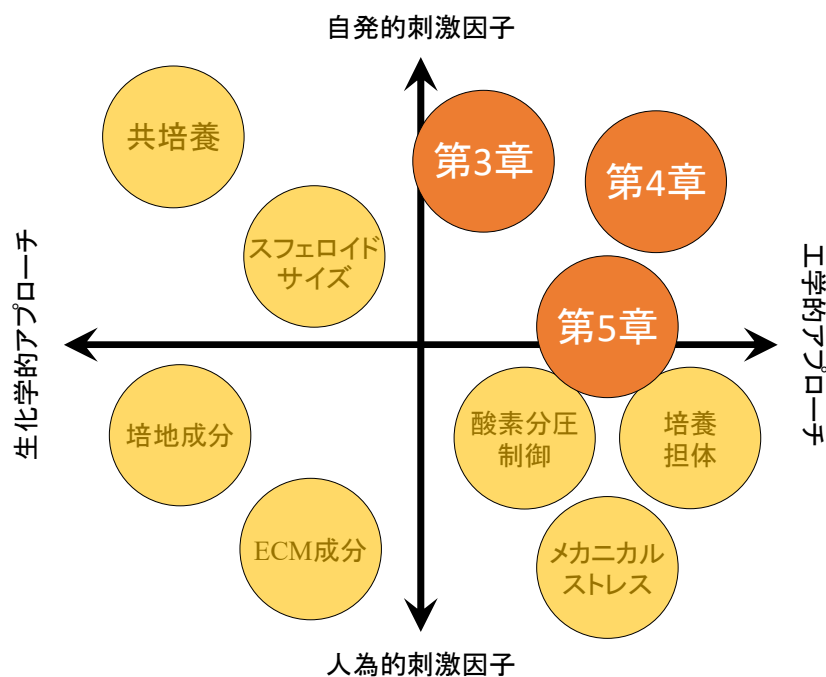


Fig.6.1. 各章で取り組んだ研究の位置づけ。

この現象の解明より、スフェロイド近傍の酸素環境は培養系内のスフェロイド数やスフェロイド間距離といった様々な因子によって形成されており、この微小酸素環境の変化によって幹細胞特性は変化するという関係性を新たに見出した (Fig.6.2)。この現象は分子生物学的あるいは発生生物学的における新たな知見であり、また幹細胞分化プロセス/細胞アッセイ系の開発における新たな技術開発に期待でき、科学的・産業的意義としても大きい。

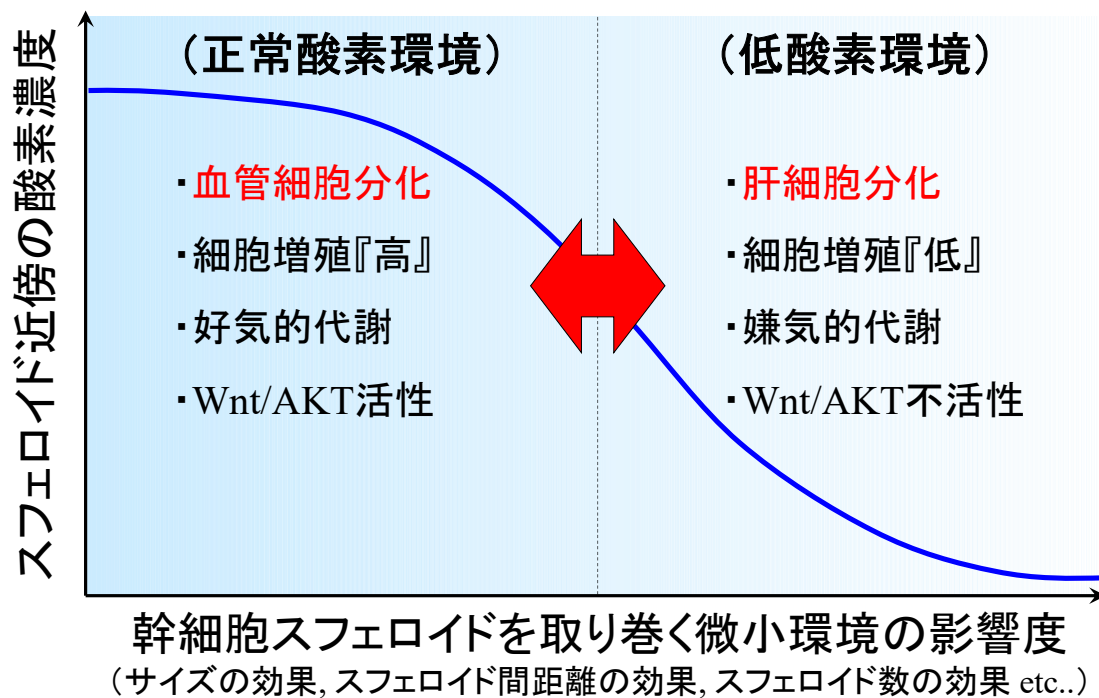


Fig.6.2. 幹細胞スフェロイドにおける酸素応答現象の関係性。

6.2. 今後の展望

本研究で明らかにした「スフェロイド間ニッチにおける分化スイッチング現象」はスフェロイド培養においてこれまでになかった新たな概念であるといえる。またスフェロイド培養は ES/iPS 細胞分化誘導研究以外にも多くの研究で用いられており、この概念はあらゆる細胞培養への応用が期待できる。その発想の基、現在までにこの現象はほかの株化細胞や幹細胞で発生することを確認済みである。

本節では今後の展望として、「1. 細胞培養における最適な酸素環境設計の提案」および「2. 酸素濃度と Wnt/AKT シグナル経路の関係性に関する発展性」に関して簡単に述べる。

1. 細胞培養における最適な酸素環境設計の提案

これまでの iPS 細胞から機能性細胞（肝細胞や心筋細胞、神経細胞など）へ分化誘導させる手法としては「転写因子の遺伝子導入」や「異種細胞との共培養」などといった「生化学的アプローチ」が中心である。一方、本論文ではスフェロイド間で生じる自発的な酸素環境の違いによって様々な分化特性を向上させることを実証した。つまり細胞分化においてはそれぞれ最適な酸素環境が存在しており、適切な酸素環境下の設計が幹細胞分化誘導効率の向上に不可欠であると考えられる。そこで微小酸素濃度と各細胞分化特性の関係性を明らかにすることで、最適な酸素環境を人為的に形成させ、その後様々な分化誘導因子（サイトカインやホルモン、小分子化合物、siRNA など）を順次添加させることで効率的な分化誘導法の開発が期待できる（Fig. 6.3）。

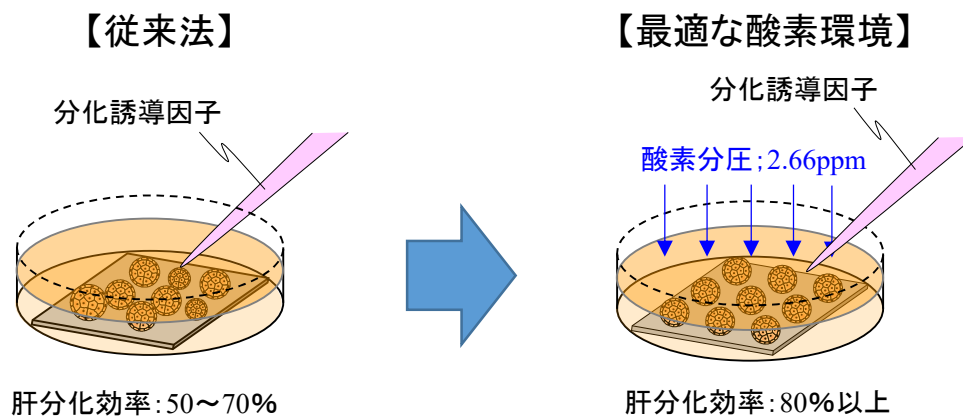


Fig.6.3. 適切な酸素環境下による iPS 細胞から肝細胞分化誘導技術への期待

また周辺の酸素環境の違いによって生じる細胞現象は本論文で明らかにした幹細胞の分化誘導以外にも創薬スクリーニングなどに利用される「肝細胞や膵β細胞などの機能発現」、

組織工学研究などに利用される「血管構成細胞（血管内皮細胞および壁細胞など）の細胞挙動」、抗がん剤開発などに利用される「癌細胞の抗薬剤耐性の獲得機序」、老化やメラニン産生などに寄与する「酸化ストレスの発生」などに関与しており、あらゆる細胞培養分野においては酸素環境設計が重要と考えられる。つまり Fig.6.3 のような最適な酸素環境設計は幹細胞分化誘導技術以外にも細胞アッセイや組織工学研究分野へと応用させることが期待でき、さらにスフェロイド内部および培養系内の酸素濃度勾配についてシミュレーションを用いて解析することで最適な酸素環境設計をより効率的に提案させていくことが期待できる。

2. 酸素濃度と Wnt/AKT シグナル経路の関係性に関する発展性

本論文では ES/iPS スフェロイド近傍の酸素環境に応じた Wnt5a/AKT シグナルの発現が分化スイッチングを引き起こすことを明らかにしてきた。しかし第 1 章でも述べたように再生医療や細胞アッセイ研究では間葉系幹細胞や神経幹細胞、DFAT 細胞などの様々な体性幹細胞を利用したものが多い。一般的に体性幹細胞は脊髄などの低酸素環境下で未分化状態を維持しているものの、細胞周辺の酸素環境の変動によって初期分化のトリガーが誘導されることが知られている。さらに細胞分化現象の定義としては幹細胞分化誘導以外にも実質細胞の表現型（前駆細胞の分化や機能性細胞の機能発現、癌細胞の薬剤耐性、血球細胞の発現パターンなど）の変化が含まれている。つまり本研究で見出した酸素環境の違いによって分化スイッチング現象は幹細胞スフェロイドにとどまらず、前駆細胞や機能性細胞スフェロイド、スフェロイドを形成しない（単一細胞の分散状態）血球系細胞といったあらゆる培養細胞で誘導されるのではないかと考えている（Fig.6.4）。またこの現象が Wnt5a/AKT シグナルによって支配されていることを実証できれば細胞分化現象における普遍的メカニズムが存在するという新たな概念を提唱することが期待できる。

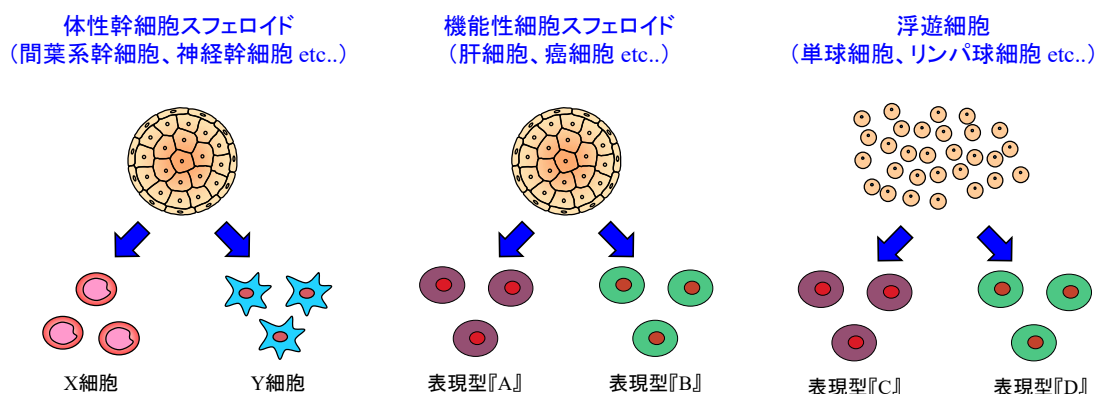


Fig. 6.4. あらゆる細胞分化現象における普遍的な分化スイッチング現象の概念図。

学術論文リスト

本研究成果は、以下の学術論文に掲載された。

【主要論文】

1. Miyamoto, D., and Nakazawa, K.: Differentiation of mouse iPS cells depending on embryoid body size in microwell chip culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 195-199 (2016). (査読有)
2. Miyamoto, D., Ono, K., Hara, T., Koga, H., and Nakazawa, K.: Effect of separation distance on the growth and differentiation of mouse embryoid bodies in micropatterned cultures, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **121**, 105-110 (2016). (査読有)
3. Miyamoto, D., Hara, T., Hyakutake, A., and Nakazawa, K.: Evaluation of HepG2 spheroid-spheroid interactions with the cell patterned culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, in press. (査読有)

【参考論文】

1. R. Yamada, K. Hattori, M. Tagaya, T. Sasaki, D. Miyamoto, K. Nakazawa, S. Sugiura, T. Kanamori, K. Ohnuma, Plasma-Patterned Polydimethylsiloxane Surface With Single-Step Coating with a Mixture of Vitronectin and Albumin Enables the Formation of Small Discs and Spheroids of Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Plasma Medicine* 4, 165-176, 2014. (査読有)
2. 宮本大輔、中澤浩二、スフェロイド培養器 (第 2 編 第 1 章 1 節), 三次元ティッシュエンジニアング細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで一, 株式会社エヌ・ティー・エス, pp.189195, 2015.

謝辞

本研究を行うにあたり、日頃より適切なご指導、ご鞭撻を賜わり、さらに、高い次元と広い視野に立ったものの考え方についてご教示くださいました北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科中澤浩二 教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、副査をして頂きました、北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科 櫻井和朗 教授、同 環境生命工学科 上江洲一也 教授、同 機械システム工学科 吉山定見 教授、同 環境技術研究所 望月慎一 准教授に心から感謝致します。

研究を行うにあたり多大なる助言を頂きました、現長崎大学 医学部 堺裕輔 助教授、ならびに現産業医科大学 医学部 吉浦由貴子 助教授には非常にお世話になりました。また研究室に配属された頃より面倒を見て頂き、研究者のいろはを教えていただいた現熊本高等専門学校 古賀晴香 助教授には非常にお世話になりました。心から感謝致します。

また研究室に配属され、多くのことを先輩方から教わりました。吉野陽文さん、原拓也さん、後藤優希さん、白木原愛さんに心から感謝致します。また、研究室生活で多くの仲間に出会い、大きく支えて頂きました。同期である谷口舞さん、吐合千秋さん、林寛大さん、森京貴志さん、頼りない先輩について来てくれた、大野恭平さん、白水聡之さん、新二日市沙織さん、新口加奈子さん、高橋克洋さん、山内美紀さん、山口健太さん、横山英雄さん、太田裕介さん、北野温女さん、鳴海勇希さん、長谷川千裕さん、北島辰哉さん、石崎唯さん、近藤聖奈さん、郷大輔さん、嘉村一步さん、徳永優斗さん、松元協一郎さん、安永圭祐さんに深く感謝致します。

本研究を行った北九州市立大学 環境技術研究所の研究員の方々、職員の方々には多くの面でお世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

本学部第一学科ならびに第五学科の諸先生方、事務室をはじめ職員の方々には多くの面でお世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、生活面および精神面において全力を挙げて支えてくれた、私の家族に深く感謝します。