



Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface

北島, 裕幸

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-05-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3161

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003161>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface

ゼラチンコート表面上におけるヒト多能性幹細胞のクローナルな増殖

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 丹羽仁史客員教授)

北島 裕幸

発生段階における胚盤胞由来の内部細胞塊から得られる胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) や、体細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 遺伝子等を導入して得られる人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) などの多能性幹細胞は、自己複製能を持ちなおかつ適切な条件下では様々な種類の細胞に分化することが可能であるがゆえに、再生医療への応用が期待されている。そのためこれらの細胞の分子シグナル機構を解明することは、将来の再生医療を実現させる上において重要となってくる。

マウスの ES 細胞においては、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) を添加することにより、フィーダーを使用せず無血清の培養液中で安定的に培養することが可能となっている。しかしヒト多能性幹細胞は、一般的にマウス胎児由来線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) のようなフィーダー細胞上で培養されている。これは、ヒト多能性幹細胞の分子シグナル機構を解明する上において、例えば遺伝子導入後の薬剤選択が困難となる問題や、フィーダー細胞からのシグナルが影響を及ぼす問題の原因となる。この問題を解決するために、しばしば EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) マウス肉腫由来のマトリゲルが MEF の代替として使用されるが、これは複数の細胞外マトリックスの集合体であり、さらにそこに含まれる成長因子等がしばしばロット間の格差を生じさせるため、再現性のある実験結果を得るのが困難であるという問題が残る。

また、これらヒト多能性幹細胞は、マウス ES 細胞と異なり、単一の細胞にまで解離した場合アポトーシスを起こして死滅することが知られている。そのため、これらヒト多能性幹細胞を継代する際には、コラゲナーゼ、ディスパーゼや、コラゲナーゼ及びトリプシン等を成分とする CTK 溶液などを用いることにより、不完全に解離した細胞塊の状態で継代をおこなうのが一般的である。しかし、この点においても遺伝子導入後のクローン純化や手技の煩雑さにおいて問題が残る。

そこで我々はこれらの問題を解決するために、最もシンプルな細胞外マトリックスの一つでありマウス ES 細胞の無フィーダー培養の際に用いられるゼラチンでコートした表面上で、クローナルな状態から安定的に増殖させる培養方法を模索することとした。

目的とするゼラチンコートをした表面上において、通常使用している培養液中でヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を培養しても、細胞は接着できなかった。一方、MEF の培養上清中で培養をおこなうとこれらの細胞はゼラチンコート表面上に接着が可能であった。そこで我々は培養液に様々な可溶性因子を添加し、ヒト多能性幹細胞の接着を促進する因子を探索したところ、培養液中に可溶性のフィブロネクチンを添加することにより、濃度依存的にヒト多能性幹細胞の接着が促進される事を見出した。

さらに、ヒト多能性幹細胞においてアポトーシスの阻害効果が報告されている Rho 結合キナーゼ (Rho-associated coiled-coil-forming kinase; ROCK) 阻害剤の一種の Y-27632 を、培養液中に可溶性フィブロネクチンと共に添加することにより、単一の

細胞に解離した状態においてもゼラチンコート表面上で効率よく増殖した。ヒト多能性幹細胞は、この可溶性フィブロネクチンと ROCK 阻害剤を共添加する培養方法で長期的な継代培養が可能であり、1ヶ月以上継代を繰り返した後においても未分化マーカーである OCT3/4 やアルカリ性ホスファターゼを発現していた。さらにこの培養方法においてヒト多能性幹細胞は、クローナルな播種条件下でも安定的に増殖し多能性幹細胞からなるコロニーを形成した。

次にこの方法で長期継代したヒト iPS 細胞について、多能性を保持しているかの検証をおこなった。in vivo においては、SCID (severe combined immune deficiency) マウスの精巣にヒト iPS 細胞を注入しテラトーマの形成を検証したところ、このヒト iPS 細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉すべてに分化可能であることが確認された。また胚様体を形成させる in vitro の分化においても同様に、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉に分化可能であることが確認された。さらに、この培養方法で継代培養をおこなったヒト iPS 細胞について G バンドによる核型解析をおこなったところ、異常は認められなかった。

以上のように我々は、可溶性フィブロネクチンと ROCK 阻害剤を共添加する新規培養方法を使用すれば、たとえクローナルな播種条件においてもゼラチンコート表面上において安定的にヒト多能性幹細胞を増殖させ得ることを見出した。このようなヒト多能性幹細胞の培養方法は、フィーダー細胞を用いずクローナルな状態においても安定的に増殖可能であるという点において、ヒト多能性幹細胞を用いた遺伝子工学を劇的に簡便化し、それらの分子シグナル機構の解明、ひいては再生医療の実現に大いに役立つであろう。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2100 号	氏 名	北島 裕幸
論文題目 Title of Dissertation	Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface ゼラチンコート表面上におけるヒト多能性幹細胞のクローナルな 増殖		
審査委員 Examiner	主 査 清 野 進 Chief Examiner 副 査 南 康 博 Vice-examiner 副 査 匂 坂 敏 朗 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景と目的】

発生段階における胚盤胞由来の内部細胞塊から得られる胚性幹細胞（ES 細胞）や、体細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 遺伝子等を導入して得られる人工多能性幹細胞（iPS 細胞）などの多能性幹細胞は、自己複製能を持ちなおかつ適切な条件下では様々な種類の細胞に分化することが可能であるがゆえに、再生医療への応用が期待されている。そのためこれらの細胞の分子シグナル機構を解明することは、将来の再生医療を実現させる上において重要となってくる。

マウスの ES 細胞においては、白血病抑制因子（LIF）を添加することにより、フィーダーを使用せず無血清の培養液中で安定的に培養することが可能となっている。しかしヒト多能性幹細胞は、一般的にマウス胎児由来線維芽細胞（MEF）のようなフィーダー細胞上で培養されている。これは、ヒト多能性幹細胞の分子シグナル機構を解明する上において、例えば遺伝子導入後の薬剤選択が困難となる問題や、フィーダー細胞からのシグナルが影響を及ぼす問題の原因となる。この問題を解決するために、しばしば EHS マウス肉腫由来のマトリゲルが MEF の代替として使用されるが、これは複数の細胞外マトリックスの集合体であり、さらにそこに含まれる成長因子等がしばしばロット間の格差を生じさせるため、再現性のある実験結果を得るのが困難であるという問題が残る。

また、これらヒト多能性幹細胞は、マウス ES 細胞と異なり、単一の細胞にまで解離した場合アポトーシスを起こして死滅することが知られている。そのため、これらヒト多能性幹細胞を継代する際には、コラゲナーゼ、ディスパーゼや、コラゲナーゼ及びトリプシン等を成分とする CTK 溶液などを用いることにより、不完全に解離した細胞塊の状態でも継代をおこなうのが一般的である。しかし、この点においても遺伝子導入後のクローン純化や手技の煩雑さにおいて問題が残る。

そこでこれらの問題を解決するために、最もシンプルな細胞外マトリックスの一つでありマウス ES 細胞の無フィーダー培養の際に用いられるゼラチンでコートした表面上で、クローナルな状態から安定的に増殖させる培養方法を模索することとした。

【方法と結果】

(1) 可溶性フィブロネクチンが多能性幹細胞のゼラチンコート表面上への接着を促進する。

目的とするゼラチンコートをした表面上において、通常使用している培養液中でヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を培養しても、細胞は接着できなかった。一方、MEF の培養上清中で培養をおこなうとこれらの細胞はゼラチンコート表面上に接着が可能であった。そこで培養液に様々な可溶性因子を添加し、ヒト多能性幹細胞の接着を促進する因子を探索したところ、培養液中に可溶性のフィブロネクチンを添加することにより、濃度依存的にヒト多能性幹細胞の接着が促進される事を見出した。

(2) 可溶性フィブロネクチンと ROCK 阻害剤の共添加はゼラチンコート表面上におけるヒト多能性幹細胞をクローナルな条件からでも増殖させる。

さらに、ヒト多能性幹細胞においてアポトーシスの阻害効果が報告されている Rho 結合キナーゼ（ROCK）阻害剤の一種の Y-27632 を、培養液中に可溶性フィブロネクチンと共添加することにより、単一の細胞に解離した状態においてもゼラチンコート表面上で効率よく増殖した。さらにこの培養方法においてヒト多能性幹細胞は、クローナルな播種条件下でも安定的に増殖し多能性幹細胞からなるコロニーを形成した。

(3) 新規培養方法で継代培養されたヒト多能性幹細胞は、多能性を維持し、核型も正常である。

この可溶性フィブロネクチンと ROCK 阻害剤を共添加する培養方法において、ヒト多能性幹細胞は長期的な継代培養が可能であり、1ヶ月以上継代を繰り返した後においても未分化マーカーである OCT3/4 やアルカリ性ホスファターゼを発現していた。次にこの方法で長期継代したヒト iPS 細胞について、多能性を保持しているかの検証をおこなった。in vivo においては、マウスの精巣にヒト iPS 細胞を注入しテラトーマの形成を検証したところ、このヒト iPS 細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉すべてに分化可能であることが確認された。また胚様体を形成させる in vitro の分化においても同様に、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉に分化可能であることが確認された。さらに、この培養方法で継代培養をおこなったヒト iPS 細胞について G バンドによる核型解析をおこなったところ、異常は認められなかった。

〔考 察〕

可溶性フィブロネクチンと ROCK 阻害剤を共添加する新規培養方法を使用すれば、たとえクローナルな播種条件においてもゼラチンコート表面上において安定的にヒト多能性幹細胞を増殖させ得ることを見出した。このようなヒト多能性幹細胞の培養方法は、フィーダー細胞を用いずクローナルな状態においても安定的に増殖可能であるという点において、ヒト多能性幹細胞を用いた遺伝子工学を劇的に簡便化し、それらの分子シグナル機構の解明、ひいては再生医療の実現に大いに役立つであろう。

本研究は、可溶性フィブロネクチンと ROCK 阻害剤の添加により、フィーダー細胞を使用せずゼラチンコート表面上で、クローナルな条件からでもヒト多能性幹細胞を培養可能にするものである。これはヒト多能性幹細胞の遺伝子工学や分子シグナルの解明を簡便化する上で重要な知見であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

The candidate, having completed studies on “Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface”, with a specialty in stem cell biology, and having advanced the field of knowledge in the area of experimental application of human pluripotent stem cells, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D. (Medicine).