

研究紹介

間葉系幹細胞を外側から制御・診断するポリマーエンジニアリング

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻
生命環境科学系, JST さきがけ
吉本 敬太郎
(ckeitaro@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)



1. はじめに

1.1 間葉系幹細胞 (MSC)

研究室を主宰する立場となって7年が経過した。博士取得後、理研と筑波大で合成高分子化学と細胞工学(主に肝臓細胞)の研究に携わったことは、自分の研究の幅を広げる大変幸運な経験であったとともに、自身が学生時代に過ごした“分析化学”という分野を見つめなおす良い機会でもあった。その後、現所属先に P.I. として赴任し、学生不在のなか 1 年が過ぎ、2 年目には 2 名の学生が、3 年目には学生に加えて学振 PD がラボメンバとなる幸運などが重なり、徐々に研究室が賑やかになっていった。

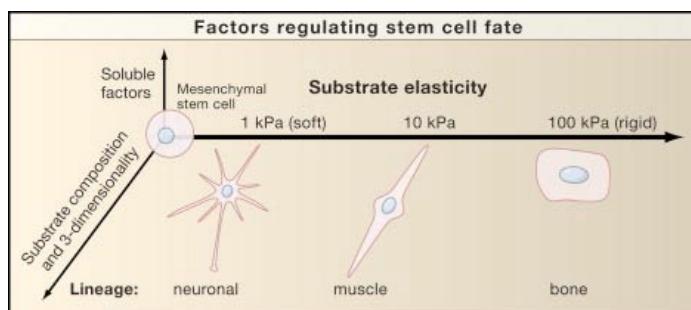
京大の山中先生が iPS 細胞でノーベル賞を受賞されたのが丁度この頃で、天邪鬼な私は「幹細胞を扱う研究は行ってみたいが、iPS 細胞は流行りモノのようで嫌だ」と思い、色々調べているうちに間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)という体性幹細胞なるものが存在することを知った。下は、私が理解している範囲での、各幹細胞の特徴をまとめた表になる。

	ES 細胞	iPS 細胞	MSC
分化能	多能性 (内・外・中胚葉全て)	多能性 (内・外・中胚葉全て)	基本的には中胚葉の細胞 (外・内肺葉細胞への分化も、一部報告されている)
拒絶反応	あり	なし	なし
倫理的問題	あり	なし	なし
がん化リスク	極めて低い	あり	極めて低い

iPS 細胞を“人工の幹細胞”と表現すれば、MSC は“天然の幹細胞”といえる。iPS 細胞は、成熟皮膚細胞などに外来性の遺伝子を導入することで強制的に未分化状態にした細胞である。外肺葉、内胚葉、中胚葉全ての細胞に分化できる多能性と呼ばれる分化能が魅力的であるが、分化可塑性やがん化の危険性があり、iPS 細胞の実用化は「がん化リスクの低減と未分化細胞の排除」にかかっている。一方、MSC の最大の魅力は安全性にある。骨髄、脂肪組織、筋肉組織などに MSC は存在し、各組織から MSC を抽出・分離するだけで同幹細胞を利用することができる。初期化処理が無いため、がん化のリスクは極めて低い。しかし、既に中胚葉系に分化が進んだ幹細胞であるため、基本的には骨芽、軟骨、脂肪、筋肉などの中胚葉系の細胞に分化先が限定される。しかし、外来性遺伝子の導入に依存しない安全な手法で MSC の分化能を拡大することができれば、iPS 細胞に代わる医用幹細胞ソースとなる可能性がある。

1.2 培養足場を利用する MSC の分化制御

MSC の分化を安全に制御する方法については、2006年の Engler らの報告¹に重要なヒントがある。彼らは同じ材料であるが、異なる硬さをもつ高分子マトリクス表面上で MSC の分化挙動を解析した。その結果、柔らかな表面上では神経細胞(外胚葉)に、硬い表面上では骨芽細胞(中胚葉)に、中間の硬さをもつ表面では筋細胞(中胚葉)に分化方向性が傾くことを発見した(下図)。つまり、細胞の外部環境を造りこむことで MSC の分化制御が可能であることを示しており、特に胚葉が異なる神経細胞への分化が傾いたことは注目に値する。外部環境や足場を造り込んで細胞機能を制御するという手法は、遺伝子操作に大きく依存する従来法よりも安全で、化学専門の研究者が得意とする非生物学的なアプローチである。



※Cell, 126 (4), 645–647 (2006) に掲載された図を、許可のもと転載

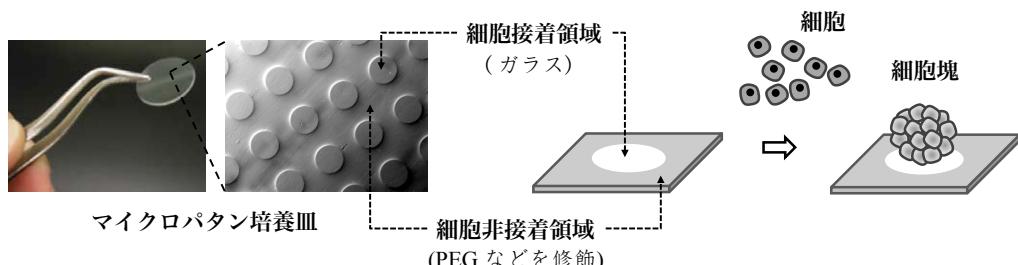
本稿では、我々の最近の成果の中から、主に MSC と関連するものを集めて紹介する。いずれも“細胞の外側からのアプローチ”を利用した高分子工学(ポリマーエンジニアリング)の研究である。

2. 合成高分子修飾マイクロパターン培養皿を用いる MSC の分化制御²

2.1 マイクロパターン培養皿上における脂肪幹細胞 (ADSC) の細胞塊形成

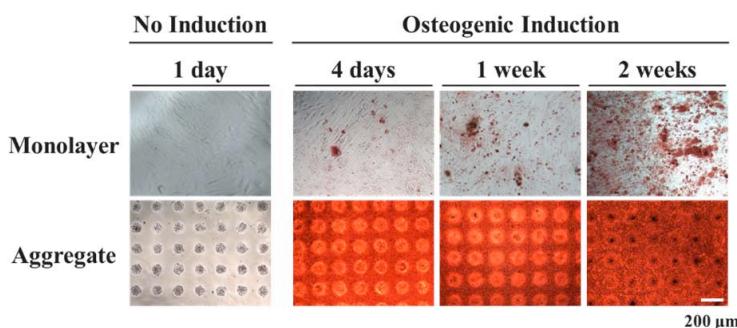
設立 2 年目に研究室に入ってきた学生が、マイクロパターン培養皿を用いて MSC の一つである脂肪幹細胞 (ADSC) の凝集塊形成条件を見つけてくれた。マイクロパターンを用いる凝集塊形成は細胞の三次元培養法の一つであり、生体外で細胞機能を高める常套手段の一つである。筆者は筑波大学時代にマイクロパターンを用いる肝臓系細胞の凝集塊形成に関する研究に携わっていたため³、同培養法を MSC に適用すると、どのようなことが起こるのか興味があった。

マイクロパターン培養皿はポリエチレングリコール(PEG)などのタンパク質吸着抑制能の高い合成高分子を修飾したガラスやポリスチレン基材表面上に、電子線、UV 照射、マイクロコンタクトプリント法などを用いてマイクロメートルオーダーの細胞非接着領域を作製したものである。細胞または細胞群の接着形状を任意の形に変形可能な機能性培養皿で、例えば、下図のような細胞接着性領域が円形のマイクロパターン上に細胞濃度をやや高めに設定して播種すると、細胞塊の形成が確認できる。古典的な手法である旋廻培養法やハンギングドロップでも細胞塊は形成可能であるが、マイクロパターン培養法の特長は、小さくて均一な大きさをもつ細胞塊を一度に大量に作製でき、低酸素環境の影響を最小限に抑えられる点にある⁴。



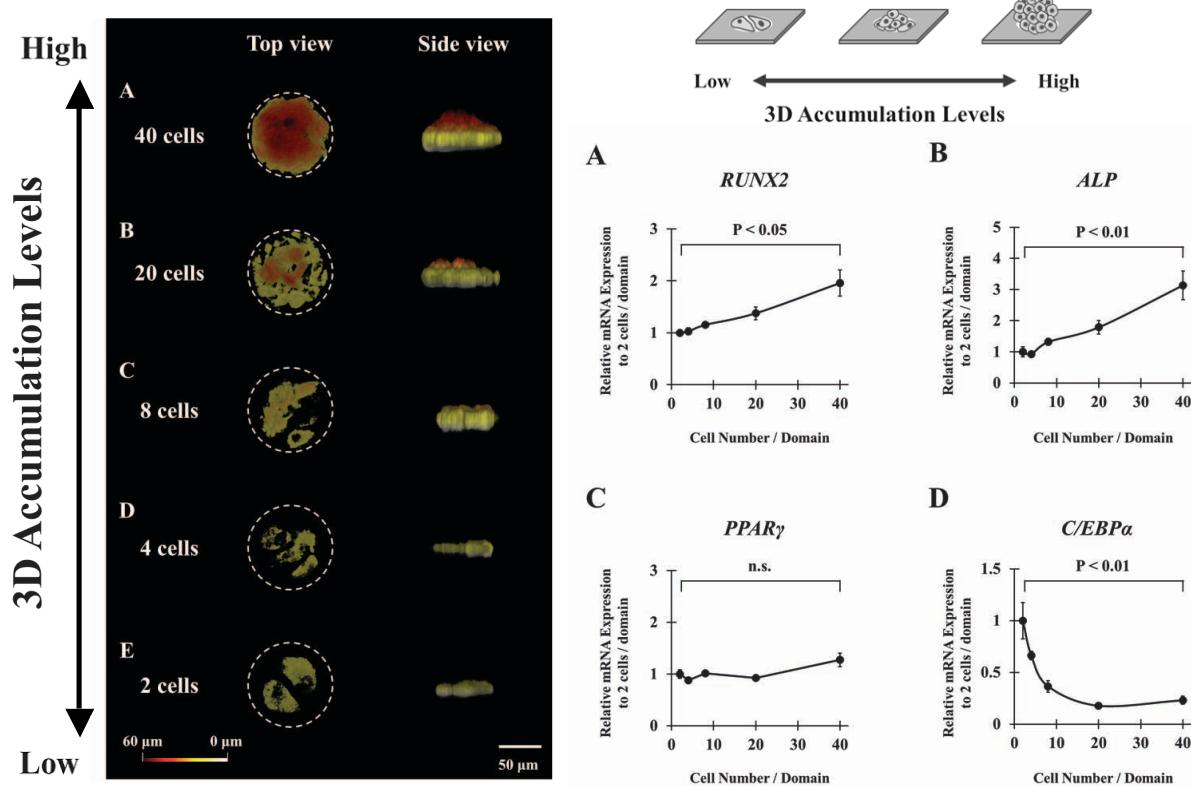
2.2 細胞塊形成による ADSC の骨芽分化誘導時間の短縮化

ADSC の凝集塊形成条件を見つけた学生が、凝集塊形成後に骨芽分化誘導を行ったところ、大変興味深い現象を見出した。下図は、単層培養とマイクロパタン上で細胞塊培養した ADSC を骨芽細胞に分化誘導した後、分化した骨芽細胞が出すカルシウムをアリザリンレッド S で染色した結果である。単層培養だと約 2 週間ほどの誘導期間が必要であるが(下図 Monolayer)、マイクロパタン上で細胞塊を形成させた ADSC は既に 4 日目で大量のカルシウムを放出していることがわかる(下図 Aggregate)。RunX2 などの骨芽関連遺伝子の発現量も増大していたことから、細胞塊になることで ADSC の骨芽分化が遺伝子レベルで大幅に促進されるという、大変興味深い現象をみつけた。



2.3 細胞塊の蓄積レベルが MSC の分化運命を左右する

2.2 の現象をさらに考察するため、凝集塊の分化誘導前の遺伝子発現量を、細胞の蓄積レベルを変化させて調査した。その結果、細胞蓄積量(3D Accumulation Level)が大きくなると骨芽分化関連遺伝子である RunX2 と ALP の発現量が増大し(下図 A・B)、脂肪分化関連遺伝子である PPAR γ と C/EBP α の発現量が変化なし、または減少することがわかった(下図 C・D)。つまり、ADSC 細胞塊の蓄積量を制御することで、誘導前から骨芽細胞分化に有利な遺伝子発現状態を作り出すことができた。本結果は、高分子足場材料を用いて MSC の骨芽細胞分化制御を達成した好例で、幹細胞分化における足場の重要性を再認識させる成果であった。

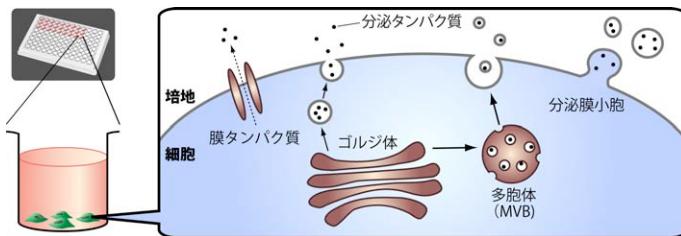


3. セクレトームと酵素/ポリマーコンプレックスの非選択的な応答を利用する MSC の分化診断⁵

3.1 幹細胞の品質管理

幹細胞を再生医療や疾患モデルとして使用する場合、細胞が未分化状態を維持しているか、あるいは目的の細胞に分化が進んでいるかを精度良く管理・把握する必要がある。ウエスタンブロット、免疫染色やRT-PCRのような手法では、マーカ分子・遺伝子の染色や抽出を要するため、有効なマーカ分子が存在しない場合は細胞を適切に評価することができない。加えて、染色や抽出の際に細胞を損傷させてしまうため、評価を行った細胞自体を利用することが困難という問題がある。幹細胞の分化/未分化状態を外側から非侵襲的に診断することができる分析法の開発は、高精度な品質管理を行う上で大きな意義がある。

3.2 セクレトーム



研究室設立 3 年目に学振 PD が幸運にもラボメンバーに加わった。人間的にも研究者としても素晴らしい素養をもった人で、彼と一緒に研究を進めるうちに、細胞分泌液を利用する非侵襲的細胞診断法の可能性を議論するようになった。

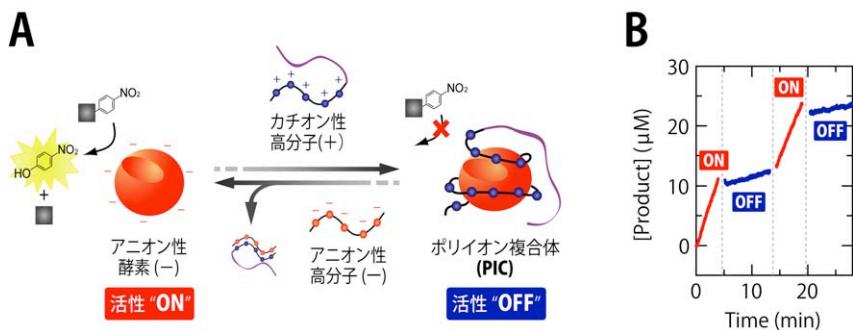
細胞や組織などに存在しているタンパク質の総体をプロテオーム (Proteome) と呼び、特に細胞から分泌されるタンパク質の総体のことをセクレトーム (Secretome) と呼ぶ。例えば、細胞を増殖・伸展させる物質として知られている成長因子は、主に間質系の細胞から分泌されるタンパク質成分である。また、腫瘍細胞から特定のタンパク質が分泌され、血液中に一定量現れるようになる。健康診断の際に用いられる腫瘍マーカーは、この腫瘍からの分泌タンパク質を検出している。つまり、セクレトームは細胞の機能制御に深く関わる液性因子であると同時に、細胞自身の個性を表現する重要な情報源として捉えることができる。

細胞外に放出されるセクレトームを精度良く簡単に分析・診断することができれば、生きた状態のままで特定細胞の同定、さらに異なる環境下におかれた同種細胞間の状態識別が、細胞を破壊(染色・固定化・すり潰しなど)することなく可能となる。但し、各細胞に固有の単一タンパク質マーカーが必ず存在する保証はない。その場合、従来の一般的なアプローチは、セクレトーム内の複数のタンパク質を分析し、その組成を明らかにするというものであった。タンパク質の分析技術は日々進歩しているものの、二次元電気泳動や質量分析装置を駆使して各細胞固有の分泌タンパク質の同定、さらに複数種の分泌タンパク質間の量的関係性に関する知見をコツコツと蓄積し、細胞情報との相関係を見出すという作業は、想像以上に多大な労力と時間が必要になる。セクレトームがもつ情報を一度に迅速に抽出・活用するためには、従来のアプローチとは全く異なる視点からの発想が必要であると我々は考えた。

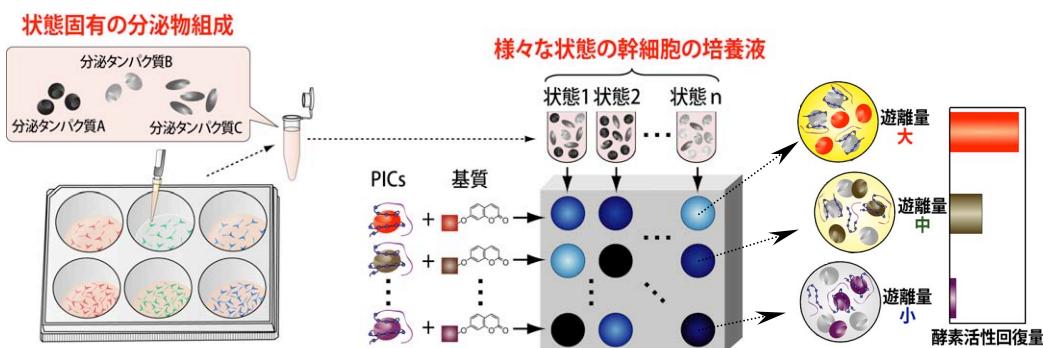
3.3 酵素/PEGポリカチオンポリイオンコンプレックスを利用するセクレトーム分析の提案

細胞が分泌するセクレトームの情報を一般的な機器で短時間のうちに抽出し、細胞を非侵襲的に簡便に識別する分析システムの構築に取り組み始めた。この場合、セクレトームの情報をどのように包括的に読み取るかが鍵となる。我々が利用したのは、“酵素/合成高分子のポリイオンコンプレックスによる非特異的な分子認識”である。イオン性合成高分子であるポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体を酵素

に作用させると、酵素を凝集・沈殿させることなく、酵素/ポリマーコンプレックスを形成することができる。その際、下図 A に示すように、酵素活性を自在にスイッチすることも可能となる⁶。対の電荷をもつ酵素とPEG ブロック共重合体を選択し、水溶液中で多点的な静電相互作用を介してポリイオンコンプレックス (PIC) を形成させる。PIC を形成すると酵素の触媒活性が OFF になるが、ブロック共重合体と反対の電荷をもつイオン性高分子を加えると、酵素が PIC から遊離するために再び酵素活性を ON にすることができる(下図 B)。ラボメンバーとなつた学振 PD のポスドクは、学生時代から本原理を利用する酵素活性制御の研究を開拓し、また筑波大学時代に私は彼と共同研究を行っていたため、PIC に関する十分な知見があった。



我々が考案した細胞診断の原理はとてもシンプルである。上述した PIC の系で酵素活性を ON にするためのイオン性高分子の代わりにセクレトームを用いれば、同様に酵素活性が一部 ON になるのではないかと考えた。さらに、異なる種類の酵素と合成高分子からなる PIC は、セクレトームに対する親和性の傾向も異なるはずである。つまり、異なる種類の酵素/合成高分子からなる PIC に対して各細胞のセクレトームを反応させることで、各細胞固有の“酵素活性回復量のフィンガープリント”が獲得できると考えた(下図)。酵素と合成高分子を組み合わせて作り出した様々な PIC の非選択的な酵素活性回復量を、汎用機器である吸光分光器で測定後、集約することで細胞固有の指紋情報を獲得する、という戦略である。単一マーカーを探して選択的に結合する分子を利用する従来法とは、大きく異なるアプローチである。

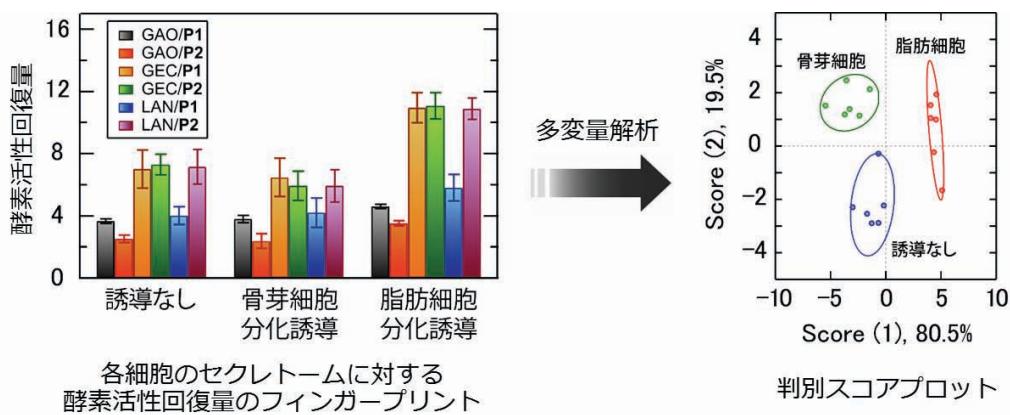


3.4 酵素/PEG PICsと多変量解析を利用する間葉系幹細胞の未分化/分化診断

右図に示すアニオニン性の酵素とカチオニン性の高分子を適切な濃度で混ぜ、PIC を調製した。計 6 種の PIC 用いて 3.3 で説明した測定原理を、まず様々なタンパク質溶液に対して適用したところ、高い精度でタンパク溶液の判別ができることがわかった⁷。そこで、ADSC を单層培養で骨芽細胞および脂肪細胞に 21 日間かけて分化誘導した後に培養液を採取した。この培養液を PIC ライブライリによって分析した結果が次ページ左にある棒グラフになる。各 PIC は、未分化細胞、骨芽誘導細胞、脂肪誘導細胞に対して独特の酵素活性回復量を示し、各細胞に固有

アニオニン酵素	コウジカビ由来 β -Galactosidase (GAO) Mw: 110 kDa, pI: 5.2	大腸菌由来 β -Galactosidase (GEC) Mw: 465 kDa, pI: 5.1 表面疎密度: 0.310	コウジカビ由来 Lipase (LAN) Mw: 32 kDa, pI: 4.0
カチオニン性イオン性高分子			
	P1: m = 35, R = -CH(OH) P2: m = 35, R = -CH(Phenyl)		

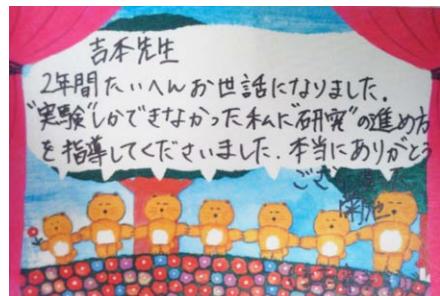
の回復量パターンを示す結果となった。多変量解析の一つである線形判別分析を適用し、6 次元からなる同パターンデータの差異を視覚的にわかり易くするため、二次元の判別スコアプロットに変換した。下図右にある判別スコアプロットからもわかるように、ADSC の未分化、骨芽分化、脂肪分化状態を、培養液を用いて識別できることがわかった。本分析法は細胞を破壊・染色せずに、汎用機器である分光器を用いて分析した細胞を、そのまま次の別の実験に用いることができるという点に大きな特長がある。



4. おわりに & 謝辞

本原稿で紹介した研究は、MSC を外側から制御・診断するというコンセプトのもと行われたもので、貴重な幹細胞を安全に、また無駄なく利用するために発案されたものです。研究室創設時のメンバーと立ち上げた大変思い入れの深いテーマで、2.2 で紹介した骨芽分化促進現象の発見は菊池有夏さん(現・神奈川県高校教員)が、脂肪分化の調査は坂尾美帆さん(現・東大院新領域)が、2.3 で紹介した細胞蓄積量に伴う遺伝子発現量変化の発見は古旗祐一君(現・東大院新領域)が行ってくれました。また、3 のセクレトームを利用する分化状態の識別に関する研究は、富田峻介博士(現・産総研研究員)との共同研究の成果です。右の写真は、菊池さんから卒業時に頂いたメッセージカードで、当時、自身の指導能力に落胆していた私を大きく励ましてくれました。研究室の立ち上げという難しい環境の中、私と共に成長し、粘り強く研究を進めてくれた彼らに、深く感謝致します。

現在進めている吉本研セカンドシーズンの研究は、今回紹介した研究成果から派生しています。近い将来、本誌で再び紹介させて頂けるよう、メンバーと今まで以上に“研究”を楽しもうと思います。



引用文献

- 1 A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* 126, 677–689 (2006).
- 2 Y. Furuhata, T. Yoshitomi, Y. Kikuchi, M. Sakao, K. Yoshimoto, *ACS Appl. Mat. Interfaces*, 9 (11), 9339-9347 (2017).
3. (a) K. Yoshimoto, M. Ichino, Y. Nagasaki, Y., *Lab Chip*, 9, 1286-1289 (2009). (b) R. Kojima, K. Yoshimoto, H. Miyoshi, Y. Nagasaki, *Lab Chip*, 9, 1991-1993 (2009).
4. Y. Furuhata, Y. Kikuchi, S. Tomita, K. Yoshimoto, *Genes Cells*, 21 (12), 1380-1386 (2016).
5. S. Tomita, M., Sakao, R. Kurita, O. Niwa, K. Yoshimoto, *Chem. Sci.*, 6(10), 5831-5836 (2015).
6. (a) S. Ganguli, K. Yoshimoto, S. Tomita, H. Sakuma, T. Matsuoka, K. Shiraki, Y. Nagasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 6549 (2009). (b) S. Tomita, L. Ito, H. Yamaguchi, G. Konishi, Y. Nagasaki, K. Shiraki, *Soft Matter*, 6, 5320 (2010). (c) S. Tomita, K. Shiraki, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 49, 3835 (2011). (d) T. Kurinomaru, S. Tomita, Y. Hagihara, K. Shiraki, *Langmuir*, 30, 3826 (2014).
- 7 (a) S. Tomita, K. Yoshimoto, *Chem. Commun.*, 49, 10430-10432 (2013). (b) S. Tomita, T. Soejima, K. Shiraki, K. Yoshimoto, *Analyst*, 139(23), 6100-6103 (2014). (c) S. Tomita, S. Yokoyama, R. Kurita, O. Niwa, K. Yoshimoto, *Anal. Sci.*, 32(2), 237 (2016).