

細胞活性化型キメラマトリックスの設計による ES/iPS細胞の機能と分化過程の制御

Regulation of functions and differentiation of ES/iPS cells by designing cell-recognizable chimera matrices

赤池 敏宏 (AKAIKE TOSHIHIRO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・特任教授



研究の概要

本研究では、ES/iPS細胞の安定的な培養から様々な組織への分化誘導を効率的に実現するためのバイオマテリアルを創製することを目的としている。我々は、このバイオマテリアルを用いることで、ES/iPS細胞を用いた再生医療及び様々な組織の薬物動態を測定することのできる細胞チップの開発を行うことを目指す。

研究分野：総合領域：人間医工学：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医工学、細胞用まな板、ES/iPS細胞、マトリックス工学

1. 研究開始当初の背景

ES/iPS細胞を用いる研究は、内外で爆発的に行われているが、真に実用化に向けた研究は限られている。その理由として、①ES/iPS細胞の分化誘導の不均一性、②誘導させた分化細胞の未分化細胞との分離の困難さ、③得られる分化細胞数が絶対的に少ない、④フィーダー(MEF)細胞の共存による異種タンパク・糖鎖のコンタミネーション、など多くの問題をはらんでいるからである。このようなことから、ES/iPS細胞の再生医療への実現化においては、chemically definedな条件で効率的な分化誘導法を開発することが重要であり切望されていた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が近年開発した細胞接着分子 E-カドヘリン(E-cad)をベースとした新規人工細胞外マトリックス E-cad-Fcを用いる事で、ES/iPS細胞の新規培養基質の開発を行うことを目的とする。過去に、申請者はこの E-cad-Fcを用いる事で、通常はコロニー化する ES/iPS細胞を、①単細胞として、②長期間、③良好な増殖効率で、④Xenoフリーで培養、⑤肝細胞や心筋細胞への分化誘導が可能であることを示してきた。また申請者は、過去30年にわたり、細胞機能制御を行う人工細胞外マトリックスの設計を行ってきた。この技術は、いわば“細胞まな板”というコンセプトで ES/iPS細胞の全く新し

い培養器材の開発としての応用が期待されている。本研究では、申請者が培ってきた細胞まな板の設計コンセプトから、ES/iPS細胞の未分化から分化誘導を制御できる新規培養器材の開発を行い、効率的な分化誘導を実現することを目指す。

3. 研究の方法

申請者は、これまでに分化誘導に有用と考えられている様々な増殖因子や接着分子を培養皿に安定に固定化する手法を確立している。未分化維持や分化誘導に有効と考えられる因子を培養皿に安定に固定化するためには、因子の一部に培養皿に安定に吸着するタンパク質を付加することが有用である。そこで、申請者は因子を培養皿に安定に吸着させる手段として、その因子の末端に抗体のFcドメインや温度応答性ペプチド(GVGVP)を付加したキメラ分子を作製した。これらのキメラ分子を培養皿固定型キメラ分子として培養皿に固定化し、ES/iPS細胞の未分化維持や分化誘導を検討した。さらに培養皿固定型キメラ分子を安定に吸着させる培養基質の開発も検討を行った。培養皿固定型キメラ分子をパターンニングして固定化させた培養基質を開発することで、様々な分化細胞を一度に培養できる細胞チップの開発が実現できるであろう。

4. これまでの成果

平成23年度と24年度の成果は、いままでのES/iPS細胞の肝細胞分化に加え、N-カド

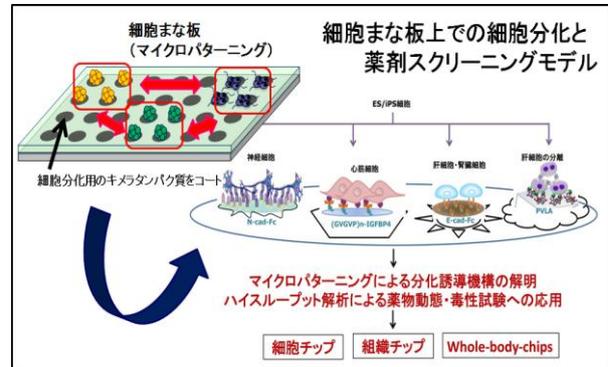
へリン固定型キメラ分子 N-cad-Fc を用いた効率的な神経細胞分化及びインスリン様増殖因子結合タンパク質固定型キメラ分子 (GVGVP67-IGFBP4) を用いた心筋細胞分化誘導、パターンニング基材の設計である。マウス ES 細胞において、SFEB 法によって神経細胞に分化を誘導したものを N-cad-Fc コート培養皿上に播種した場合、神経細胞からの神経突起の出現が著しく上昇することが見出された。神経細胞に N-カドヘリンが発現しており、培養皿上に固定化された N-cad-Fc に対する相互作用が上昇することで、神経突起の伸張を促していることが考えられた。今までは、SFEB 法では、ES/iPS 細胞からの神経細胞分化は 9 割以上の効率で誘導できることが報告されている。本研究では、分化された神経細胞に対して N-カドヘリンを相互作用させることで神経突起の伸張を促進できることから、機能的な神経細胞分化を実現できる可能性がある。このことから、本研究で開発された N-cad-Fc コート培養皿は、薬物の神経毒性などを評価する薬物動態試験用の機能的な神経細胞を効率的に生み出すことが期待できることから、学術的なインパクトが高いと評価できる。

心筋細胞分化誘導では、ES/iPS 細胞の心筋細胞分化を効率的に促進できる心筋分化誘導因子固定型キメラ分子、GVGVP67-IGFBP4 の開発に成功した。従来から ES/iPS 細胞の心筋細胞分化は、細胞の Wnt シグナルを阻害することによって行われることが報告されており、この IGFBP4 も細胞の Wnt レセプターを阻害することで、ES/iPS 細胞の心筋分化を誘導することが報告されていた。最近では、この Wnt シグナルの阻害による心筋分化は、低分子化合物を用いることで盛んに研究されている。しかしながら、低分子化合物の予期せぬ副作用の可能性が否定できず、薬物動態試験においてもその妨げになることも予想される。本研究では、生体の心筋発生に関与すると言われている IGFBP4 に着目し、この分子を用いた ES/iPS 細胞の効率的な分化誘導に取り組んだ。IGFBP4 は、胎生期において wnt シグナルを阻害することで心発生に関与することが報告されている。このようなことから、生理的な条件下での ES/iPS 細胞の心筋細胞分化誘導に有効である。そこで、IGFBP4 に培養皿固定型のためのポリペプチド (Gly-Val-Gly-Val-Pro)67 を融合させた (GVGVP)67-IGFBP4 を作製した。この (GVGVP)67-IGFBP4 を固定化した培養皿によって心筋分化誘導を検討したところ、ES/iPS 細胞の心筋分化誘導を効率的に促進できることが明らかになった。

5. 今後の計画

平成 25 年度及びそれ以降は、作製した培養

皿固定型キメラ分子を固定化した“細胞用まな板-Cell cooking plate”の基本設計概念の基でのヒト iPS 細胞の未分化維持培養と分化誘導が確実なものになるように検討していく。これによって、様々な組織への分化誘導の実現を目指していく予定である。



6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Interactions of vimentin- or desmin-expressing liver cells with N-acetylglucosamine-bearing polymers. Kim SJ, Ise H, Goto M, Akaike T., Biomaterials. 33, 2154-64. (2012)
2. Cardiac differentiation of embryonic stem cells by substrate immobilization of insulin-like growth factor binding protein 4 with elastin-like polypeptides. Minato A, Ise H, Goto M, Akaike T., Biomaterials.33, 515-23. (2012)
3. The differentiation and isolation of mouse embryonic stem cells toward hepatocytes using galactose-carrying substrata. Meng Q., Haque A, Hexing B. Akaike T., Biomaterials, 33, 1414-27. (2012)
4. Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-based substrata. A. Haque, X-S. Yue, A. Motazedian, Y.Tagawa, T. Akaike. Biomaterials, 33, 5094-106, (2012)
5. Control of Singular Cell Cycle Synchronization of Mouse ES Cells for Hepatocyte Differentiation on E-Cadherin Substratum. Jovic D., Haque A, Hexing B, Nagaoka M, Akaike T., J. Biotechnol. Biomaterial 1:113 (2011)
6. 細胞認識性バイオマテリアル設計からカドヘリンマトリックス工学を展望して。赤池敏宏、長岡正人 再生医療 11 (4) 338-359, (2012)