146. ヒト iPS 由来造血前駆細胞のストレス制御因子の同定

杉村　竜一

京都大学 iPS 細胞研究所 斎藤潤研究室

Key words：Organs-on-chips, Hematopoiesis, Pluripotent stem cells, Hematopoietic stem and progenitor cells

緒　言

Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) -on-a-chip は造血発達中の細胞相互作用の理解に貢献すると期待されている [1]。造血発達を理解することは、ヒト造血幹細胞及び前駆細胞の誘導に必要である [2]。フィーダー細胞の存在は造血　発達に寄与すると示唆されているが、細胞相互作用の関与は不明であった [3]。本研究では AGM-on-a-chip を構築することで細胞間の相互関係を理解することを目指した。

方法、結果および考察

1. AGM-on-a-chip の構築

AGM-on-a-chip は、構造の点で生体を模倣している。ヒト人工多能性幹細胞（Human Induced Pluripotent Stem Cell：hiPSC）由来の造血内皮細胞（Hemogenic endothelium：HE）である hiPSC-HE 細胞、内皮のモデルとしての HUVEC、及びフィーダー細胞として AGM の 3 細胞を chip に組み込んだ（図 1b）。デバイスは 3 μm の多孔質によって分離された二つの PDMS マイクロチャネルの膜で構成されており、これにより細胞間の相互作用を可能にした（図 1c、d）。

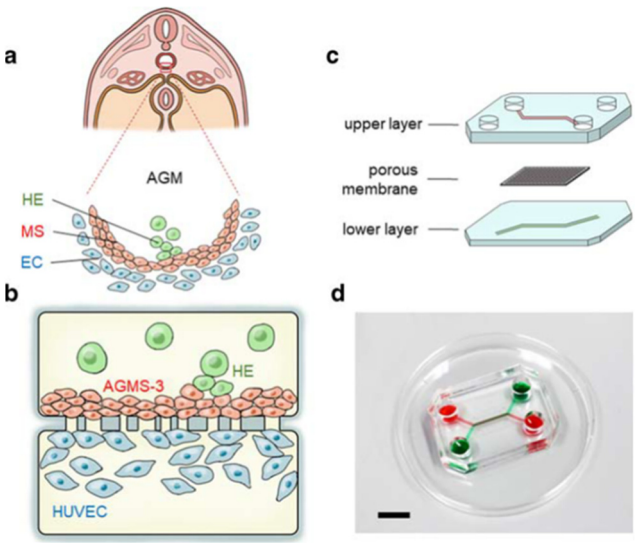

図1. 大動脈の構造-性腺-中腎（AGM）-on-aチップ

a）AGMのスキーム。AGMは造血性内皮細胞（HE）、間葉系間質（MS）及び内皮細胞（EC）の3種の細胞から構成される。

b）AGM-on-a-chipのスキーム。上の層にHEとAGMの3種の細胞（AGMS-3）を配置し、下の層にはHUVECを配置した。

c）AGM-on-a-chipの構造。上層と下層のポリジメチルシロキサン（dimethylpolysiloxane：PDMS）にサンドイッチされた多孔質膜。培地は管から注入した。リザーバー（直径6 mm）。

d）AGM-on-a-chipの写真。スケールバー＝10 mm

2. 造血発達の評価

造血仕様を検討したAGM-on-a-chipのhiPSC-HE細胞を図2に示す。CD34を発現する丸い形の細胞は、培養6日後にCD45を発現した（図2a、b）。hiPSC-HE細胞はCD45を発現しておらず、造血マイクロ流体チップでCD45陽性の造血前駆細胞（Hematopoietic Progenitor Cell：HPC）への遷移が誘導された。図2cにAGM-on-a-chipの断面画像を示す。GFP-hiPSC-HE細胞（グリーン）の発現は直接維持され、トップチャネルのMS細胞（マゼンタ）及び血管ー膜の下側に形成された内皮（シアン）が認められた（図2c）。細胞は3.0μmの細孔を含む膜層間で互いに接触していた。全体としてCD45を発現するGFP陽性細胞が形成されたことを確認した。

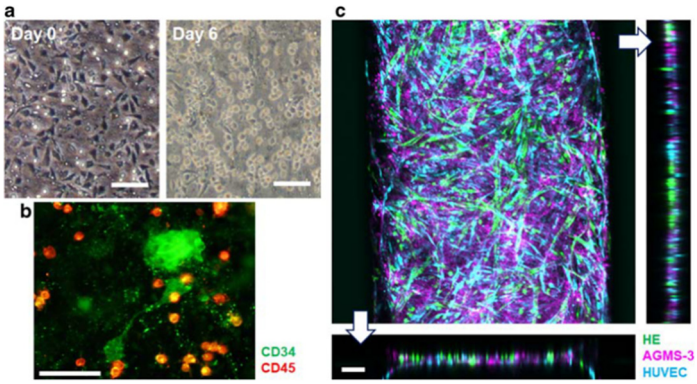

図2. AGM-on-a-chipの細胞部分

a) 明視野の顕微鏡像。フィーダー細胞なしでHEをチップに播種すると、培養6日後に丸い形の造血前駆細胞が観察された。

b) 免疫蛍光顕微鏡像。CD34（グリーン）を発現するHEからCD45（オレンジ）を発現する造血前駆細胞への遷移が認められた（免疫蛍光顕微鏡写真）。

c) AGM-on-a-chipの共焦点蛍光顕微鏡写真。GFP陽性HE細胞（グリーン）、mCD13陽性AGMS-3細胞（マゼンタ）、及びRFP陽性HUVEC（シアン）。クロス断面画像を右及び下に示した。スケールバー＝100μm

3. フィーダー細胞の寄与

次に、造血促進の指標として内皮造血転換（Endothelial to Hematopoietic Transition：EHT）について、懸濁液及びAGM-on-a-chipで検討した（図3a）。フィーダー細胞の存在は、HPCへの転換（数）を大幅に促進した（図3b）。また、コロニー形成単位（Colony Forming Unit：CFU）について検討したところ、HPC数と同様にフィーダー細胞による促進効果が認められた（図3b）。2週間の培養でフィーダー細胞の存在（図3c）は、機能的なHPCを維持する上で重要であると示された。この発見は、MSとECがゼブラフィッシュHEの造血を促進することと一致する（Tamplin et al.2015）。さらに、CFUの比較においては、フィーダー細胞によるEHT促進効果は、1週間と2週間の両方において浮遊培養に比してAGM-on-a-chipで高いことが明らかとなった（図3c）。これらのデータは、AGM-on-a-chipの利点を示していると考えられる。

続いてEHTにおける微小環境の影響について評価した。図4aに示したように、AGM-on-a-chipからのHPCの生産を評価するチップで、マイクロ蠕動ポンプを使用して培地を灌流し、デバイスから流出した細胞をについてフローサイトメトリーによる分析を行ったところ、流出した細胞の平均47%は$CD34^{+}CD45^{+}$であったが、一部フィーダー細胞も存在していた（図4b）。デバイス内の細胞のフローサイトメトリー分析により、ほぼすべてのHPCが流体せん断応力を加えることにより、チップから収穫することができた（約0.25ダインcm^{-2}）。また、コロニー形成を確認したところ、チップ内に新しく形成されたHPCが灌流を利用することで、チップから継続的に収集された（図4b、c）。これらのデータは、AGM-on-a-chipは、HPCを引き出して造血源としての他のタイプのOrgans-on-chipと組み合わることが可能であることを示唆した。

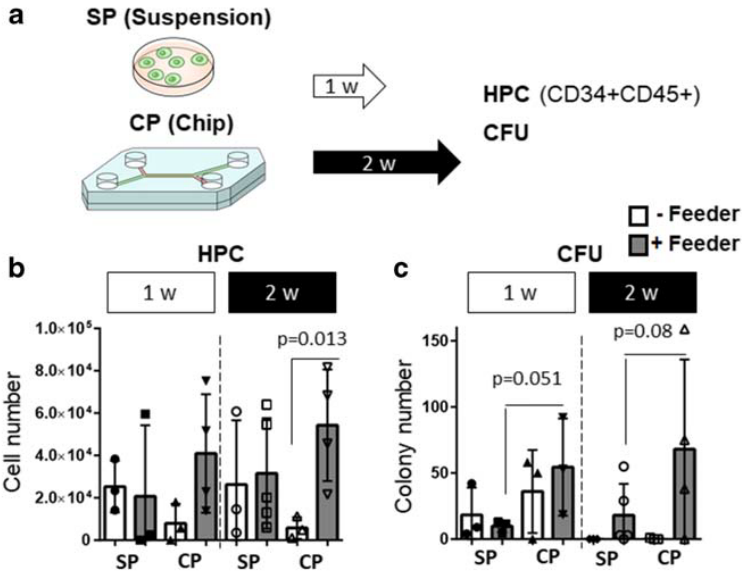

図 3. AGM-on-a-の EHT チップ

a) 実験スキーム。HE細胞にまたはを播種した。フィーダーセルなし・あり（AGMS-3及びHUVEC。

b、c）1〜2週間の培養後、チップから全細胞を収集して分析した。HPCマーカー（CD34及びCD45）及びメチルセルロースによるCFU造血アッセイを行った。

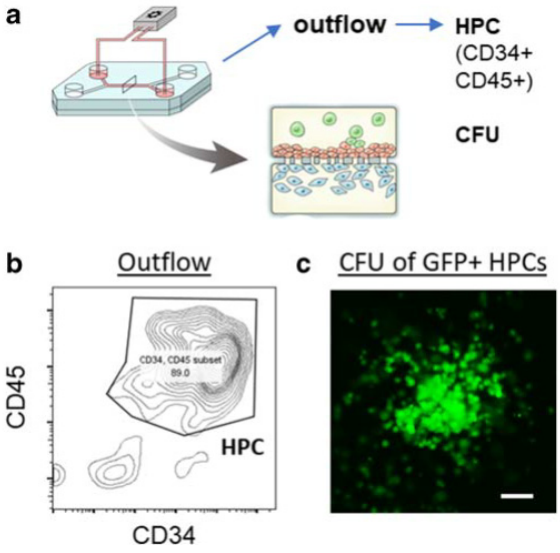

図4. AGM-on-a-chipの流出からのHPCの収集

a) 実験スキーム。GFP陽性HE細胞、AGMS-3細胞及びHUVECをデバイスに播種した。

b) 1週間の培養後、HPCマーカー（CD34及びCD45）とCFU造血アッセイで分析した。フローサイトメトリーによる分析はHPCマーカーを発現している細胞を測定し、デバイスあたりの流出液中のHPCの割合の平均を示した。

c) コロニーの蛍光顕微鏡像。スケールバー＝200 μ m。

本研究では、*in vitro* での AGM-on-a-chip を紹介した。血球が産生できる生体模倣 AGM としてのチッププラットフォームの開発は、ヒト iPS からの血球産生に貢献することが期待できる。AGM-on-a-chip は、浮遊細胞培養よりも

効率よく EHT を誘導した。コロニー形成能力を評価する試験管内アッセイではフィーダー細胞が血球産生にポジティブに働くことが示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院工学部の鳥澤勇介である。

文　献

1） Blaser BW, Zon LI. Making HSCs in vitro: don't forget the hemogenic endothelium. Blood 132, 1372–1378 (2018) Blood. 2018 Sep 27;132(13):1372-1378. doi: 10.1182/blood-2018-04-784140

2） Diaz MF, Li N, Lee HJ, Adamo L, Evans SM, Willey HE, Arora N, Torisawa YS, Vickers DA, Morris SA, Naveiras O, Murthy SK, Ingber DE, Daley GQ, García-Cardeña G, Wenzel PL. Biomechanical forces promote blood development through prostaglandin E2 and the cAMP-PKA signaling axis. J Exp Med. 2015 May 4;212(5):665-80. doi: 10.1084/jem.20142235.

3） Dzierzak E, Bigas A. Blood development: Hematopoietic stem cell dependence and Independence. Cell Stem Cell. 2018 May 3;22(5):639-651. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.015.