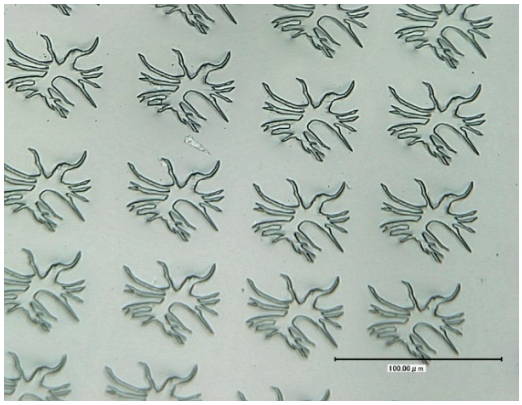
95　モルフォロジカルダイレクトリプログラミングへの挑戦	森田　康之

【目的】ダイレクトリプログラミングは、幹細胞へ戻す初期化プロセスを経ないため、初期化プロセスを経る分化誘導法と比して効率が約 10 倍増加する。しかし既存のダイレクトリプログラミング手法は、体細胞を iPS 細胞へ戻す初期化プロセスと基本的に同じ遺伝子導入法を用いている。そのため、プロセス数は軽減されるが、発がん化リスクおよびコストの問題などは解決されていない。そこで本研究では、新しいダイレクトリプログラミング技術として、細胞の「形態」に着目した。私たちの体を構成する細胞は、それぞれの機能に応じた特徴的な形態をもっている。そのため、細胞の形態を操作することにより、その機能を変化させることができる可能性を秘めている。すなわち、細胞の形態制御が、ある体細胞から別の体細胞への直接的な変化を実現する可能性である。これは、既存の再生・細胞医療の繁雑なプロセスを劇的に簡略化させるとともに、そこに内包されるがん化リスク、コスト問題を克服する。本課題では、線維芽細胞（スタート細胞）から脳組織を構成するアストロサイト（ターゲット細胞）へのダイレクトリプログラミングを試みた。アストロサイトをターゲット細胞とした理由は、脳組織を構成するアストロサイトなどの細胞は一度損傷を受けると再生が難しく、再生医療技術による展開が強く必要とされる一つの細胞であるためである。

【方法】スタート細胞にはヒト新生児皮膚線維芽細胞を用いた。ターゲット細胞には、脳神経アストロサイトを使用した。アストロサイトを形態拘束なしに二次元培養し、その画像を取得した。そして、フォトリソグラフィを使用し、ガラス基板にそのパターンを形成し、モールドとした。そのモールドの細胞培養基板となる PDMS を流し、パターンが凸状となる細胞培養基板を作製した。その後、凸部に細胞接着分子であるフィブロネクチンをコーティングし、スタート細胞であるヒト新生児皮膚線維芽細胞を播種した。

【結果】形状拘束を行わず二次元培養したヒト新生児皮膚線維芽細胞においても、アストロサイトの分化マーカーである GFAP（Glial Fibrillary Acidic Protein）は発現されたが、それよりも高い発現が、アストロサイトのパターン上に播種されたヒト新生児皮膚線維芽細胞において観察された。この結果は、スタート細胞をターゲット細胞の形状に制御することにより、スタート細胞がターゲット細胞へ分化する可能性を示唆している。

アストロサイト形状のマイクロパターン



95. モルフォロジカルダイレクトリプログラミングへの挑戦

森田　康之

熊本大学 大学院先端科学研究部 産業基盤部門 先端工学第三分野（医療材料）

Key words：ダイレクトリプログラミング，モルフォロジー，マイクロパターニング，線維芽細胞，アストロサイト

緒　言

現在の再生・細胞医療は、患者から体細胞を採取し、初期化のための遺伝子導入により様々な細胞へ分化する能力をもつ幹細胞（iPS 細胞）に戻すことから始まる。そしてさらなる遺伝子導入により別の体細胞へ分化を促す。この一連のプロセスの効率は現在でも決して高いとは言えず、例えば 100 個の体細胞を採取したとしても、最終的に別の体細胞として得られるのは 0〜1 個と極めて少ない。加えて、遺伝子導入で使用するウイルスによる発がん化リスク、高価な液性因子のコストの問題など、再生・細胞医療が基盤医療・基幹産業の一つとなるには、乗り越えるべき課題はいくつもある。

そのような背景で、さらなる効率化が模索され、ダイレクトリプログラミングが開発されるに至る［1］。ダイレクトリプログラミングは、幹細胞へ戻す初期化プロセスを経ないため、効率が約 10 倍も増加する。しかし既存のダイレクトリプログラミング手法は、体細胞を iPS 細胞へ戻す初期化プロセスと基本的には同じ遺伝子導入法を用いている。そのため、プロセスの数は軽減されるが、発がん化リスクおよびコストの問題などは解決されていない。

そこで本研究では、新しいダイレクトリプログラミング技術として、細胞の「形態」に注目した。私たちの体を構成する細胞は、それぞれの機能に応じた特徴的な形態をもっている。そのため、細胞の形態を操作することにより、その機能を変化させることができる可能性を秘めている。すなわち、細胞の形態制御が、ある体細胞から別の体細胞への直接的な変化を実現する可能性である。これは、既存の再生・細胞医療の繁雑なプロセスを劇的に簡略化させるとともに、そこに内包されるがん化リスク、コスト問題を克服する。このコンセプトは根拠のない発想ではなく、既に形態制御を用い、幹細胞から体細胞へ分化させる技術は報告されている［2, 3］。そのため、遺伝子導入法に頼らず形態制御によりダイレクトリプログラミングを実現できる可能性は十分にある。本課題では、線維芽細胞（スタート細胞）から脳組織を構成するアストロサイト（ターゲット細胞）へのダイレクトリプログラミングを試みた。アストロサイトをターゲット細胞とした理由は、脳組織を構成するアストロサイトなどの細胞は一度損傷を受けると再生が難しく、再生医療技術による展開が強く必要とされる一つの細胞であるためである。

方　法

1. スタート細胞の培養

スタート細胞として、ヒト新生児皮膚線維芽細胞（RCB0222：NB1RGB）を使用した（図 1）。指定の培地を用い、温度 37℃、CO_2濃度 5%の環境下のインキュベータで培養した。培地は毎日交換し、継代を 2〜3 日ごとに行った。

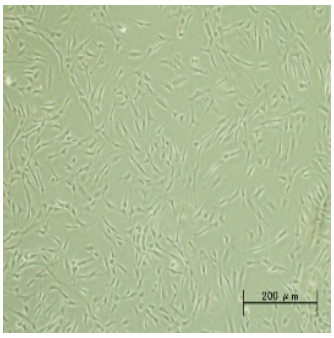


図 1. ヒト新生児皮膚線維芽細胞
スタート細胞としてヒト新生児皮膚線維芽細胞
（RCB0222：NB1RGB）を使用した。

2. ターゲット細胞の形態の取得

ターゲット細胞には、脳神経アストロサイトを使用した。指定の培地を用い、温度 37℃、CO_2濃度 5%の環境下のインキュベータで培養した。数日間培養した後、位相差顕微鏡による形態画像を取得した。エッジ処理などの画像処理を施し、パターン化したアストロサイトの画像を図 2 に示す。

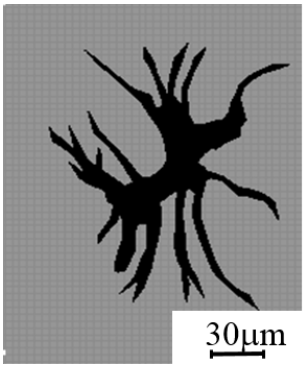


図 2. アストロサイトのパターン
位相差顕微鏡による形態画像を取得し、画像処理を介し
パターン化したアストロサイトの画像。

3. 細胞培養基板の作製

フォトリソグラフィを使用し、ガラスウェハ上の 5×5 mm^2の領域にターゲット細胞の形状を反転させたパターンをもつモールドを作製した。そのモールドに培養基板となる PDMS を流し込み、成形する。その結果、PDMS の細胞培養基板上にターゲット細胞の形状が凸型として作製される（図 3）。その後、細胞培養基板上のターゲット細胞の形状をした凸部に細胞接着分子であるフィブロネクチンをコーティングした。

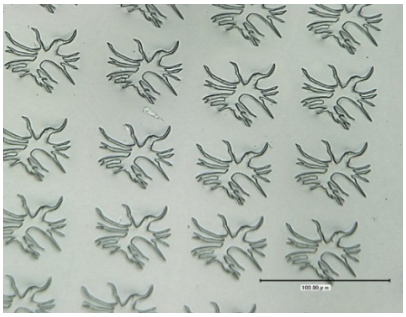


図 3. PDMS 細胞培養基板上に作製されたアストロサイトのパターン
PDMS の細胞培養基板上に凸型パターンとして形成されたターゲット細胞の形状。

4. スタート細胞の播種濃度

ターゲット細胞の 1 つのパターン上に、1 個のスタート細胞を効果的に播種する必要があるため、本研究では、スタート細胞を 1.0×10^3、1.0×10^4、1.0×10^5、1.0×10^6 cells/cm^{2}の細胞濃度について検討した。

5. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色として、細胞核を染色する DAPI、およびアストロサイトに特異的に発現する GFAP（Glial Fibrillary Acidic Protein）を使用した。

結果および考察

1. スタート細胞の細胞濃度

それぞれの細胞濃度におけるパターン上への播種の成功率を図 4 に示す。青が 1 つのパターン上に 1 個の細胞が播種された割合であり、赤が 1 つのパターン上に複数個の細胞が播種された割合を示している。1.0×10^3 cells/cm^{2}の細胞濃度では、パターン上への播種が成功しなかったが、細胞濃度が増加するにつれて、パターン上への細胞の播種割合は増加していくが、複数個の細胞が播種される割合が大幅に増加する。本研究では、1 つのパターン上に 1 個の細胞の播種割合が最も高かった 1.0×10^5 cells/cm^{2}の細胞濃度を採用した。

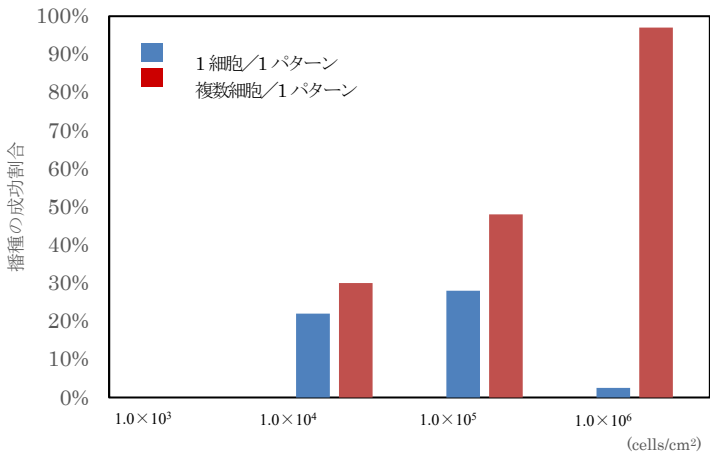


図 4. 細胞濃度に対するパターン上への播種の成功割合
青が 1 つのパターン上に 1 個の細胞が播種された割合、赤が 1 つのパターン上に複数個の細胞が播種された割合を示している。

2. 免疫蛍光染色

アストロサイトのパターン上に播種されたスタート細胞の免疫蛍光染色結果の一例を図 5 に示す。細胞核とほぼ同じ位置に、アストロサイトの分化マーカーである GFAP の発現が観察された。ちなみに、スタート細胞であるヒト新生児皮膚線維芽細胞を、形態制御を行わずに自由平面上での二次元培養を行った場合でも GFAP の発現は若干観察された。しかし、アストロサイトのパターン上に播種された線維芽細胞の方が、その発現が定性的ではあるものの高い傾向を示していた。この結果は、スタート細胞をターゲット細胞の形状に制御することにより、スタート細胞がターゲット細胞へ分化する可能性を示唆している。

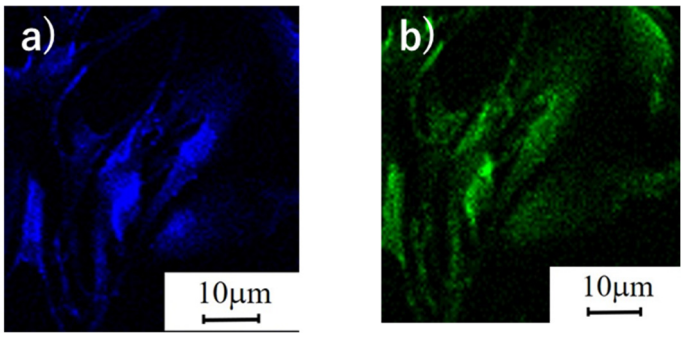


図 5. パターン上に播種された細胞の免疫蛍光染色
a) DAPI。
b) GFAP。

文 献

1) Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. Nature. 2007 Sep 27;449(7161):473-480. PMID: 17851532 DOI: 10.1038/nature06159
2) Peng R, Yao X, Ding JD. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. Biomaterials. 2011 Nov 1; 32(32):8048-8057. PMID: 21810538 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.035
3) Kilian A, Bugarija B, Lahn B, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. Proceedings of the Natioanl Academy of Sciences of the United States of America. 2010 Mar 16;107(11):4872-4877. PMID: 20194780 DOI: 10.1073/pnas.0903269107