ヒトiPS細胞由来内胚葉前駆細胞の分離取得と肝分化誘導への応用

松下, 沙希子

博士論文

ヒト iPS 細胞由来内胚葉前駆細胞の分離取得と肝分化誘導への応用

令和 4 年 2 月

九州大学　大学院システム生命科学府

システム生命科学専攻　生命工学講座　生命プロセス工学分野

松下　沙希子

指導教員：水本博 准教授

目次

第1章 緒言

1.1　本研究の目的

肝臓は再生能力・代謝能力に優れた生体内で最大の臓器であり、合成、解毒、貯蔵などその働きは多岐にわたる。このような肝臓の機能を人工的な装置で全て補うことは中長期的にみても極めて困難であり、重篤な肝不全患者に対して有用な治療法とされているのは肝移植のみであるのが現状である。そこで近年注目されている治療法として、肝再生医療がある。肝再生医療は、主に 2 つの方法が挙げられる。1 つ目は、移植法であり、肝臓の一部や肝細胞あるいは肝組織様構造物を移植する方法である。2 つ目は、体外設置型のハイブリッド型人工肝臓補助システムであり、肝細胞と人工担体を組み合わせたハイブリッド型人工肝臓を用いて患者の体外から肝機能を強力にサポートする方法である。

しかし、これらの肝再生医療の実現には、臨床用細胞源の確保が最重要課題となっている。本来ならば、標的となる臓器・組織を構成する細胞を用いることが好ましいが、肝細胞に代表されるように、ドナーが不足する、あるいは増殖能に乏しい場合、大量供給が困難である。そこで、これらの問題を回避できる新たな細胞として、京都大学の山中らにより樹立された人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem cells：iPS 細胞）が注目されている[1]。iPS 細胞は終末分化した体細胞へ数種の遺伝子を導入することにより樹立され、胚性幹細胞（embryonic stem cells：ES 細胞）と同様の性質を有する細胞である。iPS 細胞の樹立法発見により、ヒト ES 細胞の樹立や利用における生命倫理的問題の抜本的解決が期待される。さらに、患者自身から樹立した iPS 細胞を細胞源として使用することができれば、拒絶反応の無い移植用組織や臓器の作製が可能になると期待されており、再生医療の更なる発展に向けて注目が集まっている。

本研究では、肝再生医療の細胞源を確保する手段としてヒト iPS 細胞に着目し、その効率的な肝分化誘導法の確立を目指すことを目的とする。未分化な細胞から大量の目的細胞を得る場合、効率よく目的とする細胞へ分化させる技術が必要である。現在、様々な機能細胞への分化が報告されているが、その分化誘導効率は必ずしも 100%ではなく、目的細胞以外の細胞や場合によっては未分化細胞の残存が見られることもある。当研究室においても、独自の培養法である中空糸培養法を用いて分化誘導因子添加培地で培養することで、一部がマウス ES 細胞から肝細胞へ分化することを確認している。しかしその一方で、本手法での肝細胞への分化誘導効率は 30%程度であり、分化誘導後期においても未分化細胞特異的細胞表面抗原である SSEA-1 の発現が認められた。このような場合、未分化細胞は完全に除去することが必要である。

そこで本研究では、中空糸培養法によるヒト iPS 細胞の大量培養を検討するとともに、分化誘導初期過程において、肝細胞へと運命付けられた細胞集団を分離取得し、その細胞を成熟化させる 2 段階の分化誘導プロセスの確立を検討した。肝細胞へと運命付けられた細胞集団として、分化ステージを経るごとに肝細胞に分化していく可能性を有する内胚葉

前駆細胞として、内胚葉を示すマーカーであるケモカイン受容体 C-X-C chemokine receptor type 4（CXCR4）を発現している細胞集団に着目した。まず、中空糸内部での自発的分化過程における CXCR4 発現細胞の解析を行った。次に培養過程における CXCR4 発現細胞の分離・回収ならびに特性評価に関する検討を行った。

また iPS 細胞は、三次元凝集塊を形成することで生体内の環境を模倣できるため、効率的な分化が期待できる。この時、形成させる凝集塊の大きさによって、酸素・栄養素の供給や代謝老廃物の蓄積、また増殖因子を使用する場合は増殖因子の供給といった、培養環境が大きく異なる。これらの培養環境の変化は、iPS 細胞の分化決定に大きく影響を及ぼすと考えられる。そこで本研究では、中空糸培養における中空糸径を変えることで凝集塊の大きさを制御し、iPS 細胞の分化決定に及ぼす影響を検討した。

1.2　本研究のオリジナリティ

本研究のオリジナリティを以下に示す。

［1］ヒト iPS 細胞の中空糸内部での自発的分化過程における CXCR4 発現細胞の解析

中空糸培養法を用いてヒト iPS 細胞の培養を行った。ヒト iPS 細胞は中空糸内で良好に増殖し、播種密度の約 10 倍である約 6.3×10^{8}cells/cm^{3} の高密度培養が達成された。また、自発的分化過程における CXCR4 発現細胞の発現解析を行ったところ、ピーク時において約 30%を示した。これは同じ培養条件下の単層培養と比較して約 2 倍の発現量であり、高密度条件化にもかかわらず従来法である単層培養と比較して高効率での分化誘導の可能性が示された。

［2］培養過程における CXCR4 発現細胞の分離・回収ならびに特性評価に関する検討

自発的分化過程における中空糸内の CXCR4 発現細胞の存在割合のピーク時において、CXCR4 発現細胞の分離・回収を試みた。CXCR4 陽性細胞と CXCR4 陰性細胞の *CXCR4* 遺伝子発現量の比較により、CXCR4 陽性細胞での発現が約 3.7 倍高いことが示された。この結果、分化誘導過程における特異的細胞集団の分離取得の可能性が示された。

［3］ヒト iPS 細胞の分化決定における中空糸径の影響

2 種類の内径の異なる中空糸を用いて、自発的分化培養を行ったところ、φ366μm では内胚葉・中胚葉へ、φ145μm では外胚葉へ分化しやすい傾向を見出した。この結果、中空糸の内径が内部で形成されるヒト iPS 細胞凝集塊の分化傾向に影響を及ぼすことが示唆された。

1.3　本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景を示した。さらに本研究の目的、および目的達成のために解決すべき課題に取り組む方針を示した。また、本研究のオリジナリティについて示した。

第 2 章では、本研究に関連した分野の既往の研究を概説した。まず肝再生医療に関する既往の研究について示した。次に、肝再生医療の細胞源となり得る細胞について示した。さらに、多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導の既往の研究について示した。最後に多能性幹細胞の大量培養法についての既往の研究について示した。

第 3 章では、中空糸培養法を用いてヒト iPS 細胞から肝細胞への自発的分化誘導過程における内胚葉系細胞の分離取得を行った。分離取得のためのマーカーとして CXCR4 を選択し、培養過程における CXCR4 の発現の推移を評価するとともに、磁気細胞分離を用いた CXCR4 発現細胞の分離取得を行った。また分離取得した CXCR4 発現細胞をさらに培養し、その特性を評価した。

第 4 章では、内径の異なる 2 種類の中空糸を用いてヒト iPS 細胞の自発的な分化培養を行い、中空糸径による分化傾向の違いを示した。さらに、中空糸径による分化傾向の違いを利用して、ヒト iPS 細胞の肝分化培養を行った。

第 5 章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の成果を基に今後の課題と展望について述べた。

第2章 既往の研究

2.1　肝臓について

2.1.1　　肝臓の構造

肝臓は成人では体重の約 50 分の 1 にあたる 800～1400g の重量を持つ人間の体内で脳に次いで二番目に大きな臓器である。肝臓への血流には、主に栄養を運ぶ役割を持つ門脈と、酸素を運ぶ肝動脈があり、約 70～80%が門脈から、残りが肝動脈から供給され、肝静脈に集まって心臓に戻る。肝臓を詳しく見ると細かい網の目状の模様があり、その一つ一つが肝小葉と呼ばれている。肝臓は約 50 万個の肝小葉から構成され、一つの肝小葉は 50 万個の肝細胞から構成されている。小腸で吸収された栄養などの各種成分は門脈を通って肝小葉に達する。ここでは一本の毛細血管が各々一層の肝細胞と接する形となっており、肝細胞は血管と良好な物質交換が行える合理的な構造になっている[2,3]。また、肝細胞は周囲の細胞外マトリックスにより多面体の構造を維持しており，隣接する肝細胞同士は様々な細胞間結合を介して情報交換を行い、機能を発現している。さらに各肝非実質細胞と相互に影響し合い肝臓の臓器としての機能を果たしている。肝臓はまさに究極のバイオリアクターとでもいうべき精巧な構造を有しており、$1\sim2\times10^8$cells/cm^3 もの高細胞密度状態が可能である。

肝臓は肝細胞のほか、血管・リンパ管・胆管、それに支持組織の結合織より構成されている。肝臓を構成する細胞は約 7 割を肝細胞が占めている。残り 3 割は肝非実質細胞であり、クッパー（Kupffer）細胞、類洞内皮細胞、腸管上皮細胞、繊維芽細胞などから構成されている。これら肝非実質細胞はそれぞれ特有な機能をもっているが、肝臓の代表的機能は肝細胞によって行われている[4-6]。

2.1.2　　肝臓の機能 [7,8]

肝臓の機能は多岐にわたり、細かいものまでいれるとその機能数は 500 種類以上にものぼり、生体内の化学工場にも例えられている。肝臓の機能には代謝・解毒・排泄・循環調節機能に大別される。Table.2.1 に肝臓の機能を示した。

代謝機能としては主に、糖質、脂質、アミノ酸・蛋白質といった物質の代謝が含まれる。糖質代謝は、血液中のグルコースをグリコーゲンに作り変えて肝臓に貯蔵し、必要時にグルコースに分解して血液中に送り出し、血糖濃度を調節する。脂質代謝は、脂肪の分解物である脂肪酸などからコレステロールとリン脂質を合成する。蛋白質代謝は、アミノ酸から血漿蛋白を合成する。そのほか、ビタミンの貯蔵・活性化やホルモンの代謝も行う。

解毒機能は、生体内に存在する有害な物質を体外へ廃棄する前に処理することである。有害な物質は、様々な薬物代謝系で処理されるが、脂溶性の物質は水に溶けにくいため、排泄されるためにまず肝臓において親水性を高めることで、血液で腎臓に運ばれ排泄され

る。肝臓で無毒化される機構には、異物の酸化（水酸化）や還元反応があり、これには多くの酵素が関与する。また、体内のタンパク質分解で生じたアミノ酸やアンモニアは肝臓で尿素に変換され、尿中に排泄される。

排泄機能は、胆汁を生成し、これを腸管に送る機能である。腸肝循環する物質は二つに分けることができ、胆汁酸とビリルビン（胆汁色素）である。これは、腸管から吸収され、門脈血に入って肝臓に達し、再び胆汁中に排泄され、腸肝の間を循環するものである。その場合、胆汁酸の循環が意味するものは再利用である。胆汁酸は脂質ないしコレステロールの代謝には不可欠である。腸内に排出されたビリルビンは、腸内の消化に役立つ一方で細菌酵素によってウロビリノーゲンになり、その一部は再吸収されて腎臓から尿中へ排出されるが、一部は褐色のステルコビリンとなって糞便を着色する。

循環調節機能は造血に関与する他、血液凝固に必要な因子を生成し、放出も行う。また、肝臓は非常に大きな臓器であることから、血液の循環調節の機能も果たしている。

以上のような肝臓の多彩な機能は、反面、肝臓を各種の内因性および外因性物質の標的臓器として位置づけるため、肝臓は各種の中毒性因子による傷害を受けやすい。例えばある種の化学物質は、肝細胞において親水性物質に代謝されるが、その代謝過程において生成された中間物質は肝細胞の構成成分と反応性に富んでいる。また、肝細胞内のウイルスは、肝細胞膜を介して血漿中の抗体と反応し、細胞膜の傷害をきたすことも知られている。

Table.2.1 The liver function

Metabolic function	Substance metabolism Glucose uptake Glycolytic oxidation of glucose Generation of glycogen Metabolism of galactose and fructose
	Lipid metabolism Synthesis of lipoproteins and their release into the blood Synthesis of cholesterol and phospholipids Uptake and degradation of fatty acids Synthesis and release of LCAT
	Amino acid and protein metabolism Metabolism of amino acids Ammonia processing (urea circuit) Protein synthesis and degradation Synthesis and release of plasma proteins (ALB) Nucleic acid metabolism
	Metabolism of vitamins and hormones Inactivation and storage of vitamins Inactivation and breakdown of hormones
Detoxification function	Oxidation and hydroxylation of drugs by drug-metabolizing enzyme systems Glucuronide, glutathione and other conjugations Alcohol metabolism Ammonia processing Phagocytosis of Kupffer cells
Excretory function	Bile secretion Production and secretion of bile acids Secretion of cholesterol, phospholipids, bilirubin, etc. Secretion of detoxified drugs and other substances into bile

2.2　肝再生医療

2.2.1　　移植法

肝再生医療における移植法は、通常の肝移植とは異なり、体外で肝組織を構築してから患者の体内に移植する方法である。肝臓そのものを体外で作製し、供給出来るようになるのが理想であり、患者自身の細胞や組織から作ることが出来れば更に望ましいが、現在の技術では困難である。しかし、近い将来、肝臓のいくつかの機能を代替することのできる小組織を作製することは可能ではないかと考えられる。そういう観点から見ると 2 通りの方法が考えられる。以下に、肝再生医療における移植法を示す。

2.2.1.1　　再生肝組織移植

再生肝組織の作製には主に 2 つの方法が挙げられる。1 つ目は器官培養法である。1 つの肝臓を 100 や 200 に細分化し、1 つ 1 つの肝臓を 100g、200g に大きく育てて移植する方法である。組織または細胞の生理的機能を保った状態で培養液中に維持する技術だが、細胞塊がある程度大きくなると培養液に浸潤するだけでは栄養分や酸素が全細胞に届かなくなる。それらを供給するためには、血管系をその細胞塊に組み入れることが必須となる。

2 つ目は再構築肝組織である。これは培養皿上に、肝臓そのものではなく小肝組織を形成させ、それを集めて大きな細胞塊にした後に移植する方法である。しかし、細胞を培養皿上で増やそうとしても、2 次元的に増える細胞数には限界がある。また、3 次元的にも培養液の浸潤する厚みには限界があり、酸素や栄養素が枯渇してしまう。そこで、はじめから細胞外マトリックスや多孔質樹脂などの足場 (scaffold) の中で細胞を培養したり、組み込んだりすることで高密度である大きさを持った細胞塊を作製する試みがなされている。

2.2.1.2　　細胞移植

細胞移植には、主に肝細胞を用いた移植と幹細胞から分化させた肝細胞を用いた移植が挙げられる。肝細胞を用いた移植は、現在臨床にすぐに応用される可能性が高い肝再生医療であり、実際に臨床に使われその有効性が試されている。また、幹細胞から分化させた肝細胞を用いた移植では、ES 細胞や iPS 細胞から肝細胞に分化させ、その分化した細胞を直接移植することを目標としている。近年根治治療である生体肝移植までの橋渡しとして、先天性尿素サイクル異常症を発症した生後 6 日の新生児に対するヒト ES 細胞由来肝細胞の移植が行われ、5 ヶ月後に生体肝移植が実施された[9]。しかし、肝分化誘導を行い培養皿上のそれらの細胞が全て肝細胞に分化することは今のところ難しく、肝分化効率が 100%の分化誘導法を確立したとしても、構成細胞から組織を再構築する方法を確立させる必要がある。

2.2.2　ハイブリッド型人工肝臓システム

ハイブリッド型人工肝臓システムとは、患者の体外から肝機能補助を行う人工肝臓である。複雑な構造や多機能を有する肝臓を人工物で完全に置き換えるのは大変困難であるが、急性肝不全患者の自己肝再生までの機能代替や、肝移植までの橋渡し（ブリッジユース）として十分に性能を持つと考えられており、その装置の開発が行われている。ホローファイバー型やラジアルフロー型などがあり、高密度で肝細胞を充填でき、血漿と細胞が効率良く接触できる装置が要求される。肝機能を保った肝細胞をいかに多く充填できるかが問題で、マイクロキャリアーに細胞を付着させたり、肝機能を長時間維持させるために細胞外基質をコートしたりコラーゲンゲルの中に包埋したり、スフェロイドを形成させ多孔質のキャリアーの中に詰めたり、様々な方法で長時間の灌流に耐えられる工夫が考えられている。本研究室でもハイブリッド型人工肝臓システムの開発に取り組んでいる。

2.3　肝再生医療に用いる細胞源候補

ヒト臨床に使用する肝細胞の条件として、肝臓の多才な機能を高く保持していること、大量供給が可能であること、ヒトの血漿に接触して安全であること、患者に無害であることが要求される。これらの条件を考慮した場合、肝再生医療に最も適した細胞は正常ヒト初代肝細胞である。しかし、必要とされる大量の初代ヒト肝細胞の入手の困難さや、ヒト細胞の利用に対する倫理的な問題が懸念される。さらに、培養技術の進歩により培養条件が改善されてきた現在においても、正常ヒト初代肝細胞をその肝特異的機能を維持しつつ長期間安定に継代培養あるいは増殖させ得たという報告はない。すなわち上述の全てを満たす肝細胞源は今のところ存在しない。肝再生医療に用いることが考えられる細胞源を以下に示す。

2.3.1　ヒト初代肝細胞

ヒト初代肝細胞は、肝臓本来の多才な機能を保持しており、初代ブタ肝細胞使用時に懸念された異種ウイルスや異種免疫の問題もなく、さらにヒト由来タンパク質を供給可能であることなどから、人工肝臓に使用する肝細胞源としては最も理想的な機能を備えている。ヒト初代肝細胞は、肝移植に使用されなかった肝臓、または部分肝切除した肝組織片の正常部位から調製されるが、そのような肝臓や肝組織片の供給量は限られており十分な細胞量が得られないことが長年の問題であり、細胞源候補の有力候補とはなっていない[(10)]。

2.3.2　ヒト株化肝細胞

ヒト株化肝細胞は、ヒト肝ガン、またはヒト正常細胞への遺伝子導入によって樹立され、各国の Cell Bank などに保存されている。ヒト由来であることから上述の異種の問題、すな

わち異種ウイルスと異種免疫の問題は回避可能であり、また、無限増殖能を持ち凍結保存が可能であることから細胞の大量供給も可能である。ヒト肝細胞株の 1 つである C3A は、高いタンパク合成能を持つと言われる Hep G2 から、接触阻害の強い細胞をクローニングして樹立された細胞株である。HepG2 は、小児期に生じる転移性のないガン（肝芽種）由来の細胞株であり、HBV（B 型肝炎ウイルス）、HCV（C 型肝炎ウイルス）、HIV（ヒト免疫不全ウィルス）の感染が無いことが確認されている。また、国内でも肝ガン由来の Huh-7 という高分化型細胞株が樹立されており、タンパク合成や肝特異的酵素活性など多くの肝機能を有していることが報告されている[11]。

ヒト株化肝細胞を用いることの問題点は、これらガン細胞が生体内に転移してガンを発症する可能性、またはガン細胞が特異的に産生する因子が生体に悪影響を及ぼす危険性を無視できない点である。さらに、株化して無限増殖能を得る代わりに、正常の肝細胞の機能が一部喪失していることや、例え機能発現レベルが良好に維持されている場合においても初代肝細胞の 1/5 程度であることが問題とされている[12]。

2.3.3　ヒト不死化肝細胞

肝細胞を不死化することで初代肝細胞の欠点である脆弱な増殖性を克服する目的より、SV40T やリポフェクション法により不死遺伝子を導入する研究が行われている[13-17]。また、Okitsu らは TTNT-16 と呼ばれる不死可ヒト肝細胞株を樹立した[18]。これらの細胞には潜在的な腫瘍化の懸念があるが、最近では安全性の追求のため Cre/loxP 原理を用いて導入したがん遺伝子を取り除く技術や HSVTK のような自殺遺伝子を導入する技術が開発されている[19]。 しかし、メチル化により自殺遺伝子の転写が阻止される場合があること、Cre/loxP 組み換えにより DNA が損傷を受ける可能性があることなど、長期的な安全性の検討が不可欠となっている。

2.3.4　Stem Cells

2.3.4.1　肝幹細胞（Oval 細胞）

成体肝臓において、Oval 細胞は肝重量の 0.3-0.7%を占める[20]。成体肝臓が損傷し、正常な肝細胞増殖が妨げられるほど深刻な状況に陥ったとき、Oval 細胞は肝臓の門脈周囲領域に位置するヘリング管から現れ、肝再生に直接関与することが分かっている[21]。Oval 細胞の表現型は胎児肝芽細胞と類似しており Bipotent な性質を示す[22-24]。さらに、この細胞は *Ov-6*, *Thy-1*, *CD34*, *c-kit*, *Sca-1* のような肝幹細胞や造血マーカーの発現も示す[25, 26]。肝芽細胞に類似しているので、Oval 細胞は肝再生に関して重要な性質を持つと考えられている。また、Oval 細胞は SP 細胞としての表現型を示すことも報告されている[27]。炎症，慢性肝壊死，慢性アルコール性肝硬変による慢性肝障害で Oval 細胞が活性化されることが報告されており、肝再生時に何らかの役割を果たしていると考えられる[28]。

2.3.4.2　肝芽細胞

ヒト肝臓の発生中、細胞分化は細胞シグナルのカスケードを通して調整されている。肝前駆細胞は初期の胎児肝芽で見られ、肝芽細胞と呼ばれ、胎児肝重量の～0.1%を占め、肝幹細胞とは異なる特徴を有する[20]。肝芽細胞は *AFP*, *ALB*, *CK19*, *Dlk*, *Epcam* の発現により特徴付けられ[29, 30]、Bipotent な性質を示し、肝細胞と胆管細胞に分化する[20,31]。

2.3.4.3　ES 細胞

ES 細胞（Embryonic Stem cells：胚性幹細胞）は、受精卵から胎児へと発生する過程の初期段階（胚盤胞期）にある胚から単離した内部細胞塊を培養することによって得られる幹細胞であり、理論上、生体を構成するすべての種類の細胞に分化できるという性質（全能性）を有している。

Evans らにより 1981 年にマウス ES 細胞が樹立されて以来[32]、マウス以外の哺乳動物から ES 細胞を樹立することは困難とされていたが、1998 年に米国ウイスコンシン大学の Thomson らがヒト胚性幹細胞の樹立に世界で始めて成功した[33]。ES 細胞は多能性・未分化状態を保ちつつ、ほぼ無限に増殖可能であり、ノックアウトマウス作製、分化誘導、遺伝子導入など様々な実験の素材としても有用であり、基礎医学研究等の分野では広く利用されている。また、多能性を有する ES 細胞は再生医療などへの応用も期待されており、現在多くの研究機関がヒト ES 細胞に関する研究を行なっている。しかしながら、ES 細胞について未解明な部分も多く、ES 細胞をそのまま生体に移植すると、ガン化してテラトーマやテラトカルシノーマなどの腫瘍を形成してしまう等の問題がある。また、ES 細胞の樹立には受精卵が必要とされることから、ヒトへの応用について倫理的及び法律的な問題が議論されることもあり、その応用には更なる研究が必要であると思われる。

2.3.4.4　iPS 細胞

2006 年、京都大学の Yamanaka らにより、ES 細胞同様に、分化多能性を維持したまま長期培養が可能であり、基礎生物学から再生医学に至るまで、幅広い研究領域において革新的な発展を遂げる可能性を秘めた iPS 細胞（induced Pluripotent Stem cells：人工多能性幹細胞）が樹立され、大きな注目を集めている[1]。マウス iPS 細胞樹立後、ヒト体細胞からも iPS 細胞が樹立された[34]。さらに、ニューロン[35]、造血細胞[36]、心筋細胞[37]などの機能細胞からも iPS 細胞の樹立が報告された。もっとも初期の iPS 細胞樹立法はウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う方法であり、ウイルスベクター使用の危険性や導入遺伝子の異常によるガン化が問題視された。しかし、その後プラスミドベクターを用いた iPS 作製法[38]が報告され、さらにタンパク質のみでの iPS 作製法も報告[39]され、現在では、より安全な iPS 細胞を作製することが可能になっている。

生物を構成する種々の細胞に分化し得る分化多能性は、胚盤胞期の胚の一部である内部細胞塊や、そこから樹立された ES 細胞のような特殊な培養細胞のみに見られる能力であっ

たが、iPS 細胞の樹立法発見により、ES 細胞を使用せずに分化多能性細胞の培養が可能となった。分化多能性を持った細胞は理論上、体を構成する全ての組織や臓器に分化誘導することが可能であり、ヒトの患者自身から樹立した iPS 細胞を細胞源として使用することができれば、拒絶反応の無い移植用組織や臓器の作製が可能になると期待されている。ヒト ES 細胞の使用における“ES 細胞樹立時に受精卵を破壊しなければ ES 細胞を得ることができない”という生命倫理的問題の抜本的解決に繋がることから、再生医学の更なる発展に向けて注目が集まっている。iPS細胞の基礎医学・創薬への応用は、近い将来実現すると考えられており、難病患者由来の iPS 細胞樹立や薬剤評価の研究発表が今後相次ぐと考えられる。

2.4　多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導に関する既往の研究

ES 細胞や iPS 細胞は分化多能性を有する細胞であるため、*in vitro* においては様々な系譜へと自発的に分化する。このため、これらの多能性幹細胞を用いた研究においては目的細胞へと分化誘導させる手法の開発が必要不可欠となる。本研究では目的細胞として成熟肝細胞への分化誘導手法の開発を目指しているが、内胚葉由来の細胞は発生段階の後期に出現し、生体内の微小環境からの複雑かつ時系列の整った条件で分化が進むため、*in vitro* において外的因子なくしては分化誘導法の開発は困難である。また同様の理由で、全ての細胞を目的細胞へと分化誘導させる分化誘導法は未だ報告はないが、肝再生医療の細胞源としてのみならず、再生医療の分野においてその実用化を考えると目的細胞を大量かつ効率的に誘導することが望まれる。そこで、多能性幹細胞から特定の細胞へ分化させるためにこれまでに様々な培養条件の検討がなされている。1）分化誘導因子の添加、2）転写因子の強制発現、3）目的細胞に発現する抗原に対する抗体を用い、セルソーターにて純化する方法、4）細胞特異的プロモーターに GFP 等の蛍光タンパクを発現させ、蛍光を発する細胞のみを選別する方法、5）細胞特異的プロモーターに薬剤耐性遺伝子をコードする遺伝子を導入し、薬剤耐性を示す細胞を選別する方法等が挙げられる。

現在は液性因子である分化誘導因子の添加条件を検討することによって肝細胞への分化過程を模倣し、効率的に肝細胞へと誘導を調節する試みが主流である。マウス ES 細胞から内胚葉への分化誘導が報告されて以来[40, 41]、ES 細胞から HLC への分化誘導に関する多くの研究がなされている。マウス ES 細胞は胚様体（Embryoid body; EB）と呼ばれる球状の凝集塊を形成させることで自発的に分化を開始する[42]。多くの研究において、まず数日間の培養で EB を形成させた後、様々なマトリックスをコートした培養 dish へ播種するとともに分化誘導因子を添加するという手法が用いられている[43-48]。胚の発生過程における肝芽細胞の形成期において、横中隔に入り込んだ肝芽細胞は周りの間充織との相互作用により

活発に増殖し、肝原基は急速に増大する。このように、肝芽細胞は増殖し、コラーゲンを含む疎性結合組織で構成される横中隔間充識へと移動することから、ES 細胞の肝分化誘導における培養基質としてコラーゲンが主に用いられる。また、分化誘導因子は、主に胚発生を模倣した形で選択される。肝芽細胞の誘導機構において、心臓中胚葉から分泌されるシグナル分子は繊維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor; FGF）であることが明らかとなっており、特に内胚葉に面する部位に発現する FGF8、さらに引き続いて FGF1、FGF2 などが *ALB* 遺伝子、*AFP* 遺伝子の発現に重要である[49-52]。また横中隔間充織からの骨形成因子（Bone morphogenetic protein; BMP）により、肝が細胞周辺組織の影響を大きく受けることも明らかになっている[49, 51, 52]。また、肝臓の形成において分化誘導、形態形成など多彩な作用を発揮する肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor; HGF）や肝芽細胞の培養時、アルブミン分泌能の維持・肝特異的酵素の発現に有効な Oncostatin M、Dexamathason などの因子も重要となる[53, 54]。また、Kubo らは Activin A を用いて内胚葉の分画への効果的な分化誘導に成功しており[55]、また、Cheng らは Activin A、BMP4、bFGF、VEGF を用いてヒト ES 細胞ヒト iPS 細胞といったヒト多能性幹細胞から内胚葉前駆細胞への高効率な分化誘導に成功している[56]。他にも、これら分化誘導因子の添加濃度、添加時期の組み合わせにより効果的な肝細胞への分化誘導が報告されている。

また分化誘導因子の添加のみならず、Ishizaka らは ES 細胞に *HNF-3β*（Hepatocyte Neuclear Factor-3β）遺伝子を導入し、転写因子を強制発現させる手法を試みている[57]。Takayama らはヒト ES 細胞及びヒト iPS 細胞に *SOX17*、*HEX*、*HNF-4α* を段階的に導入することで効率的な肝分化誘導を報告しており[58]、導入する遺伝子の組み合わせが *FOXA2* と HNF-1α でも効率的な肝分化誘導が可能であることを示している[59]。

マウスのみならずヒト ES 細胞を用いた分化誘導に関する報告もされている。Shirahashi らは EB を形成させ Type I Collagen 上に播種し、Insulin と Dexamathason を添加することで内胚葉への分化を確認している[48]。また、Rambhatla らはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である酪酸ナトリウム（Sodium Butyrate; SB）を用いて肝細胞への分化誘導に成功している[60]。Basma らは EB を介して肝細胞様細胞を生み出し、成熟肝細胞特異的細胞表面抗原であるアシアロ糖タンパクレセプター（ASGPR）に関して蛍光活性化細胞選別（FACS）を用いてこれらの集団を純化し、結果的に得られるこれらの細胞は肝細胞に匹敵する様々な肝細胞の機能を示す[61]。

また、直接分化は細胞内シグナルと細胞外シグナルを利用し、ヒト発生を模倣しヒト ES 細胞を特定の系譜に分化させるために細胞外シグナルが利用される。近年、Hay らによって胚体内胚葉や肝臓内胚葉を誘導すると知られている成長因子を利用した *in vitro* での直接分化モデルが開発された[62]。この研究では分化への生理的要素の必要性と、結果として性

能と機能の向上を実証し、Wnt3a が *in vivo* でのヒト肝臓発生の臨界期で発現し、発生において Wnt シグナルが重要な役割を果たしているということを示した[62]。いわば発生中の胚での事象を模倣するために作られた Wnt3a シグナルへのヒト ES 細胞の暴露は、比較的均一な幹細胞分化（-90%）をもたらし、*in vitro* と *in vivo* での機能を向上させた[63]。しかし、全ての主要な肝機能を示すヒト ES 細胞由来肝細胞の作製には課題が残っている。例えば、現状では成熟肝細胞を評価する明確な判断基準がなく、分化誘導後の ES 細胞由来肝細胞の評価法が非常に重要であることである。現在のところ、主に内胚葉及び肝特異的遺伝子発現、肝特異的機能発現、肝細胞特異的な形態の評価、そして *in vivo* における ES 細胞由来肝細胞の評価およびテラトーマ形成の有無に関する評価が行われている。しかし、以下の点に注意する必要がある。

［1］　肝組織と卵黄嚢において大部分の遺伝子発現が同様の発現を見せており、ES 細胞由来肝細胞のマーカーとして評価されてきた *AFP*、*TTR* なども含まれる[64-67]。

［2］　卵黄嚢以外でも肺、腸、膵臓、腎臓でも肝細胞と類似した遺伝子発現が見られており、例えば代謝酵素である *TAT* や *PEPCK* は肝以外にも発現しており、また内胚葉のマーカーとして用いられてきた *HNF-3β* や *HNF-4α* も中胚葉、外胚葉においてその発現が認められている。

［3］　また肝の発生の段階においてはそれぞれの段階でその遺伝子発現が異なっており、どの遺伝子発現を評価したかによって成熟、未熟の判断が必要となる。*ALB*、*TTR* の遺伝子は全ての段階で発現しておりどの段階まで成熟化しているかを判断することはできない。一方、*AFP* は初期で高発現し成熟肝ではその発現が見られなくなる。その他にも胎児肝では *ALB*、*AFP*、*CYP3A7* などの遺伝子発現は成熟肝よりも高い遺伝子発現を見せており、逆に *PxR*、*CAR*、*CYP3A4*、*CYP1A2*、*CYP2B6*、*UGT1A1* などは胎児肝では低く、成熟肝では高発現を見せる。また代謝酵素、解毒酵素の多くは胎児期で発現してはいるものの発生後に機能する。アンモニア代謝は胎児期の細胞には見られない活性であり、この他にも肝特異的機能として薬物代謝能である *CYP3A4*、*CYP1A2* の活性やビリルビン結合の評価も重要である。

以上のように、成熟肝細胞を評価する判断基準が明確ではないのが現状である。Asahina らは成熟肝のみに発現する遺伝子のひとつとして *CYP7A1* に着目しこの発現を成熟肝への分化誘導の指標としているが[21]、その遺伝子発現のみを評価するだけではやはり不十分である。今後、ES 細胞由来肝細胞の成熟化に関する評価を行うにあたって、*in vitro* における幹細胞由来肝細胞と成熟肝細胞との遺伝子発現の比較、代謝能についての評価および実際のタンパク発現など多角的な評価を行う必要がある。

2.5　多能性幹細胞の大量培養法に関する既往の研究

現在、ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞の培養法としては、ディッシュ上での培養法が一般的である。しかし、この培養法ではディッシュあたりで得られる細胞数が限られており、また、大量の細胞を培養する場合、操作が煩雑になり回収に手間がかかるため、肝再生医療や人工臓器等に応用する際には新たな培養法を開発する必要性がある。

近年では、浮遊攪拌培養やそれを応用した大量培養に関する検討が多くされている。Kallos らはスピナーフラスコを用いて播種密度及び撹拌速度の条件を変えてマウス ES 細胞の大量培養を検討した結果、撹拌培養 5 日間で総細胞数は約 30 倍に増殖し、最大到達密度は約 10^6 cells/mL、撹拌培養 4 日目には 99% 以上が未分化マーカーである *Oct-3/4*、*Nanog*、SSEA-1 を発現したのを確認した。その後分化培養を行い、初期分化マーカーも確認している[68]。また Krawetz らはスピナーフラスコを用いてヒト ES 細胞の大量培養に関する検討を報告している。6 日毎に継代を行い 20 日間培養しており、培養 20 日目に得られた細胞は正常核型を有しており、*OCT-3/4*、*NANOG*、SSEA-4 等の未分化マーカーの発現を維持しており、テラトーマ形成能も有していた[69]。Amit らは三角フラスコを用いてヒト ES 細胞及びヒト iPS 細胞の攪拌培養を行っている[70]。IL6RIL6 キメラ（interleukin-6 receptor fused to interleukin-6）と塩基性線維芽細胞増殖因子である bFGF を添加した培地を用いたヒト ES 細胞の大量培養では、20 回継代した後も安定した核型と多能性を有していた。それはヒト iPS 細胞に置き換えても同様の結果が得られた。しかしながら、凝集塊内部に壊死層が生じる等の問題点も明らかとなっている上に、最大到達細胞密度は約 1.4×10^4 cells/mL であり必ずしも高いとは言い難い。Serra らはマイクロキャリアーとマイクロカプセルを組み合わせた培養法を報告しており、マイクロキャリアーに固定化したヒト ES 細胞をさらにアルギン酸カプセルで包埋し、攪拌培養を行っている[71]。この培養法では、カプセル内で増殖した細胞はカプセルごと凍結が可能であり、解凍直後の細胞の生存率はほぼ 100%であり、培養 1 日目の生存率も 70%以上であるなど、ヒト多能性肝細胞保存時の凍結ダメージに関する問題も克服している。しかし、培養形態がやや複雑であるため、細胞回収が煩雑であるという問題点もある。

我々の研究では、中空糸を用いたヒト iPS 細胞の培養を検討しているが、中空糸バイオリアクターを用いた大量培養に関する検討も報告されている。Paccola らは、直径 200μm の中空糸 11500 本（総表面積 2100cm^2）を用いて中空糸表面にヒト iPS 細胞を接着させることで大量培養を目指している[72]。Laminin 521 をコートした中空糸表面上において、7 日間の培養期間を通してヒト iPS 細胞は最大 14 倍の増幅率を示し、*OCT-3/4*、*NANOG*、SSEA-4、TRA1-60 等の未分化マーカーの発現を維持していた。中空糸外部空間を利用しているため培養経過とともにスフェロイド粒径が大きくなり中心部に壊死層が生じるため、改善すべき点も多いと思われる。

第3章　ヒト iPS 細胞の内胚葉前駆細胞への分化誘導とその特性評価

3.1　本章の目的及び概要

再生医療の実現には細胞源の確保が最重要課題であり、特に肝臓のような大きな臓器をターゲットにした場合には大量のヒト細胞が必要である。本研究では、細胞源の候補として多能性幹細胞である iPS 細胞に着目した。これまで多くの研究において iPS 細胞から様々な機能性細胞への分化が報告されているが、iPS 細胞を細胞源として利用するためには、目的細胞への分化誘導法の確立とその目的細胞本来の機能を発現・維持できる培養技術の確立が必要である。

一般的な培養法はディッシュを用いた単層培養法であるが、ディッシュあたりで得られる細胞数が限られており、また、大量の細胞を培養する場合、操作が煩雑になり回収に手間がかかるのが問題である。そこで、Oh らは通常の継代法を改良し、よりマウス ES 細胞の培養環境を改善するため、酸素透過性の高い膜上を用い、かつ培養培地を灌流させて培養を行い未分化 ES 細胞の高密度培養を達成している[73]。しかし、培養形態としてはディッシュを用いた単層培養であるため現状の培養法と比較して 2 倍程度の細胞密度に留まっており、回収、スケールアップも容易ではないため、大量培養に適した培養系であるとは言い難い。

そのため大量培養の成功にはスケールアップが容易である次元培養法の確立が望まれている。例えば、胚様体（Embryoid body; EB）を形成することにより高効率に心筋細胞への分化誘導を確認した研究が報告されている[74, 75]。本培養法では EB 浮遊のために攪拌操作を行うことが多く、攪拌条件によってはせん断応力による細胞損傷が生じてしまう。また本培養法では形成される EB の粒径を制御することができない。そのため、EB の粒径が一定値を超えると中心部に酸素や栄養の枯渇が生じ、その結果増殖停止や細胞死が引き起こされる可能性がある。

そこで本研究では、新たな三次元培養法として中空糸培養法に着目し検討を行うこととした。中空糸培養法は血漿分離用中空糸内部を培養空間として細胞を充填し、細胞凝集塊として培養を行う手法である。本培養法では凝集塊直径は中空糸の内径に依存する。これによって凝集塊直径を中空糸内径で制御しつつ、中空糸長さ方向へと凝集塊を成長させることが可能となる。従って、凝集塊全体に対して十分な物質供給を行いながら、細胞増殖が可能となる。当研究室でも中空糸培養法に関する複数の報告をしている。Mizumoto らは血漿分離用中空糸内部に初代肝細胞を播種し培養することで、単層培養では播種後数日で消失する肝機能を 5 ヶ月もの長期間にわたって維持することに成功している[76]。これは、従来の 2 次元的な培養方法とは異なり、より生体内での組織構造に類似した形態をとらせることで細胞本来の機能を発揮できることを実証したものである。この結果を受けて

Amimoto らは、本培養法をマウス ES 細胞に適用し肝分化誘導を行うことにより、肝細胞への分化を確認している[77]。

本章では、ヒト iPS 細胞に対し中空糸培養を適用し、内胚葉への分化誘導に関する検討を行った。まず、中空糸培養によるヒト iPS 細胞の自発的分化誘導を行い、中内胚葉マーカーである CXCR4 を指標として一般的な単層培養法と比較することで、本培養法を用いた自発的分化誘導法の有用性を評価した。さらに磁気細胞分離法により CXCR4 陽性細胞の分離を行い、*CXCR4* 陽性割合を評価した後に、分離前の細胞と分離後の CXCR4 陽性細胞の特性比較を行った。

3.2　中空糸培養法を用いたヒト iPS 細胞の内胚葉前駆細胞分化誘導

3.2.1　　本節の目的

本節では、中空糸培養法を用いてヒト iPS 細胞から内胚葉前駆細胞への分化誘導について検討するとともに、中内胚葉マーカーである CXCR4 を指標として、本培養法から得られたヒト iPS 細胞由来内胚葉前駆細胞の有用性を評価することを目的とした。

3.2.2　　実験方法

3.2.2.1　　ヒト iPS 細胞の継代培養

(1)　ヒト iPS 細胞

レトロウイルスベクターにより 4 因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を導入して樹立された 201B7 株（RIKEN CELL BANK : HPS0063）を使用した。

(2)　ヒト iPS 細胞の継代培養

ヒト iPS 細胞の培養基質として Geltrex LDEV-Free hESC-qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix（Life Technologies Japan; A1413301）でコートした培養皿上で継代培養を行った。培養 dish のコーティングのため、Geltrex LDEV-Free hESC-qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix を 4ºC の DMEM/F-12 HAM（SIGMA; D6421）で 100 倍希釈した後に使用した。使用量は 7 mL/100 mm dish、3 mL/60 mm dish であった。

継代用培養培地として、Essential 8™ medium に Essential 8 ™ supplement を添加した培地 (Life Technologies : A1517001)を使用した。使用量は 12 mL/100 mm dish、6 mL/60 mm dish であった。また、培養培地には ROCK Inhibitor である Y-27632 (和光純薬 : 257-00511)を 10μM となるように添加した。

培地を PBS(-)で数回洗い流した後、0.5mM EDTA/PBS(-)を dish に加え、37 ºC、5 % CO_2 で 3～4 分インキュベートした。0.5 mM EDTA/PBS (-)を除去し、dish 底面に新しい Essential

8™ medium を吹き付けるように流すことで、適当なコロニーの大きさで dish からはがし、回収した。翌日から Y-27632 を除いた Essential 8™ medium で毎日培地交換を行った。継代は iPS 細胞のコロニー状態を観察し、3～4 日に一度程度で継代を行った。

※ROCK Inhibitor の標的となる Rho-associated キナーゼ(ROCK)は、細胞質に存在するセリン-スレオニンキナーゼの一種であり、GTP 結合タンパク質 Rho などいくつかの低分子タンパク質の結合により活性化される。Rho シグナリングは、ミオシンフォスファターゼのリン酸化や LIM キナーゼのリン酸化を介して、細胞増殖、細胞分化、細胞質分裂、細胞運動性、細胞接着、および細胞骨格配の制御において重要な役割を果たしている。ヒト ES 細胞では単一分散状態において、この、ROCK 依存的にミオシンの過剰活性化が引き起こされ、この過剰活性化はブレンビングと呼ばれる細胞表面の突起を伴って、多能性幹細胞におけるアポトーシスをもたらす(78)。

(3)　ヒト iPS 細胞の解凍方法

Geltrex でコートした 100 mm dish を 1 時間以上 37ºC、5% CO_2 にてインキュベートし、クリーンベンチ内に準備し室温に戻した。凍結細胞が入ったクライオバイアルを素早く解凍した後、Essential 8™ medium を適量加えて凍結保存液を回収し、遠心洗浄を行った。遠心洗浄後、新しい Essential 8™ medium で再懸濁し、1 バイアル当たり 60mm dish 2 枚となるよう播種した。

(4)　ヒト iPS 細胞の凍結保存

継代時と同様の操作によって細胞をコロニーで回収したのち、10 % DMSO/ Essential 8™ medium で再懸濁し、クライオバイアルへ移し、液体窒素中に移し保存した。保存する際は、バイアル 1 本当たり 60 mm dish 1 枚となるように再懸濁を行った。

3.2.2.2　　中空糸培養

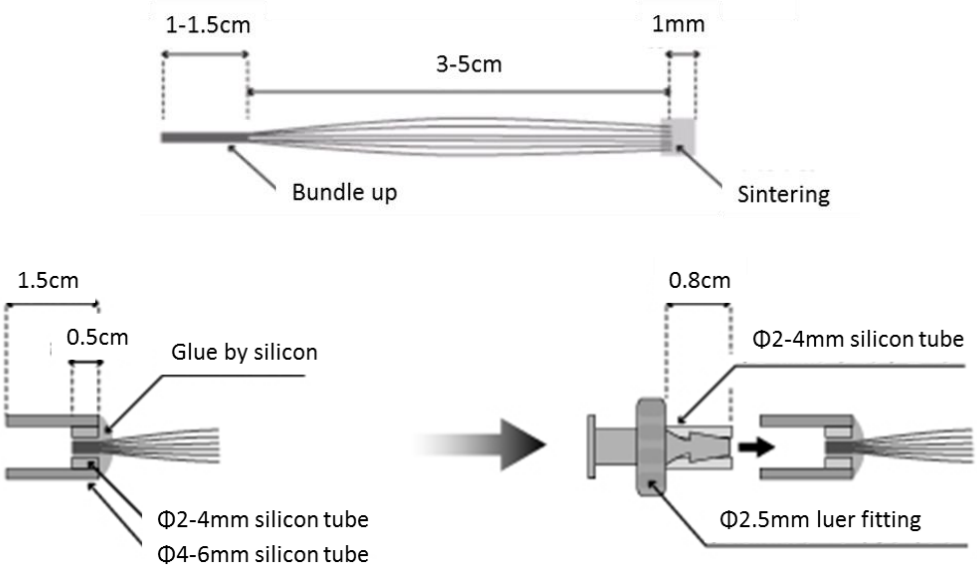
本検討では、ヒト iPS 細胞を培養する培養担体として血漿分離用中空糸（材質: poly ethylene treated with ethylene vinyl alcohol (PE-EVAL), 旭化成メディカル, 内径: 330 μm, 膜厚: 50 μm, 孔径: 0.3 μm）を使用した。本研究に使用した中空糸バンドルの作製方法及び細胞播種方法について以下に示す。

(1)　中空糸バンドルの作製

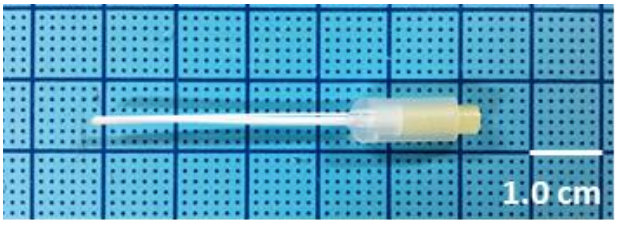
中空糸を約 7cm に切断し、6 本ずつにまとめ、半田ごてを用いて一端を閉じた。先端から 3cm の部分を 1cm に切断したϕ2-4mm のシリコンチューブ内に入れ、シリコンで固めた。

一晩乾燥させ、シリコンチューブごと中空糸を切断した。このとき、切断面に気泡がないことを確認した。ϕ2-4mm のシリコンチューブ上にϕ4-6mm のシリコンチューブを接続し、シリコンで固めて中空糸バンドルを作製した。中空糸開口面に対し、ϕ4-6 mm のシリコンチューブを介してメスルアーフィッティングを接続し、細胞播種口とした (Fig.3.1)。

中空糸バンドルは超純水に浸した状態で、121 ℃、20 分の条件でオートクレーブした。



(a) A schematic illustration of hollow fiber bundle making process



(b) Hollow fiber bundle

Fig. 3.1　A schematic illustration of hollow fiber bundle making process and fabricated hollow fiber bundle

(2)　播種方法

播種前に中空糸バンドル内の超純水は IMDM(SIGMA : I3390)によって置換した。

ヒト iPS 細胞のコロニーを分散状態にするために、細胞分散用酵素溶液である Accutase (Innovative Cell Technologies : AT104)を用いて細胞剥離を行い、Essential 8™ medium で 1.0×10^6cells/ml となるよう播種細胞懸濁液を調製した。

チューブのふたをゆるめ、ルアーフィッティング部分にたまっている気泡を抜いた後、1ml シリンジで 1ml 懸濁液を中空糸バンドル内に注入した。ヒト iPS 細胞を充填した中空糸バンドルに対して遠心播種した（200×g, 180 秒)。遠心後の中空糸バンドルをチューブバンドルユニットから取り外し、細胞数計測用の中空糸バンドルは先端部から 3 cm で切断し、半田ごてを用いて切断部を閉じた。細胞回収用の中空糸バンドルはϕ4-6 mm シリコンチューブにϕ4 mm、長さ 1 cm の栓をして閉じた。その後分化誘導培地が 6 mL 添加された 60 mm dish に中空糸バンドル 2 本を移し、37ºC, 5%CO_2 雰囲気下において 45 rpm で旋回培養を行った (Fig3.2)。

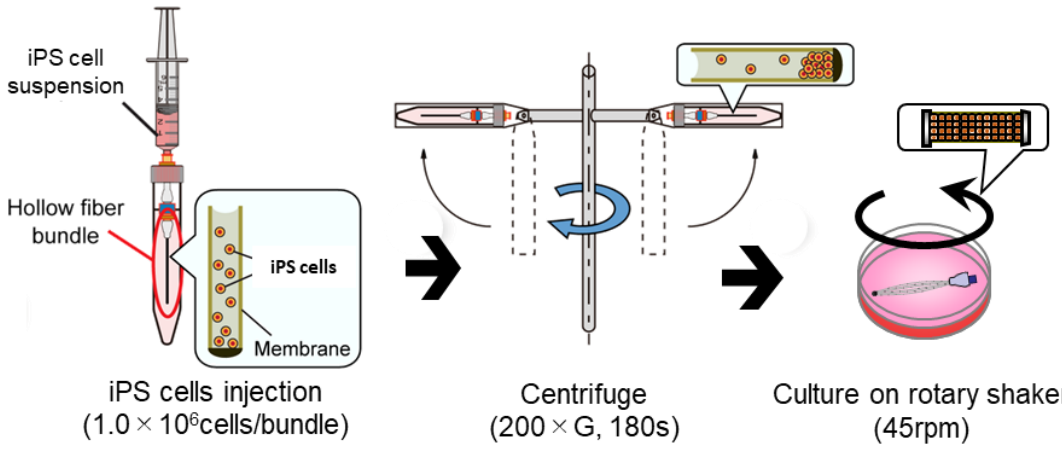


Fig.3.2 The method of expansion and differentiation of human iPS cells in a three-dimensional culture using hollow fibers.

(3)　培養条件

培養 7 日目までは細胞増殖を促すために未分化維持用培地である Essential 8™ medium を使用し、培養 7 日目から 17 日目までは Essential 8™ medium から未分化維持のための因子を抜いた分化用培地である Essential 6™ medium を用いて自発的分化培養を行った (Fig. 3.3)。播種前日から培養 1 日目まで 10μM Y-27632 を添加し、毎日培地交換を行った。

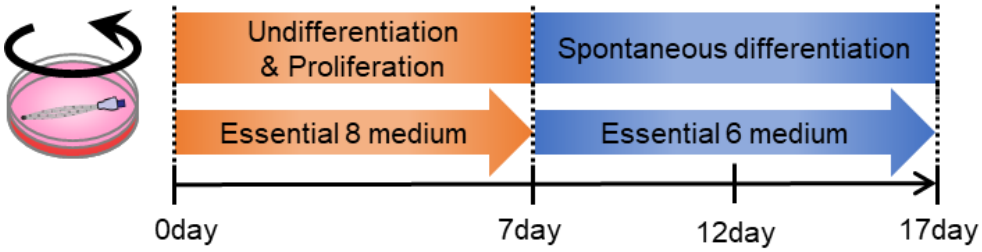


Fig. 3.3 The culture conditions of expansion and differentiation of human iPS cells.

3.2.3　評価方法

3.2.3.1　核数計数

核数計数には NucleoCounter™ (Chemometic)、NucleoCasset™ (Chemometic：941-0002)を用いた。サンプルカセット内部に、ヨウ化プロピディウム (PI)が封入されており、サンプルの吸引と同時に細胞核の染色が行われる。装置内では、緑色励起光により DNA 内の PI が赤色光を放出する。これを CCD カメラで測定する。

＜NucleoCounter™ による核数計測＞

培養終了後の中空糸バンドルをハサミで細切し、クライオチューブに入れた。21 mg/mL クエン酸溶液を適量加え、超音波ホモジナイザーによってホモジナイズし、細胞中より核を遊離させた。その後クエン酸溶液と等量の細胞処理試薬 Reagent B (Chemometic)を加えた。それぞれのサンプルを NucleoCasset™ で吸入し、NucleoCounter™ で測定を行った。
細胞には 2 核の細胞が存在するため、2 核の割合を 1.07 として換算した。

3.2.3.2　遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には Real-Time PCR 法を用いた。Real-Time PCR 法は、遺伝子発現解析の他に、SNPs タイピング、遺伝子組み換え食品の検査、ウイルスや病原菌の検出、導入遺伝子のコピー数の解析などさまざまな用途に応用されている。遺伝子発現解析のような定量解析のみならず、+/-判定だけの定性的な解析にもその威力を発揮する。さらに、Real-Time PCR は反応後に電気泳動で増幅産物の確認を行う必要がないので、簡便・迅速に結果が得られ、コンタミネーションのリスクが低く、広いダイナミックレンジで正確な定量が可能であるといった長所を持つ。近年、従来の PCR 法で行われていた遺伝子検査を Real-Time PCR で実施しようとする試みが盛んになされている。以下に詳細を示す。

[1] RNA の抽出

培養が終了した中空糸をハサミで細切し、2 mL サンプリングチューブに入れた。RNA の抽出には NucleoSpin RNA II（Nippon Genetics: 740955.20）を使用し、プロトコールに従って total RNA を抽出した。抽出後、RNA 濃度を求めた。吸光度 1 の場合の RNA 濃度が 40 μg/mL であることから、以下の式のよりサンプル濃度を求めた。

RNA 濃度 ＝A260 × 希釈率 × 40 μg/mL

[2] cDNA の合成

cDNA の合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems: 4368814）を使用した。定量した total RNA 濃度より、RNA を含むサンプル量を計算し、200ng/10μl となるようにサンプルを調整した。Table3.1 に示す割合で各試薬を混合し、Fig.3.4 に示す条件で cDNA の逆転写反応を行った。得られた cDNA サンプルを Real-Time PCR に使用し、余ったサンプルは-80ºC で保存した。

Table 3.1 Components of PCR reaction

Component	Concentration	
10×RT buffer	2.0	μL
10×random primer	0.8	μL
Multi Scribe Reverse Transcriptase	2.0	μL
Nuclease-free water	4.2	μL
RNA sample	10.0	μL
Total	20.0	μL

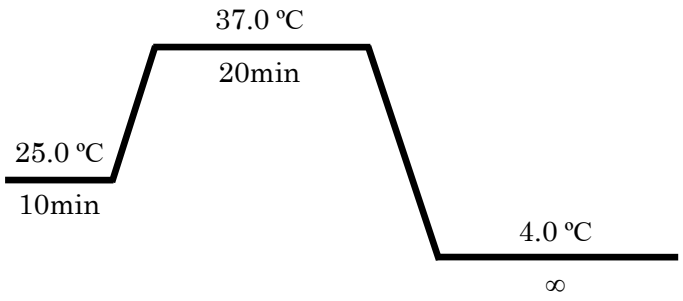


Fig. 3.4 Condition of PCR reaction

[3] Real-time PCR

Real-time PCR 反応には TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems: 4304437）を使用した。Table 3.2 に示す割合で各試薬を混合し、Fig. 3.5 に示す条件で Real-time PCR を行った。PCR 解析に用いた primer（Applied Biosystems）は Table 3.3 に示す。

Table 3.2 Components of Real-time PCR reaction

Component	Concentration	
TaqMan Universal Master Mix	12.50	μL
Gene Expression Assay (primer)	1.25	μL
Nuclease-free water	8.75	μL
cDNA sample	2.50	μL
Total	25.00	μL

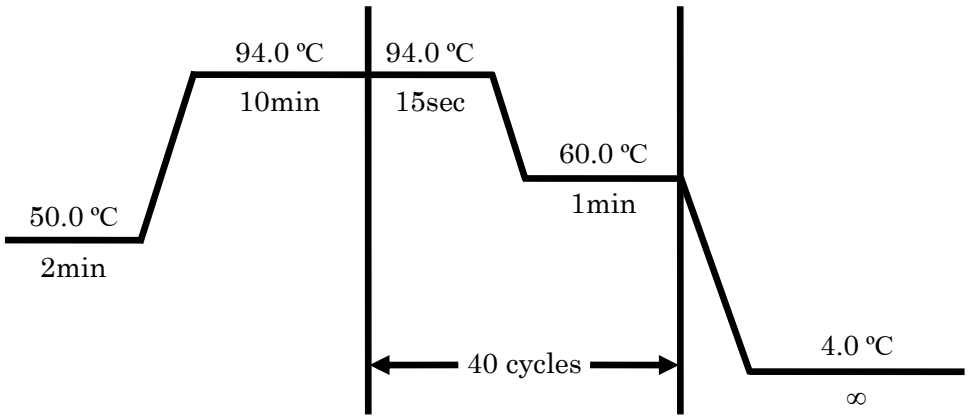


Fig. 3.5 Condition of Real-time PCR reaction

Table.3.3 Primers for Real-time PCR reaction

Gene Name
GAPDH
Oct-3/4
Nanog
SOX17
CXCR4
HNF-4α
TDO2（tryptophan 2,3- dioxygenase）
CPS-1（carbamoylphosphate synthetase）
ALB（albumin）

3.2.3.3　*CXCR4* 陽性細胞の定量評価

本実験に使用したセルファンクションアナライザー（Guava PCA; GE Healthcare）について説明する。Guava PCA には MicroLOCTM という独自のキャピラリー方式が採用されており、個々の細胞を迅速に解析することができる。検出器は高感度レーザー方式である。1 測定あたりの必要細胞数が従来のフローサイトメトリー方式の約 500 分の 1 である、廃液が従来法の約 1000 分の 1 である、シース液が不要である等の特徴をもつ。目的の細胞を蛍光標識したサンプルをキャピラリー内に通過させ、キャピラリーにレーザーを照射するこ

とで照射したレーザーの前方散乱光と、レーザーにより励起されたサンプルの蛍光により、それぞれ細胞の大きさと生物学的特徴を解析することができる。蛍光標識された細胞はレーザー光により励起され、特定波長の蛍光を発する。その蛍光を発する細胞数をカウントすることで目的細胞の割合を定量する。

操作手順を以下に示す。

[1] 中空糸内部の細胞回収方法

培養している中空糸を取り出し、60mm dish 内で PBS (-) 6ml で洗浄した後、細胞分離/分散溶液 Accumax (Innovative Cell Technologies; AM105) 3~5mL を添加して 37℃, 45rpm, 10 分間インキュベートして中空糸から細胞を分離させた。2.5mL シリンジを中空糸の封止している播種口に差し込み、先端部分をハサミで切った後にシリンジを引いて Accumax と共に細胞を引きだし、15mL チューブに移した。

[2] 抗体処理

PBS(-)で 0.5% BSA Diluent/Brocking Solution（KPL：50-61-01）および 2mM EDTA（EDTA・2Na; Dojindo: 343-01861）となるよう調製したものを buffer とし、1.0×10^6cells/100µl となるように buffer で懸濁したものを 2 サンプル用意した。アイソタイプコントロールとして 1 サンプルに PE-conjugate mouse IgG2a isotype control anti bodies（Miltenyi Biotec; 130-091-835）を 10µl 添加し、ポジティブコントロールとしてもう一方のサンプルに PE-conjugate human CD184 (CXCR4) antibodies （Miltenyi Biotec; 130-098-354）を 10µl 添加し、暗所で 2~8℃10 分間静置した。各々のサンプルに 1ml の buffer で懸濁し、遠心洗浄を行い、1~1.5ml の buffer で懸濁した後、Guava PCA で解析を行った。Guava PCA は解析開始前に Guava Check Kit （Guava Technologies：4500-0020）でチェックを行った。

3.2.4　実験結果

3.2.4.1　細胞密度変化

培養過程における中空糸内部でのヒト iPS 細胞の密度変化を Fig. 3.6 に示す。細胞数は NucleoCounter™ で計測した核数を細胞数に換算することで求めた。

培養開始から良好な細胞増殖が確認され、未分化培養条件下 7 日間では初期細胞播種密度の約 10 倍である 6.3×10^{8}cells/cm^{3} の高密度培養が達成された。その後の分化培養条件下 10 日間でも増殖が確認され、培養終了時の細胞密度は初期細胞播種密度の約 23 倍である 1.4×10^{9}cells/cm^{3} の高密度培養が維持された。

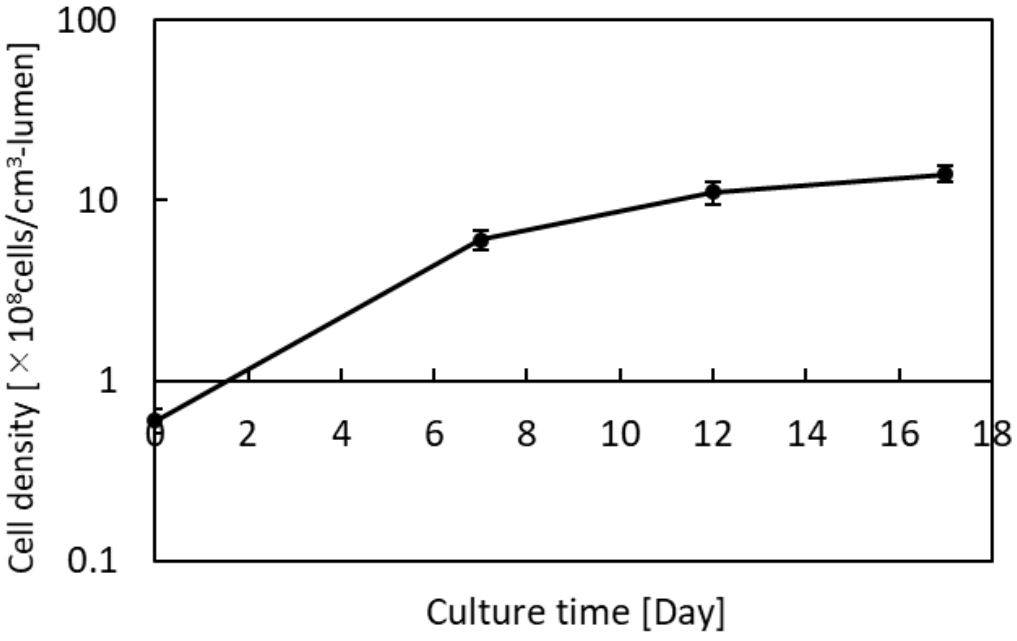


Fig.3.6 Changes in the cell density of iPS cells in hollow fiber culture. Data are presented as the means ± standard deviation. n=4. In the first 7 days, human iPS cells were cultured under conditions that maintained their undifferentiated state. Thereafter, the culture conditions were switched to allow the iPS cells to differentiate spontaneously for 10 days.

3.2.4.2　　中空糸内部の細胞凝集塊の形態

中空糸培養前後の中空糸内部のヒト iPS 細胞凝集塊の形態比較を Fig.3.7 に示す。細胞播種前の中空糸内部 (Fig.3.7 (A))と比較すると、未分化培養 7 日目には中空糸内部のほとんどが細胞で満たされている様子が観察された (Fig3.7 (B))。

また、中空糸から細胞を吸引して採取した後の細胞凝集塊の形状(Fig3.7 (C))より、細胞は中空糸内部で円柱状の凝集塊を形成し、収穫後もその形状が維持されていた。これらの結果より、ヒト iPS 細胞は中空糸培養を用いることにより増殖し三次元的に凝集塊を形成していることが明らかとなった。

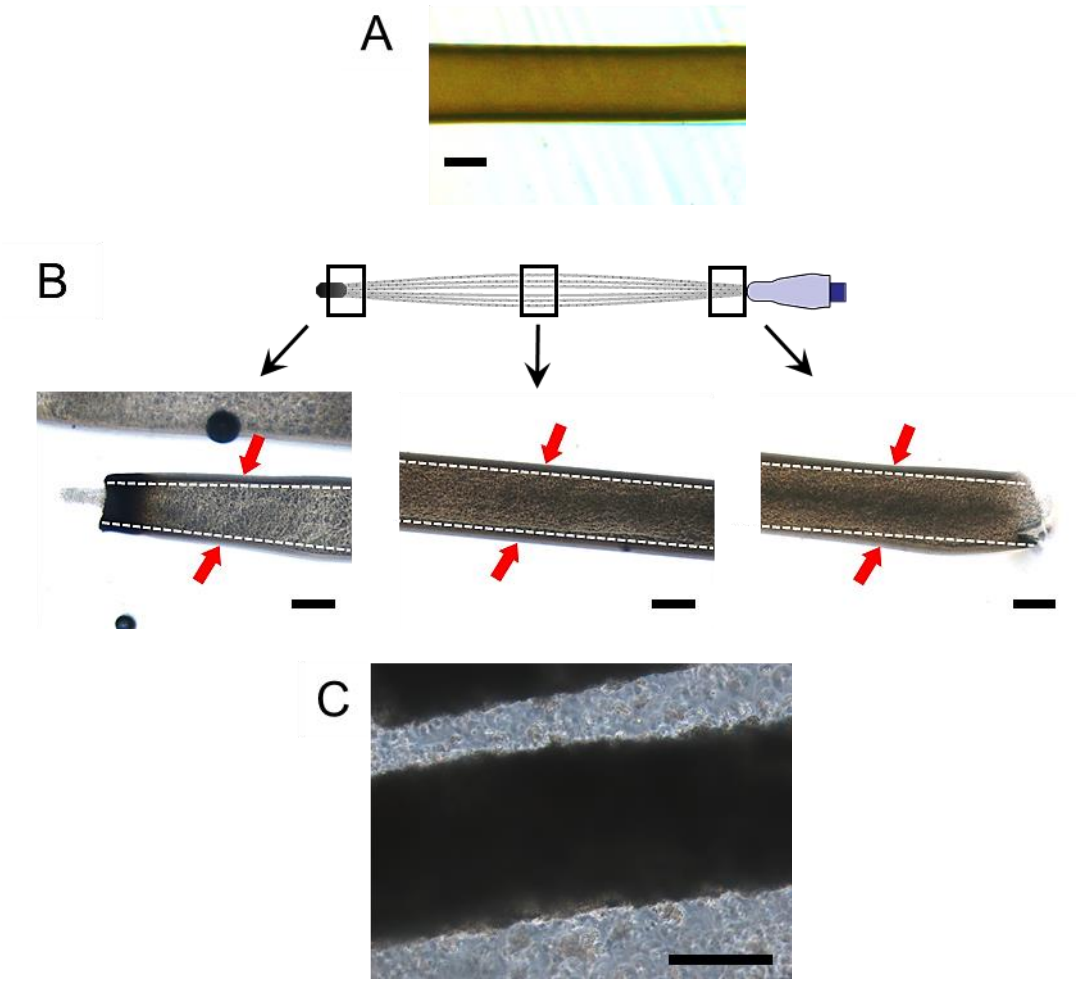


Fig.3.7 Morphological changes inside hollow fiber. (A) The state without cells inside hollow fiber as control. (B) Cell morphology inside hollow fiber on day 7 of culture under conditions that maintained their undifferentiated state. (C) The morphology of cell population removed from hollow fiber. Scale bar: 200 µm.

3.2.4.3　遺伝子発現解析

培養過程における中空糸内部でのヒト iPS 細胞の遺伝子発現量変化を Fig. 3.8 に示す。

本検討では中空糸内部での細胞の分化の傾向を解析するために、内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17*, *CXCR4*、初期肝細胞遺伝子マーカーである *HNF4α*、肝細胞遺伝子マーカーである *ALB*, *TDO2*, *CPS-1* について遺伝子解析を行った。各遺伝子マーカーの発現量は、自発的分化培養を開始した初日（Day 7）を 1 とした相対量を示す。

内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17*, *CXCR4* の発現量は大きく上昇し、特に *CXCR4* の遺伝子発現量は培養経過と共に有意に増加した。また初期肝細胞遺伝子マーカーである *HNF4α* や肝細胞遺伝子マーカーである *ALB*, *TDO2*, *CPS-1* の発現量はどれも増加傾向であり、*TDO2* は培養 17 日目において有意に増加していた。

以上より、自発的分化培養下において中空糸内の細胞は自発的に分化したといえる。

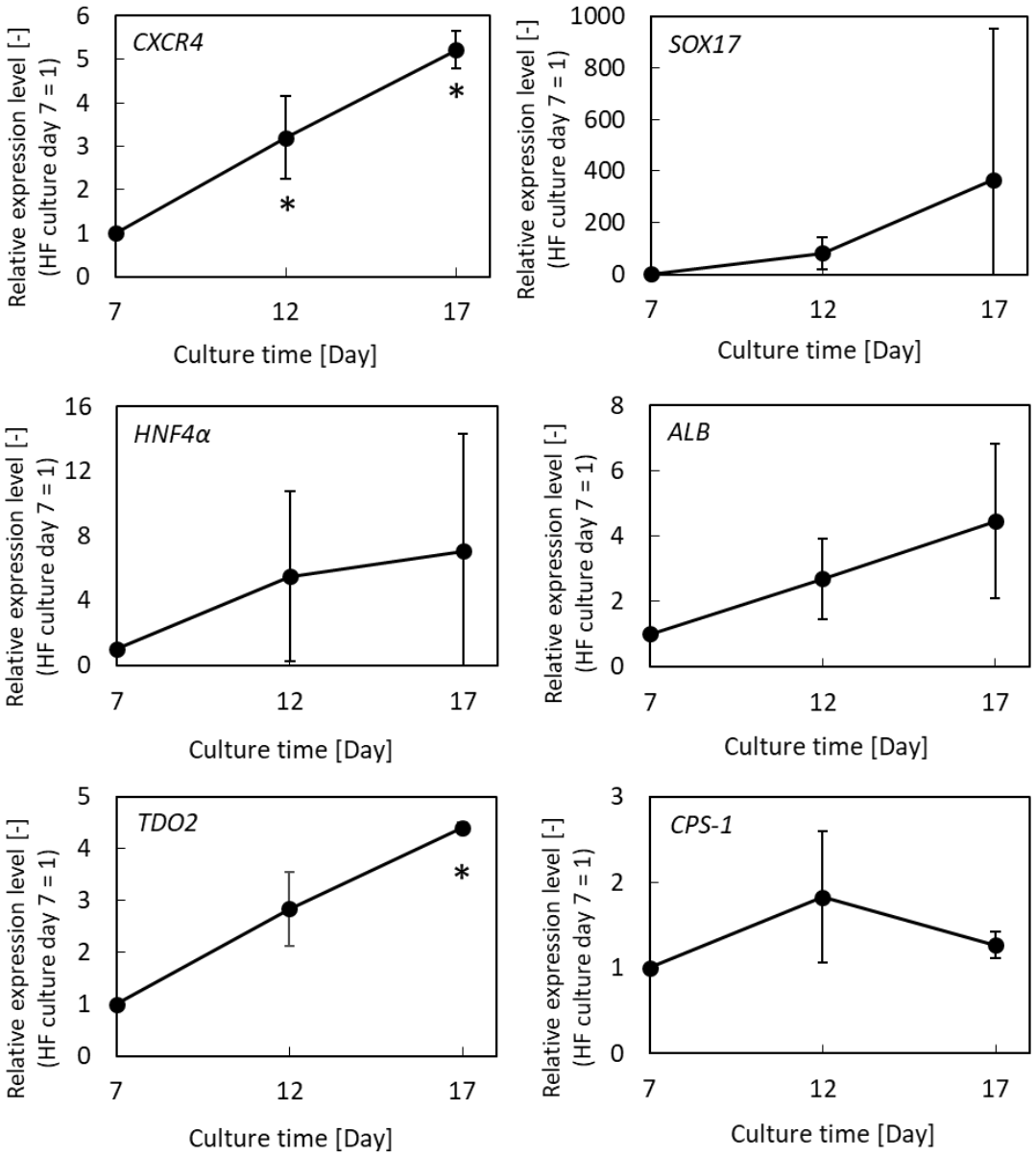


Fig. 3.8 Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of the mRNA expression of endodermal markers (CXCR4, SOX17), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4α), albumin (ALB), tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2), and carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS-1) by spontaneously-differentiated human induced pluripotent stem cells in hollow fiber culture. The expression levels of all differentiated markers were shown as relative expression intensity compared with that of the initial day of differentiation culture in hollow fiber (HF) culture (Day 7). Data are presented as the means ± standard deviation. n=4. CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor 4; SOX17, SRY-box 17. * denotes a significant difference between day 7 and day 12 or day 17.

3.2.4.4　　CXCR4 陽性細胞の定量評価

自発的分化過程における内胚葉前駆細胞の割合を CXCR4 陽性細胞の割合として評価した。Guava PCA を用いて分化誘導課程における CXCR4 陽性細胞の定量評価を経時的に行った結果を Fig.3.9 に示す。Day 12、つまり自発的分化培養条件下 5 日目において約 30%を示し、Day 17、つまり自発的分化培養条件下 10 日目において約 12%に減少した (Fig.3.9 (A))。

さらに同じ自発的分化培養 5 日間における単層培養の *CXCR4* 陽性細胞の割合と比較すると約 2 倍の発現量を示し、その差は有意であった (Fig.3.9 (B))。

これらの結果より、単層培養よりも中空糸培養法の方が、高効率な自発的分化を見込めると考えられる。

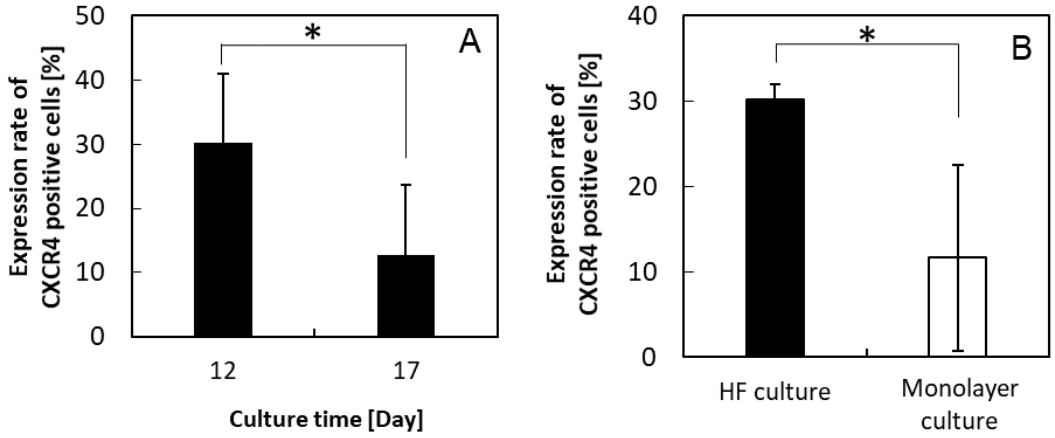


Fig. 3.9 Flow cytometric analysis of the proportion of CXCR4-positive cells, using the lineage-specific cell-surface endodermal marker CXCR4. Data are presented as the means ± standard deviation. (A) Proportion of CXCR4-positive cells in the hollow fiber (HF) culture under spontaneous differentiation conditions. * denotes significant difference in each culture day under spontaneous differentiation conditions ($P < 0.05$). n = 4. (B) Comparison of the proportions of CXCR4-positive cells between the HF culture and the traditional monolayer culture at day 12 under spontaneous differentiation conditions. * denotes a significant difference between the HF culture and the traditional monolayer culture ($P < 0.05$). n = 6.

3.3　考察

本検討では、中空糸内に播種されたヒト iPS 細胞は良好に増殖し、特に未分化培養条件下 7 日間では初期細胞播種密度の約 10 倍である 6.3×10^8cells/cm^3 の高密度培養が達成された。また中空糸内に EB と同様の凝集塊が形成されることが確認された。ヒト iPS 細胞の三次元培養に関して、Matsuura らは攪拌装置を用いた浮遊培養を実施し、未分化培養 4 日間で約 5 倍まで増殖したことを報告している(74)。また Otsuji らは、独自のガス透過性培養バッグを用いた三次元スフェア培養法を確立し、未分化培養 5 日間で約 10 倍の増殖を報告している。したがって、本研究での中空糸培養法はこれらの三次元培養法と同程度の増殖が可能であることが示唆された(79)。

また、EB のような球状細胞凝集塊を形成する培養法では、EB の大きさを制御できず、凝集塊内部の酸素や栄養の枯渇により細胞死を引き起こす可能性がある。大きな EB（半径 400 μm）の中心部の酸素濃度は小さな EB（半径 200 μm）のよりも 50%低いことが報告されており、関連サイトカイン濃度についても同様の傾向が観察されている(80)。本検討では、直径 330 μm の中空糸内部で細胞が増殖するため、細胞凝集塊の大きさを制御できるだけでなく、酸素や栄養が枯渇することなく、中空糸内部が完全に満たされるまで増殖させることが可能であった。したがって、中空糸培養法はより長期間にわたって高い細胞密度を実現し、よりラージスケールに三次元細胞凝集塊を生成することができると考えられる。

遺伝子発現の解析の結果、評価した分化関連遺伝子は自発的分化培養の開始以来、増加を続けた。このことから中空糸内部の細胞は自発的に内胚葉系譜へ分化していることが示された。一方、内胚葉遺伝子マーカーは培養期間中常に増加傾向を示した。肝成熟化の段階ではこれらの遺伝子発現は減少するため、今回評価している期間での分化段階は肝細胞よりも前のステージの内胚葉ステージであることが示唆された。

自発的分化培養過程における中空糸内部の内胚葉細胞の割合を定量的に評価するために、CXCR4 をラベルとして用いたフローサイトメトリー解析を行った。CXCR4 陽性細胞の割合は、自発的分化培養条件下 5 日目（未分化培養期間を含む 12 日目）において約 30%であり、その後減少した。一方、単層培養では、同じ自発的分化条件下 5 日目の CXCR4 陽性細胞の割合は約 15%であった。本研究室での先行研究において、マウス ES 細胞から肝細胞への分化誘導では、肝細胞マーカーの遺伝子発現レベルが単層培養よりも中空糸培養の方が高いことが示されている(74)。これらは、胚様体のような細胞凝集塊の形成が細胞の分化を促進することを示した Sepulveda らの報告とも一致する(81)。

一方、ヒト iPS 細胞は E-cadherin を介した細胞間相互作用や integrin を介した細胞-基質間相互作用を適切に行うことで未分化性を維持していることが報告されている(82)。また、細胞-基質間相互作用が減少すると凝集塊が形成され、初期内胚葉に分化することが報告されている(83)。本研究では、細胞凝集塊の外側が触れる中空糸膜の特性とヒト iPS 細胞の関係については報告しておらず、中空糸膜の材質によって、細胞凝集塊形成能や増殖・分化に影響を与える可能性があることを考慮する必要がある。したがって今後の研究では、目的

に応じて適切な中空糸膜を選択するための最適化が必要であると考えられる。

3.3.1　本節のまとめ

中空糸培養法を用いてヒト iPS 細胞から内胚葉前駆細胞への分化誘導を行い、以下の結果が得られた。

［1］ 培養終了時の細胞密度は初期播種密度の約 23 倍となる 1.4×10^{9}cells/cm^{3} を達成した。
［2］ 培養過程における遺伝子発現解析の結果、内胚葉系譜への自発的分化を確認した。
［3］ 中空糸から細胞を回収した後の CXCR4 陽性細胞の割合は、培養 12 日目（分化培養 5 日目）まで増加傾向にあり、その後は減少した。また、培養 12 日目においてピークの 30% を示し、これは同じ分化培養条件下 5 日目の単層培養の発現量の約 2 倍であった。
［4］ 中空糸培養過程で得られる CXCR4 発現細胞の分離・回収のタイミングは、培養 12 日目（分化培養 5 日目）が最も高効率であることが示された。

3.4　培養過程における CXCR4 陽性細胞の分離・回収ならびに特性評価

3.4.1　　本節の目的

前節において、中空糸培養におけるヒト iPS 細胞の自発的分化過程における内胚葉前駆細胞の発現に関して検討した。再生医療での細胞源としての利用を考慮すると、この方向付けがなされた細胞集団の分離･回収方法の確立が必要である。そこで本節では培養過程に存在する CXCR4 発現細胞を分離・回収する方法として磁気細胞分離に着目し、細胞の分離取得を試みた。あわせて、細胞分離前の集団と比較することで、CXCR4 発現細胞の特性評価を行った。

3.4.2　　実験方法

3.4.2.1　　中空糸内部の細胞回収方法

3.2 で得られた結果より、CXCR4 陽性細胞を最も多く回収できると見込める自発的分化培養条件下 5 日目（未分化培養期間を含む 12 日目）の中空糸から細胞回収を行った。

操作手順は 3.2.3.3 [1]と同様の方法で行った。

3.4.2.2　　CXCR4 陽性細胞の分離・回収

本検討では、細胞分離の手法として磁力により細胞を分離する磁気細胞分離法（Magnetic Cell Sorting; MACS）を用いた。本手法は、直径約 50 nm の極小スーパーパラマグネティック粒子で標識した抗体で細胞を処理し、磁力に基づいて細胞を分離する方法である。磁性粒子は毒性がなく、生物分解性である。目的細胞を含む細胞集団を磁性粒子で標識された抗体で処理すると、抗原抗体反応により目的細胞のみが磁気標識される。それらを磁場条件下にあるカラムに通すと、磁気標識された細胞のみがカラム内にトラップされ、それ以外の細胞はカラムを通過する。その後磁場のない条件でカラム内の細胞を回収することで目的細胞のみを分離・回収することが可能である。

本検討では、胚葉系前駆細胞として内胚葉を示す遺伝子マーカーCXCR4 を標識とし、MACS による細胞分離を試みた。操作手順を以下や Fig.3.10 に示す。

自発的分化培養 5 日目（未分化培養期間を含む 12 日目）の中空糸から Accumax によって回収された細胞を MACS buffer（0.5% BSA/2mM EDTA/PBS(-)）を用いて 2~3 回洗浄した。1.5mL サンプリングチューブに 1.0×10^7 cells/100μL となるように MACS buffer で懸濁した後、PE-conjugate human CD184 (CXCR4) antibodies （Miltenyi Biotec; 130-098-354）を 10μL 添加し、2~8℃で 10 分間静置した。MACS buffer 1~1.5mL で懸濁し、遠心洗浄した後、1.0×10^7 cells/80 μL となるように MACS Buffer で懸濁した。1.0×10^7cells 以下の場合も 80 μL に懸濁し、それ以上の場合は同比率で増やして懸濁した。1.0×10^7 cells/80 μL に対して、Anti-PE Microbeads（Miltenyi Biotec; 130-048-801）を 20 μL 添加し、4℃で 15 分間静置した後、

MACS buffer で洗浄後、MACS buffer で 500μL に懸濁した。マグネットにセットした LS 分離カラム（Miltenyi Biotec: 130-042-401）を 3mL MACS buffer で洗浄後、細胞懸濁液をカラムに通した。MACS Buffer 3 mL を 3 回カラムに通し、フロースルー（CXCR4 陰性細胞分画）を回収した。カラムをマグネット部分から外し、すぐに MACS buffer 5mL を加えてカラムのプランジャーで押し出し、CXCR4 陽性細胞分画を回収した。

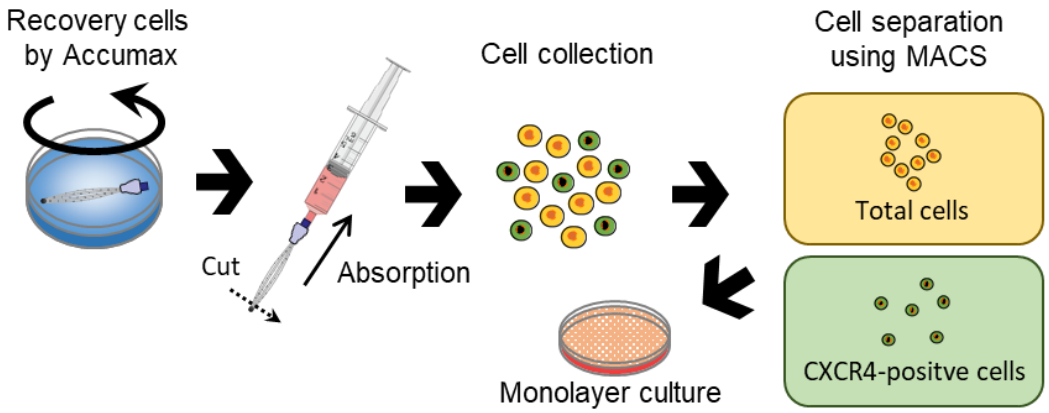


Fig.3.10 The method of separation with the specific population by magnetic-activated cell sorting (MACS).

3.4.2.3　細胞分離後の単層培養

CXCR4 を指標に分離した細胞集団である CXCR4 陽性細胞がもつ特性を評価した。本検討では、回収した CXCR4 陽性細胞を単層培養で肝分化誘導を行うことにより、単層培養後の肝分化能を遺伝子発現解析で評価した。

(1)　培養基質

細胞の培養基質として Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, LDEV-free（Corning Life Sciences：354230）でコートをした培養 dish を用いた。GFR Matrigel は通常の Matrigel に比べ、ラミニン、コラーゲンIV、エンタクチンといったマトリックス成分の比率（Table.3.4）や、増殖因子の含有量（Table.3.5）が異なり、分化や増殖のために使用されることが多い。

GFR Matrigel を 4ºC で一晩解凍した後、基礎培地 KnockOut™ DMEM（Gibco™：10829018）で希釈し、100μg/cm^2 になるようにディッシュにコートした。

Table.3.4 Composition ratio of basement membrane matrix

Component	The ratio (%)	
	Matrigel	GFR Matrigel
Laminin	56	61
Collagen IV	31	30
Entactin	8	7

Table.3.5 Composition of Growth Facter

Component	Concentration			
	Matrigel		GFR Matrigel	
IGF-1	11 - 24	ng/mL	5	ng/mL
TGF-β	1.7 - 4.7	ng/mL	1.7	mg/mL
EGF	0.5 - 1.3	ng/mL	< 0.5	mg/mL
PDGF	5 - 48	pg/mL	< 5	pg/mL
bFGF	< 0.1	pg/mL	not determind	
NGF	< 0.2	ng/mL	< 0.2	ng/mL
VEGF	5.0 - 7.5	ng/mL	1.0 -1/5	ng/mL

(2) 培養培地

基礎培地として人工多能性幹細胞の増殖のためによく用いられる KnockOut™ DMEM（Gibco™：10829018）を使用し、KnockOut™ Serum Replacement（Gibco™：10828010）、L-Glutamine（SIGMA：G8540）、Non Essential Amino Acids（DS Pharma Biomedical： R-TMS-001C）を Table3.6 に示す濃度で添加した。

Table.3.6 Supplemental components for KnocukOut™ DMEM

Component	Concentration	
KnockOut™ Serum Replacement	2	%
L-Glutamine	2	mM
NEAA	1	mM

(3) 肝分化誘導因子

肝分化誘導因子として、培養 0～7 日目までは、Recombinant Human HGF（PeproTec：100-39）、Recombinant Human FGF-4（PeproTec：100-31）を Table3.7 に示す濃度で添加した。その後培養 7～14 日目までは上記 2 因子に加え、Dexamethasone（SIGMA：D4902）、Oncostatin M（R&D Systems：595-MO）を Table3.8 に示す濃度で添加した。

Table.3.7 Components of hepatocyte culture medium for the first 7 days

Component	Concentration	
Recombinant Human HGF	10.0	ng/L
Recombinant Human FGF-4	10.0	ng/L

Table.3.8 Components of hepatocyte culture medium for the last 7 days

Component	Concentration	
Recombinant Human HGF	10.0	ng/L
Recombinant Human FGF-4	10.0	ng/L
Dexamethasone	10^{-7}	M
Oncostatin M	10.0	ng/mL

(4)　播種方法

100μg/cm^2 GFR Matrigel コートされたディッシュ上に、細胞分離前の細胞集団と CXCR4 陽性細胞集団をそれぞれ 7.0×10^{4}cells/cm^2 になるように播種した。

(5)　培養方法

(2), (3)で示した培地成分で毎日培地交換を行い、37℃, 5% CO_2 環境下で培養を続けた。培養スケジュールを Fig.3.11 に示す。

また、MACS の細胞分離の際に生じる物理的障害による細胞接着の低下の可能性があるため、全ての培養期間を通して 10μM Y-27632 を添加した。

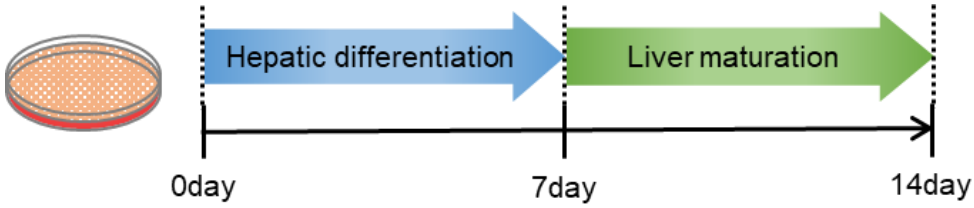


Fig.3.11 The culture conditions of cells with specific populations after cell separation.

3.4.3　　評価方法

遺伝子発現解析は、3.2.3.2 と同様とした。

3.4.4　実験結果

3.4.4.1　細胞分離後の各細胞集団における遺伝子発現解析

中空糸培養の自発的分化培養 5 日目（未分化培養期間を含む 12 日目）から回収された、細胞分離前の細胞集団、CXCR4 陽性細胞、CXCR4 陰性細胞の遺伝子発現解析を行った。各細胞集団の遺伝子発現量を Fig.3.12 に示す。各検討では 3.2.4.3 と同様、内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17*, *CXCR4*、初期肝細胞遺伝子マーカーである *HNF4α*、肝細胞遺伝子マーカーである *ALB*, *TDO2*, *CPS-1* について遺伝子解析を行った。各遺伝子マーカーの発現量は中空糸培養を開始した初日（Day 0）を 1 とした相対値を示す。

内胚葉マーカーである *CXCR4* では、CXCR4 陽性細胞集団において最も高い発現量を示し、CXCR4 陰性細胞集団とは有意な差を示した。これは、CXCR4 を標識とした細胞分離が正常に行われたことを裏付ける結果となった。同じ内胚葉マーカーである *SOX17* は細胞分離前の細胞集団が最も高く、次いで CXCR4 陽性細胞、CXCR4 陰性細胞の順であり、*CXCR4* 陽性細胞集団と陰性細胞集団の間には有意な差は見られなかった。また、初期肝細胞遺伝子マーカーである *HNF4α* や肝細胞遺伝子マーカーである *ALB*, *TDO2*, *CPS-1* の発現量はどれも各集団の大きな差はなかった。

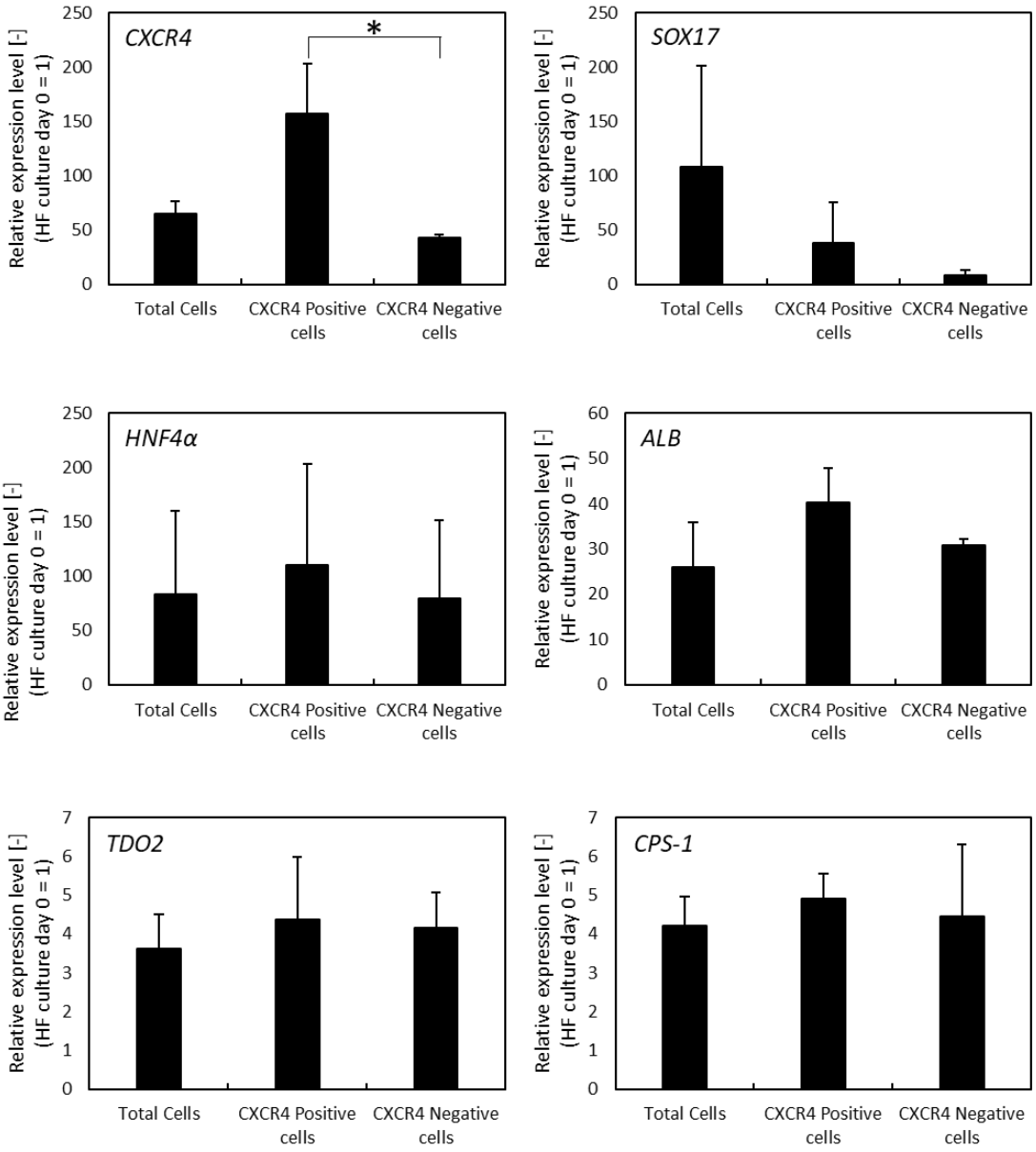


Fig.3.12 Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of the mRNA expression of endodermal markers (CXCR4, SOX17), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4α), albumin (ALB), tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2), and carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS-1) by for total cells before cell separation, CXCR4 positive cells and CXCR4 negative cells after cell separation. The expression levels of all differentiated markers are shown as relative expression intensity compared with undifferentiated human iPS cells in hollow fiber (HF) culture (Day 0). Data are presented as the means ± standard deviation. n=3. CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor 4; SOX17, SRY-box 17. * denotes a significant difference between CXCR4 positive cells and CXCR4 negative cells (P < 0.05).

3.4.4.2　細胞分離後の単層培養における遺伝子発現解析

単層培養後の全細胞集団と CXCR4 陽性細胞集団の遺伝子発現量変化を Fig.3.13 に示す。

本検討では、3.3.4.1 で評価した遺伝子マーカーに加え、成熟肝分化誘導後の特性評価を行うために、肝細胞遺伝子マーカーである *CYP3A4* について遺伝子解析を行った。各遺伝子マーカーの発現量は中空糸培養を開始した初日（Day 0）を 1 とした相対値を示す。

全細胞集団における CXCR4 の遺伝子発現量は培養期間を通じてあまり変化しなかったが、CXCR4 陽性細胞集団では減少した。*HNF4a* の遺伝子発現量は、7 日目に一時的に減少したが、14 日目には両細胞集団で増加した。*ALB* の遺伝子発現量は、CXCR4 陽性細胞集団では、14 日間の培養期間を通して、通常、増加した。同様に、*CYP3A4* の遺伝子発現量も CXCR4 陽性細胞集団で増加する傾向にあった。*TDO2* の遺伝子発現量は、両細胞集団とも最初の 7 日間は増加傾向を示し、その後は維持された。*CPS-1* の遺伝子発現量は、両細胞集団とも培養期間中、減少傾向を示した。しかしながら、CXCR4 陽性細胞集団と全細胞集団の間では、すべての分化マーカーの発現量に有意な差は見られなかった。

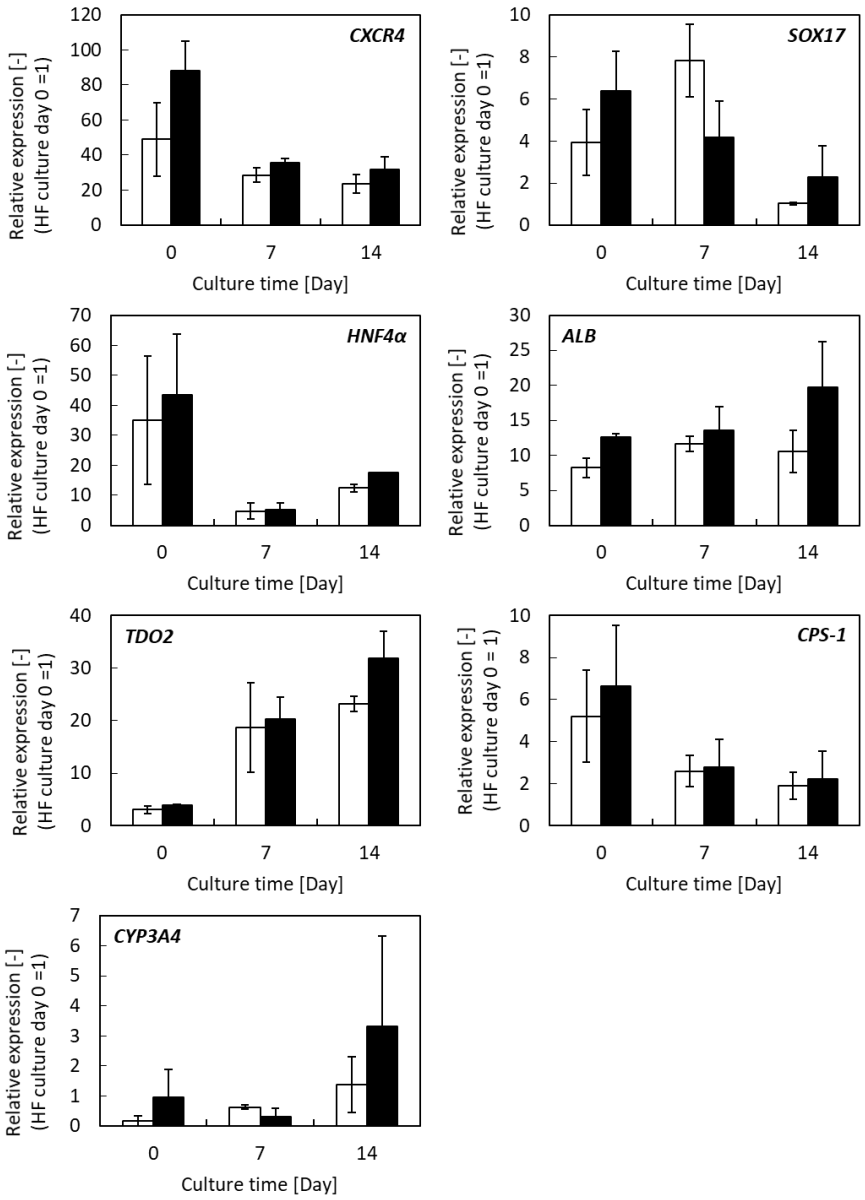


Fig.3.13 Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of the mRNA expression of endodermal markers (CXCR4, SOX17), hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4a), albumin (ALB), tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2), carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS-1), and cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4 (CYP3A4) in the total cell population and CXCR4-positive cell population (separated by magnetic-activated cell sorting with *CXCR4* as a label) after their hepatic differentiation on monolayer culture. The expression levels of all differentiated markers are shown as relative expression intensity compared with undifferentiated human iPS cells in hollow fiber (HF) culture (Day 0). Data are presented as the means ± standard deviation. n = 2. Open bars, total cell population; closed bars, CXCR4-positive cell population.

3.4.5　考察

CXCR4 を標識とした磁気細胞分離後の遺伝子発現において、CXCR4 陽性細胞集団で *CXCR4* の遺伝子発現レベルが最も高く、CXCR4 陰性細胞集団とは有意な差を示した。つまり、磁気細胞分離法による細胞分離が成功したことを裏付けた結果となった。

その一方で同じ内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17* は細胞分離前の全細胞集団が最も高く、CXCR4 陽性細胞集団と陰性細胞集団の間に有意な差は見られなかった。また単層培養においても、肝分化マーカー遺伝子の発現は培養 14 日間を通して大きな差は生じなかった。

本検討で用いた磁気細胞分離法はでの分離効率について、フローサイトメトリーによる細胞分離後の陽性細胞集団の CXCR4 発現比率は 75%程度であった。また Davenport らは、同様の方法で 85%の CXCR4 発現比率を示したことを報告している[84]。したがって、本検討における磁気細胞分離法は正常に行われたものの、磁気細胞分離法そのものが 100%の効率で目的細胞を獲得できるわけではないことを示している。*SOX17* 等の他の内胚葉遺伝子は表面特異的に発現していないので生細胞のまま標識にして分離することが出来ないが、将来的に他の表面マーカーが定義されれば、ダブル標識を行うことでより高効率に内胚葉前駆細胞の精製が可能になると考えられる。

また一般的な肝分化誘導では、分化培養初期に Activin A 等の内胚葉分化因子を添加することがほとんどである。本研究では、細胞分離前の中空糸培養においてそのような分化因子を添加せず、自発的分化による培養条件を適用している。しかし本検討における単層培養後の遺伝子発現解析結果より、全細胞集団と CXCR4 陽性細胞集団の遺伝子発現に差がないことから、分化初期に内胚葉期の細胞から肝細胞への運命決定が必要であると考えられる。したがって、中空糸培養の自発的分化培養条件下で Activin A 等の分化因子を添加することにより、他の成熟肝細胞マーカーの遺伝子発現量が増加することが期待される。またその後の細胞分離による全細胞集団と CXCR4 陽性細胞集団の間で差が生じることが予想され、CXCR4 陽性細胞の割合が 30%以上となり、肝分化の効率が向上することが期待される。

3.4.6　本節のまとめ

CXCR4 陽性細胞を多く獲得できると期待できる培養 12 日目（分化培養 5 日目）において磁気細胞分離法による細胞分離を行い、以下の結果が得られた。

［1］ CXCR4 を標識とした磁気細胞分離後の遺伝子発現において、CXCR4 陽性細胞集団で *CXCR4* の遺伝子発現レベルが最も高く、CXCR4 陰性細胞集団とは有意な差を示し、磁気細胞分離法による細胞分離は成功した。

［2］ 磁気細胞分離法による細胞分離は成功したといえるものの、分離効率は 100%ではなかった。今後他の表面マーカーが定義されれば、ダブル標識を行うことでより高効率に内胚葉前駆細胞の獲得が期待できる。

［3］ 細胞分離後の CXCR4 陽性細胞集団と細胞分離前の全細胞集団の単層培養による各集団の特性評価において、肝分化マーカー遺伝子の発現は大きな差は生じなかった。

［4］ CXCR4 陽性細胞集団と全細胞集団の遺伝子発現に差がないことから、分化初期に内胚葉期の細胞から肝細胞への運命決定が必要であると考えられる。今後は、Activin A 等の内胚葉誘導因子の添加や、他の肝分化誘導因子の組み合わせ等を検討する必要がある。

第4章　ヒト iPS 細胞の分化決定における中空糸径の影響

4.1　本章の目的及び概要

第 3 章において、中空糸培養法は通常の単層培養と比較して、自発的分化培養条件下で初期内胚葉の割合が約 2 倍高いことが示された。また磁気細胞分離法を用いた細胞分離により中空糸内の細胞から内胚葉遺伝子マーカーである CXCR4 の陽性細胞集団を獲得することが可能であった。その一方で、細胞分離前の全細胞集団と細胞分離後の CXCR4 陽性細胞集団の肝分化誘導においては、遺伝子発現レベルにおいて有意差は見られず、中空糸培養や細胞分離後の肝分化誘導に関して更なる改善が必要であるという課題が示された。これらの課題改善のアプローチとして、本章では中空糸形状に着目した。

多能性幹細胞の分化誘導において、培養初期の凝集塊形状がその後の細胞増殖や自発的分化に大きく関わっていることが示唆されている[85,86]。例えば Moon らは、物理的環境を制御するためのサイズ調整可能な異なる直径(300 μm, 500 μm および 1000 μm)もつ凹型マイクロウェルを作製し、それによってヒト ES 細胞から形成される EB のサイズを調節したところ、ヒト ES 細胞の分化パターンは、増殖因子の非存在および存在下で EB サイズによって影響を受け、*Nanog*、*Oct3/4* の減少は分化 10 日目に 300 μm, 500 μm,1000 μm の順で確認された[85]。また、Miyamoto らはマウス iPS 細胞の培養において、マイクロウェルチップ培養法を用いて、播種密度は、100、500、1000、2000 cells/well の播種密度で異なる大きさの EB を作製したところ、小さい EB の方が、大きい EB よりも顕著な増殖が確認された。また、播種密度が 500 cells 以上の大きい EB は肝細胞や心筋細胞に分化する傾向であったのに対し、100 cells の小さい EB は血管細胞に分化する傾向であった。これらの既往研究の結果より、初期の EB の大きさは幹細胞の増殖と分化を制御する重要な要因の一つであることが示されている。

上述の知見をもとに、内径の異なる中空糸径を用いて中空糸内部の細胞凝集塊の大きさを制御することにより、細胞分化決定に影響を及ぼすと推測した。そこで本章では、内径 φ145μm と φ366μm の 2 種類の中空糸を用いてヒト iPS 細胞の自発的分化培養を行い、比較検討を行うことで中空糸径による細胞分化決定の違いがあるか評価した。さらに、分化誘導因子を用いて肝分化誘導を行うことで、より高効率な肝分化誘導が可能になるか評価した。

4.2　ヒト iPS 細胞の自発的な分化培養における中空糸径効果

4.2.1　　本節の目的

本節では、内径の異なる 2 種類の中空糸（φ145μm とφ366μm）を用いてヒト iPS 細胞の自発的な分化培養を行い、中空糸径がヒト iPS 細胞の分化決定に及ぼす影響について調査した。

4.2.2　　実験方法

4.2.2.1　　ヒト iPS 細胞の培養

第 3 章 3.2.2.1 と同様の方法で行った。

4.2.2.2　　中空糸培養

本検討では、ヒト iPS 細胞を培養する培養担体として血漿分離用中空糸（材質：nylon6、ユニチカ）を使用した。使用した中空糸の内径は、145μm と 366μm である。内径 145μm の中空糸は 2.8cm×11 本（5.08mm^3）、内径 366μm の中空糸は 2.4cm×2 本（5.05mm^3）で中空糸バンドルを作製した。中空糸の長さは、2 つの中空糸バンドルで培養体積が等しくなるようにしている。

中空糸バンドルの作製方法、播種方法については第 3 章 3.2.2.2 と同様の方法で行った。

作製した中空糸バンドルに 6.6×10^5 cells のヒト iPS 細胞を播種した。培地は 6 ウェルプレートの 1 ウェルに 2ml 入れた。また、中空糸バンドルは 1 ウェルに 2 バンドル入れ、培地に対する細胞密度を 6.6×10^5 cells/ml とした。

4.2.2.3　　培養条件

培養培地として、分化用培地である Essential 6^{TM} medium を用い、細胞の自発的分化を促し、培養期間は 10 日間とした (Fig.4.1)。播種前日から培養 1 日目まで 10μM Y-27632 を添加した。

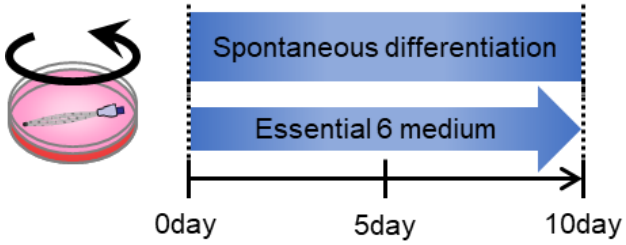


Fig. 4.1 The culture condition of expansion and differentiation of human iPS cells.

4.2.3　評価方法

4.2.3.1　核数計数

第 3 章 3.2.3.1 と同様の方法で行った。

4.2.3.2　遺伝子発現解析

第 3 章 3.2.3.2 と同様の方法で行った。

4.2.4　実験結果

4.2.4.1　細胞密度変化

培養過程における中空糸内部でヒト iPS 細胞の密度変化を Fig.4.2 に示す。細胞数は NucleoCounter™ で計測した核数を細胞数に換算することで求めた。

10 日間の培養後、φ145μm では、初期細胞数の約 3.2 倍である 2.43×10^8cells/cm^3 まで増殖した。φ366μm では、初期細胞数の約 4.8 倍である 3.4×10^8cells/cm^3 まで増殖した。

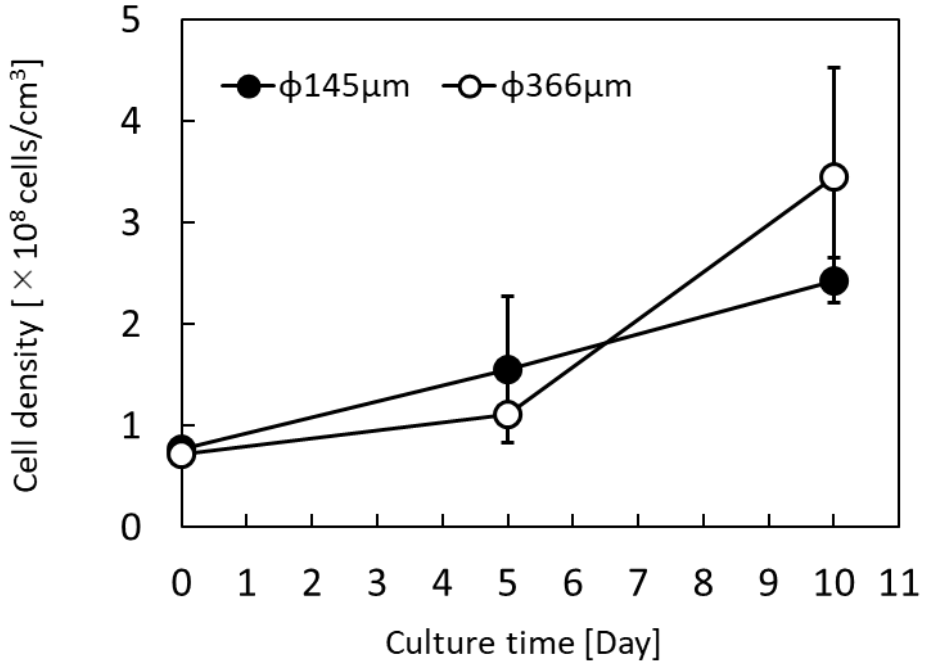


Fig.4.2 Changes in the cell density of f human iPS cells in each hollow fiber culture. Data are presented as the means ± standard deviation. n=2.

4.2.4.2　遺伝子発現解析

培養 10 日目における中空糸内部でのヒト iPS 細胞の遺伝子発現量を Fig.4.3 に示す。

本検討では、中空糸内部での細胞の自発的分化の傾向を解析するために、未分化遺伝子マーカーである *Nanog*, *Oct-3/4*、内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17*、中内胚葉遺伝子マーカーである *CXCR4*、中胚葉遺伝子マーカーである *T.brachury*, *MSX1*、外胚葉遺伝子マーカーである *OTX2*, *PAX6* について遺伝子解析を行った。各遺伝子マーカーの発現量は、中空糸に播種した当日（Day 0）を 1 とした相対量を示す。

未分化遺伝子マーカーである *Nanog*, *Oct-3/4* の発現量は、両方の系において 0 日目から 10 日目にかけて大きく減少した。よって、両方の系で分化が進行していることが示唆された。

内胚葉、中内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17*, *CXCR4* の発現量と、中胚葉遺伝子マーカーである *T.brachury*, *MSX1* の発現量は、φ366μm の方がφ145μm よりも高かった。一方、外胚葉マーカーである *PAX6*, *OTX2* の発現量は、φ145μm の方がφ366μm よりも高かった。よって、φ366μm では内胚葉・中胚葉、φ145μm では外胚葉への分化傾向があると考えられる。

この結果から、中空糸の内径が、内部で形成されるヒト iPS 細胞凝集塊の分化傾向に影響を及ぼすことが示唆された。

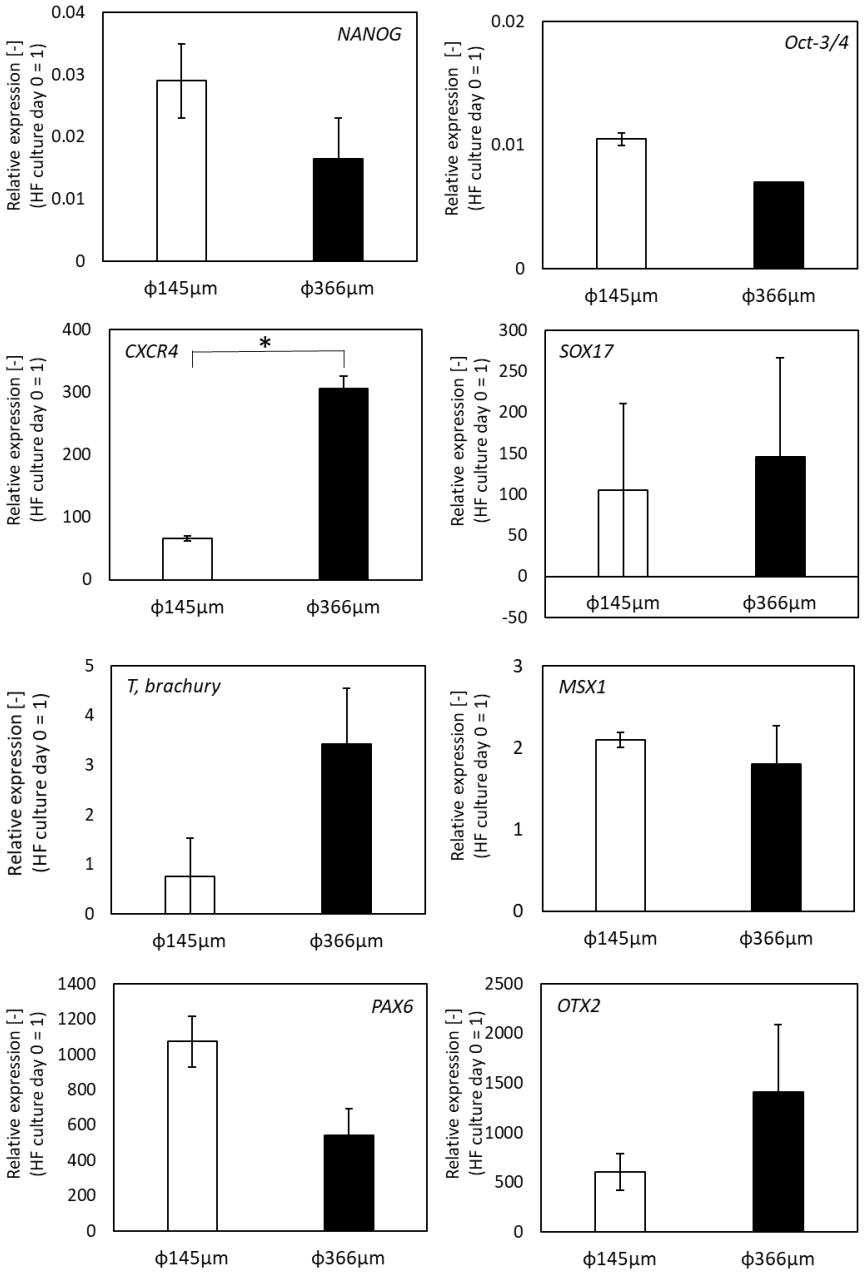


Fig.4.3 Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of the mRNA expression of undifferentiated markers (*NANOG, Oct-3/4*), endodermal markers (*CXCR4, SOX17*), mesodermal markers (*T. brachury, MSX1*), ectodermal markers (*PAX6, OTX2*), by spontaneously-differentiated human iPS cells in day 10 of hollow fiber (HF) culture. The expression levels of all differentiated markers were shown as relative expression intensity compared with that of the initial day of hollow fiber (day 0). Data are presented as the means ± standard deviation. n=2. CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor 4; SOX17, SRY-box 17. * denotes a significant difference between day ϕ145μm and ϕ366μm.

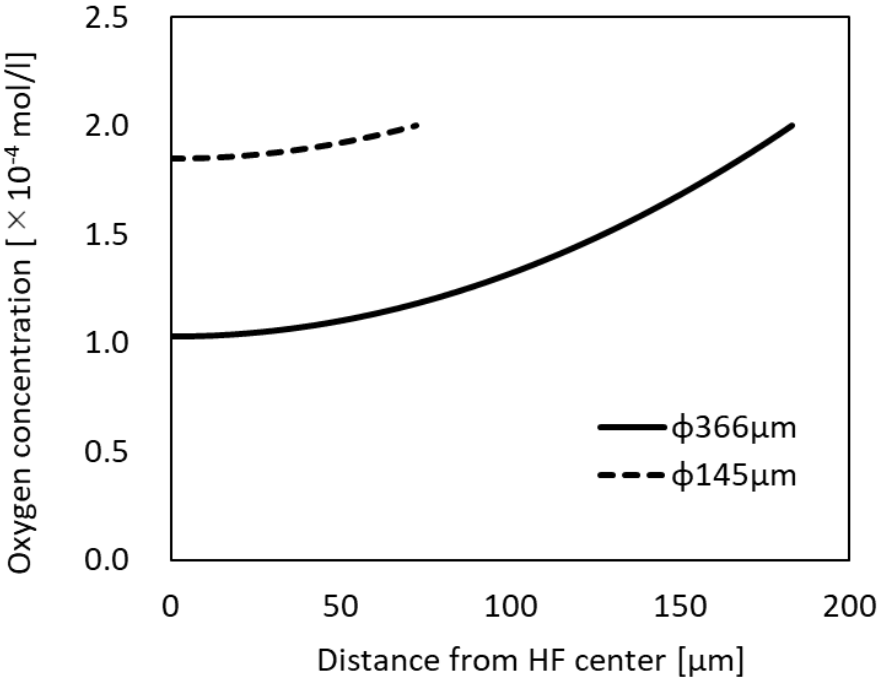
4.2.5　考察

細胞数の評価の結果、内径 145 μm の系（φ145μm）では、0 日目から 10 日目にかけて細胞数が約 3.2 倍増加し、内径 366 μm の系（φ366μm）では、約 4.8 倍増加した。細胞増殖が凝集塊表面近傍でより活発であると仮定した場合、細胞増殖は中空糸バンドルの断面積に依存する。作製した中空糸バンドルの長さが異なるため、φ366μm の方がφ145μm よりも中空糸の断面積が大きく、その結果φ366μm で増殖が良好であったと推察される。

2 つの系で分化傾向が異なった理由の 1 つとして、凝集塊内部の酸素濃度分布が異なることが考えられる。凝集塊内部の酸素濃度は、多能性肝細胞の分化決定に影響を及ぼす可能性があると考えられている[87, 88]。凝集塊内部で生じると推察される酸素濃度の分布を Fig.4.4 に示す。中空糸は円筒形であるため、円筒座標系で物質収支を取ることにより(1)式を導出した。

$$\mathrm{C} = C_A - \frac{qd}{4D} \cdot (R^2 - r^2) \qquad (1)$$

C は酸素濃度、C_Aは組織表面の濃度（6.52ppm=2.0×10^{-4} mol/L）、d は細胞密度（7.9×10^{14} cell/m^3）、q は細胞の酸素消費速度（2.5×10^{-17} mol/cell/s）、D は拡散係数（1.7×10^{-8} m^2/s）、R は中空糸半径、r は組織中心部からの距離である。酸素濃度を算出する際、バルク中は飽和酸素濃度に達しており、組織表面の濃度はバルク濃度と等しいと仮定した。また、酸素の拡散係数と細胞の酸素消費速度は Van らの報告より得られた値を使用した[80]。よって、2.0×10^{-4} mol/L～1.8×10^{-4} mol/L の間に外胚葉への分化を促進する濃度範囲があり、1.8×10^{-4} mol/L～1.0×10^{-4} mol/L の間に中内胚葉への分化を促進する濃度範囲があると考えられる。酸素濃度が分化に及ぼす影響を明らかにするためには、φ145μm の凝集塊中心部の濃度がφ366μm の中心部の濃度と等しくなるように、酸素分圧を 21%から 12%に変えて培養を行い、φ366μm と同様の分化傾向を示すかを確認する必要がある。



Fig,4.4 Distribution of oxygen concentration inside cell tissues

4.2.6　本節のまとめ

内径の異なる 2 種類の中空糸を用いてヒト iPS 細胞の自発的な分化培養を行い、以下に示す結果が得られた。

［1］ ϕ366μm では、0 日目から 10 日目にかけて細胞数が約 4.8 倍増加し、ϕ145μm では、約 3.2 倍増加した。

［2］ ϕ366μm では内胚葉・中胚葉へ、ϕ145μm では外胚葉へ分化しやすい傾向があり、中空糸の内径が内部で形成されるヒト iPS 細胞凝集塊の分化傾向に影響を及ぼすことが示唆された。

［3］ 目的細胞に応じて、使用する中空糸の内径を変更すればよいことが考えられる。

4.3　初期の自発的分化傾向を利用したヒト iPS 細胞の肝分化培養

4.3.1　　本節の目的

前節において、中空糸径が iPS 細胞の自発的分化に影響を与えることが示された。また φ145μm と φ366μm の 2 種類の中空糸では、φ366μm の中空糸がより内胚葉分化誘導に適していることが示された。そこで本節では、この条件を用いて、ヒト iPS 細胞の肝細胞への成熟化を試みた。

4.3.2　　実験方法

4.3.2.1　　中空糸培養

前節において、φ366μm では内胚葉へ分化しやすい傾向が示された。したがって本検討で使用した中空糸の内径は、366μm である。前節と同様に、2.4cm×2 本（5.05mm^3）で中空糸バンドルを作製した。

中空糸バンドルの作製方法、播種方法については第 3 章 3.2.2.2 と同様の方法で行い、播種細胞数は前節 4.2.2.2 と同様であった。

4.3.2.2　　培養条件

培養期間は 26 日間であり、培養期間を通して培地は、Essential 6™ medium を使用した。培養 0 日目～10 日目までは自発的分化を促し、10 日目～16 日目までは、Sodium Butyrate（SIGMA：B5887）を添加して肝分化誘導を行った。培養 16 日目～26 日目までは、Dexamethason（SIGMA：D4902）、Oncostatin M（R&D systems：495-MO-025）を 10ng/ml、Insulin-Transferin-Selenium（Life Technologies Japan：51500-056）を添加して肝成熟化を行った。それぞれの添加濃度は、Table.4.1 に示す。培養スケジュールを Fig.4.5 に示す。

Table.4.1 Components of hepatic differentiaion

Component	Concentration	
Sodium Butyrate	0.5	mM
Dexamethason	10^{-7}	M
Oncostatin M	10.0	ng/mL
Insulin-Transferin-Selenium	10.0 (Insulin) 5.5 (Transferin) 6.7 (Selenium)	μg/ml ng/ml ng/ml

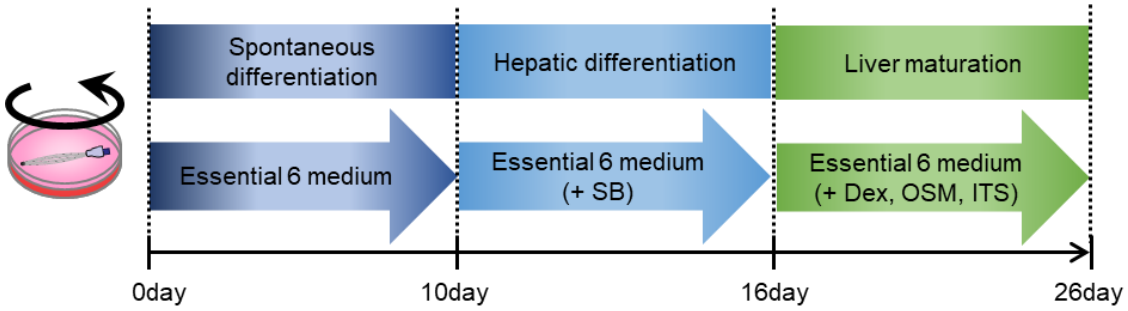


Fig.4.5 The culture condition of hepatic differentiation of human iPS cells

4.3.3　評価方法

4.3.3.1　核数計数

第 3 章 3.2.3.1 と同様の方法で行った。

4.3.3.2　遺伝子発現解析

第 3 章 3.2.3.2 と同様の方法で行った。

4.3.3.3　肝機能評価（アンモニア除去能）

アンモニアは、劇症肝炎の主な死因となっている肝性昏睡を引き起こす原因物質の一つであり、肝不全時に急激に上昇するアンモニアを代謝し、正常な濃度を維持することは人工肝臓にとって重要な役割の一つである。また、肝細胞のアンモニア解毒反応は応答が早く、数時間という短時間の体外循環中の人工肝臓機能の指標としても有効である。
アンモニア除去能を評価するために、培養培地中 1 mM となるようアンモニアを添加し、その後、6 時間目及び 24 時間目までの除去量を測定し評価した。測定には、市販のアンモニアテストワコー(Wako: 277-14401）を用いた。

4.3.4　実験結果

4.3.4.1　細胞密度変化

培養過程における中空糸内部でヒト iPS 細胞の密度変化を Fig. 4.6 に示す。細胞数は NucleoCounter™ で計測した核数を細胞数に換算することで求めた。

培養 0 日目から 10 日目において、細胞数は約 4.7 倍増殖した。これは第 3 章で示された細胞増殖と同程度の結果である。培養 10 日目から 16 日目では細胞数が減少した。培養 16 日目から 26 日目において、細胞数はさらに減少した後に少し増加した。培養期間を通して、細胞数は約 2.6 倍増加した。

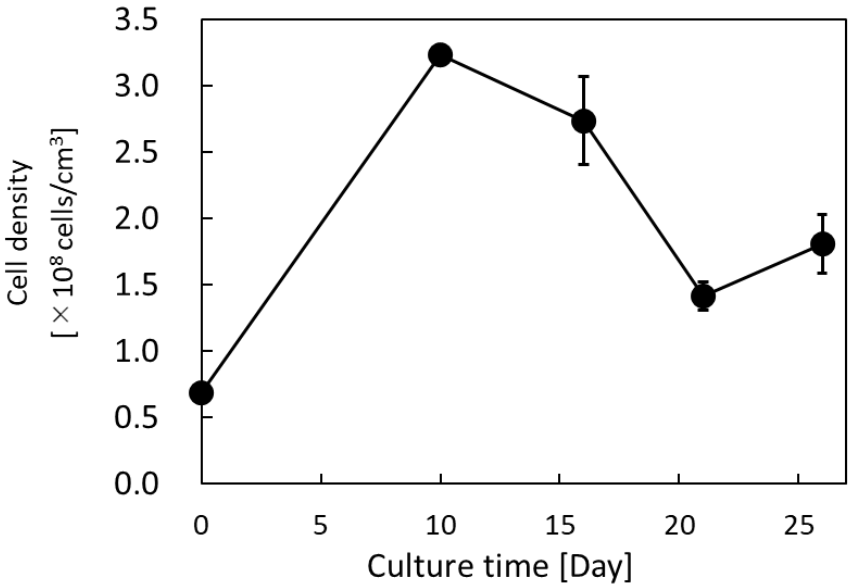


Fig.4.6 Changes in the cell density of f human iPS cells in hollow fiber culture. Data are presented as the means ± standard deviation. n=2.

4.3.4.2　遺伝子発現解析

培養過程における中空糸内部での遺伝子発現量を Fig.4.7 に示す。

本検討では、ヒト iPS 細胞の肝分化を評価するために、内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17*、中内胚葉遺伝子マーカーである *CXCR4*、肝マーカーである *HNF4a*, *Albumin*, *TDO2*, *CPS-1* について遺伝子解析を行った。各遺伝子マーカーの発現量は、中空糸に播種した当日（Day 0）を 1 とした相対量を示す。

中内胚葉遺伝子マーカーである *CXCR4* の発現レベルは、培養 10 日目で上昇したが、内胚葉遺伝子マーカーである *SOX17* はほとんど変化がなかった。両方のマーカーは、培養 26 日目で発現レベルが上昇していた。

肝マーカーである *Albumin* は 16 日目で発現レベルが上昇したが、肝成熟化の期間で発現レベルに変化はなかった。*HNF4a* は 21 日目で発現レベルが最も高かった。*TDO2* は 16 日目以降、発現レベルが上昇し続けた。*CPS-1* は、培養期間を通して発現レベルにほとんど変化がなかった。

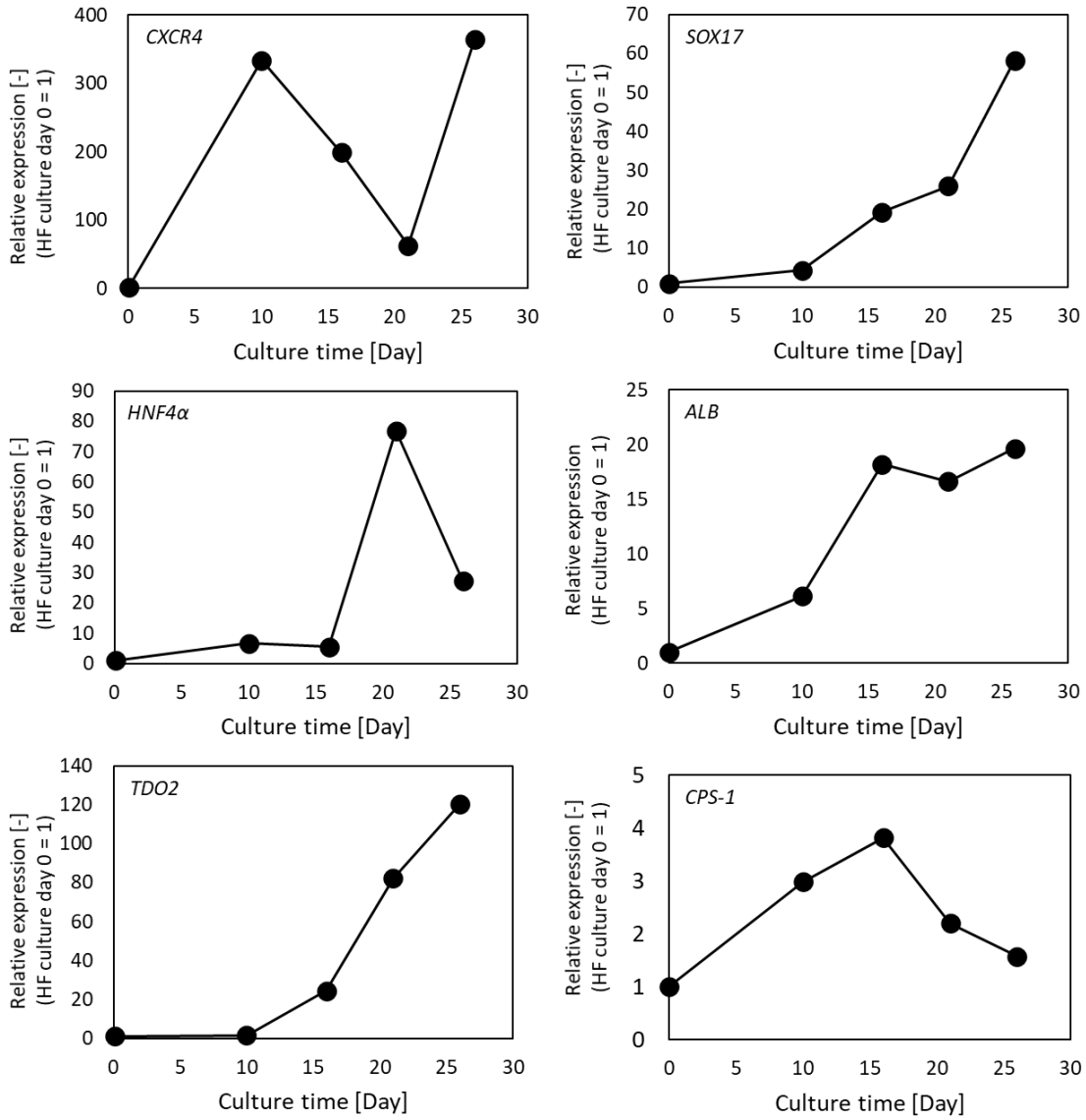


Fig.4.7 Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of the mRNA expression of endodermal markers (*CXCR4, SOX17*), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (*HNF4α*), albumin (*ALB*), tryptophan 2,3-dioxygenase (*TDO2*), and carbamoyl phosphate synthetase 1 (*CPS-1*) differentiated human iPS cells in hollow fiber culture. The expression levels of all differentiated markers were shown as relative expression intensity compared with that of the initial day of hollow fiber (day 0). CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor 4; SOX17, SRY-box 17.

4.3.4.3　　アンモニア除去能評価

培養 16 日目以降のアンモニア除去能を解析した結果を Fig.4.8 に示す。単位細胞数当たりのアンモニア除去能を評価した結果、培養 16 日目では機能が確認されなかったが、21 日目以降では確認された。21 日目では 0.35μmol/10^6cells/day であり、26 日目では 0.21μmol/10^6cells/day であった。

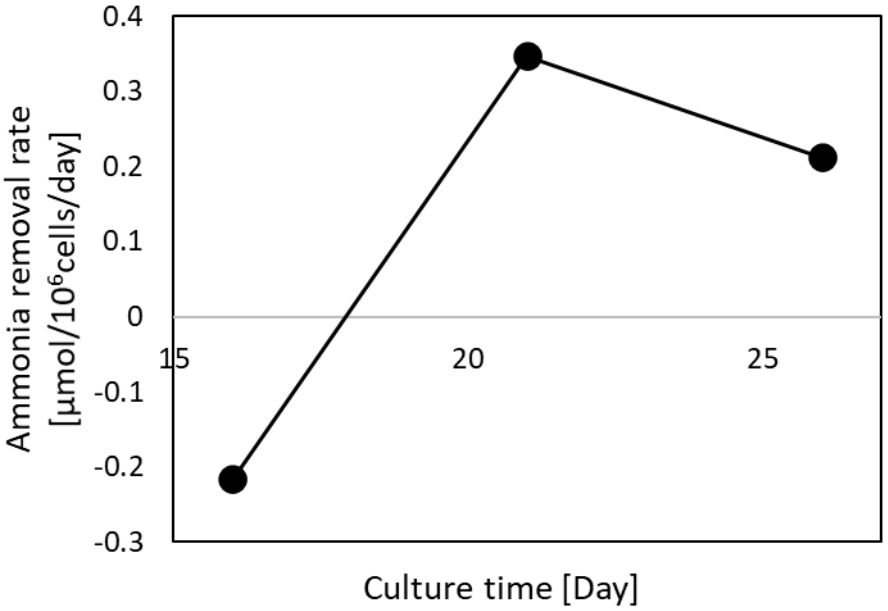


Fig.4.8 The ammonia removal rate of differentiating human iPS cells in the liver maturation culture.

4.3.5　　考察

細胞数変化について、培養 10 日目から 16 日目において細胞数が減少した。この期間に添加している Sodium Butyrate（SB）は、ほとんどの脱アセチル化酵素の活性を制御することでヒストンの高アセチル化を促すとともに、p53 非依存的に p21 の誘導が可能となり、DNA 複製を阻害することが報告されている[89]。よって、SB を添加したことにより細胞周期が停止し、細胞が減少したと考えられる。16 日目から 21 日目にはさらに細胞数が減少した。この原因としては、SB の効果が持続していることが考えられる。また、中空糸内で形成された凝集塊の中心部付近に位置する肝細胞があったと仮定すると、肝細胞の生存に必要な量の酸素が供給されず、内部で細胞死が起こった可能性がある。内径 330μm の中空糸内で初代ラット肝細胞を培養すると、中心部から直径 50μm の範囲で細胞の壊死層が確認

されている[90]ことから、この可能性が考えられる。

遺伝子発現について、肝マーカーの *Albumin*、*HNF4a*、*CPS-1* は、培養 16 日目以降も発現レベルにあまり大きな変化は確認されなかった。また、アンモニア除去能は培養 21 日目にピークが見られ、除去速度は 0.35μmol/10^6cells/day であった。しかし、中空糸培養した初代ラット肝細胞では約 10μmol/10^6cells/day 程度であることから、機能レベルは低いと考えられる。よって、本実験の手法では、十分な肝分化を達成することはできなかったことが示された。この原因として、初期の分化誘導が適切でないことが考えられる。培養 10 日目において中内胚葉マーカーの *CXCR4* は発現レベルが上昇したが、内胚葉マーカーの *SOX17* の発現レベルはほとんど変化がなかった。これは、初期段階で内胚葉に分化した細胞数が少なく、内胚葉以外の細胞集団が増えてしまったと予想される。

そこで、予備検討として、培養 0 日目より分化誘導因子を添加する肝分化誘導実験を行った。分化誘導条件として、培養 0~5 日目までは、Essential 6^{TM} medium に内胚葉誘導因子として Recombinant Human/mouse/Rat Activin A 100ng/mL（R&D systems : 338-AC-05）を添加し、培養 5~10 日目までは、RPMI 1640 Medium（Thermo Fisher : 11875093）に、B-27 Supplement(50×),serum free（Thermo Fisher : 17504044）を添加し、肝分化誘導因子として Recombinant Human HGF 20ng/mL（PeproTec : 100-39）を添加した。中空糸に播種した当日(Day 0)を 1 とした相対量を示した遺伝子発現解析において、*SOX17* と *CXCR4* の発現レベルはどちらも 10 日間の培養期間を通じて上昇傾向であり、培養後期にも中・内胚葉の細胞集団が増えていることが考えられる(Fig.4.9)。Fig.4.7 と比較すると特に *SOX17* の発現量は高く、Activin A 添加によって本節で実施した培養条件よりも内胚葉分化が促進されていると示唆される。したがって本節では、培養初期に分化誘導因子を添加していないため、結果的に肝分化した細胞の数が少なくなってしまい、アンモニア除去能も低いレベルとなったことが考えられる。すなわち、分化誘導条件の最適化によって機能発現レベルはさらに上昇することが期待される。

一方、上述の予備検討ではφ337 μm に対しφ143μm での *SOX17* 発現量が高いことが示された。さらに Activin を添加した培養 5 日目での SOX17 陽性細胞の発現率を解析した結果、φ337 μm では 4.65%であったのに対しφ143μm では 49.4% であった 。この結果からは、外因性の、すなわち培地中に添加した分化誘導因子についても中空糸径が影響する可能性が示唆されている。Activin A は濃度依存的に多能性幹細胞の分化傾向を変える因子として知られており、今回の添加条件ではφ143μm での凝集塊内部において Activin が有効濃度であった範囲が相対的にφ337μm よりも大きかったことが示唆される。この仮説を証明するためには、分化細胞の凝集塊内部での分布評価を行う必要がある。

以上より、中空糸培養を用いた効率的な肝分化誘導の実現のためには、適切な中空糸と適切な培養条件を組み合わせた新たな培養プロセスの確立が必要であると考えられる。

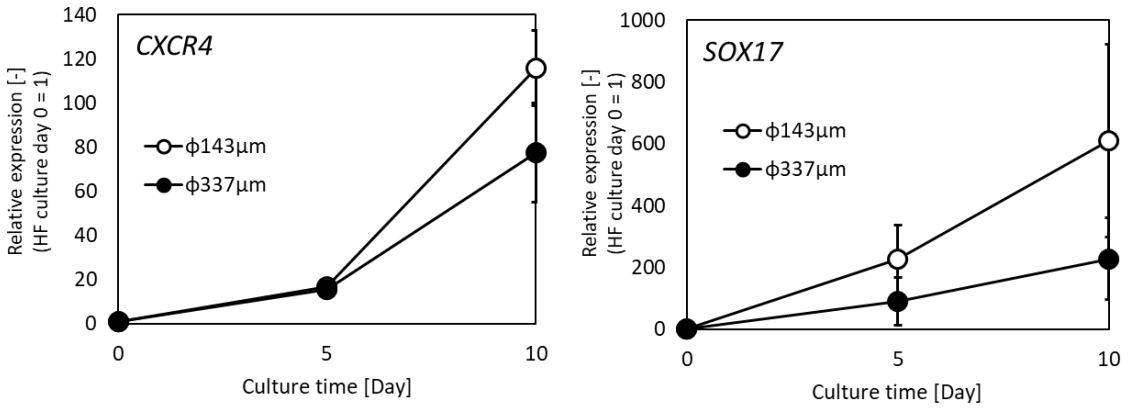


Fig.4.9 Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction analysis of the mRNA expression of endodermal markers (*CXCR4, SOX17*) differentiated human iPS cells in hollow fiber (HF) culture. The expression levels of all differentiated markers were shown as relative expression intensity compared with that of the initial day of hollow fiber (Day 0). Data are presented as the means ± standard deviation. n=2. CXCR4, C-X-C motif chemokine receptor 4; SOX17, SRY-box 17.

4.3.6　本節のまとめ

中空糸径によるヒト iPS 細胞の自発的分化傾向を利用した肝分化培養を行い、以下に示す結果が得られた。

［1］ 26 日間の培養期間を通して、細胞数は約 2.6 倍増加した。肝分化誘導因子の SB を添加すると細胞周期がとまり、細胞数が減少すると考えられた。

［2］ 肝遺伝子マーカー*Albumin*、*HNF4a*、*CPS-1* の発現レベルは培養 16 日目以降に若干上昇するが、あまり大きな変化ではなかった。

［3］ アンモニア除去能は低い機能レベルであった。遺伝子発現の結果と合わせて、肝分化が充分に達成されていないと考えられる。

［4］ 初期の内胚葉分化が適切でなく、培養後期において肝細胞以外の細胞集団が増加したと考えられる。よって、肝分化を達成するためには、初期から分化誘導因子を用いて積極的に内胚葉分化を促進する必要があると考えられる。

第5章 結言

5.1　総括

本研究で明らかとなった結果を以下に示す。

【中空糸培養法を用いたヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導】

- 中空糸培養法を用いたヒト iPS 細胞の培養において、iSP 細胞から内胚葉前駆細胞への自発的分化を確認した。培養終了時の中空糸内部での細胞密度は初期播種密度の約 23 倍である 1.4×10^{9}cells/cm^{3} の高密度培養を達成した。培養過程におけるヒト iPS 細胞の遺伝子発現量変化は、分化遺伝子マーカーにおいて、経過とともに増加傾向であり、特に、内胚葉遺伝子マーカーは肝細胞遺伝子マーカーよりも発現量が高かった。
- 中空糸から細胞を回収した後の *CXCR4* 陽性細胞の割合は、培養 12 日目（分化培養 5 日目）においてピークの 30% を示し、これは同じ分化培養条件下 5 日目の単層培養の発現量の約 2 倍であった。また、この結果より中空糸培養過程で得られる *CXCR4* 発現細胞の分離・回収のタイミングは、培養 12 日目（分化培養 5 日目）が最も高効率であることが示された。

【培養過程における *CXCR4* 発現細胞の分離・回収ならびに特性評価】

- 中空糸培養 12 日目（分化培養 5 日目）における中空糸から細胞を回収し、MACS による *CXCR4* 陽性細胞と *CXCR4* 陰性細胞に分離することに成功した。
- *CXCR4* 発現細胞の単層培養では、良好な細胞接着と細胞増殖が観察された。しかしその一方で、遺伝子発現解析ではどの遺伝子マーカーにおいても発現レベルが非常に低く、有意な値を得ることが出来なかった。
- *CXCR4* 発現細胞の単層培養において、分化誘導因子の組み合わせや添加時期などの分化誘導条件の検討を行う必要がある。

【ヒト iPS 細胞の分化決定における中空糸径の影響】

- φ366μm では内胚葉・中胚葉へ、φ145μm では外胚葉へ分化しやすい傾向があり、中空糸の内径が内部で形成されるヒト iPS 細胞凝集塊の分化傾向に影響を及ぼすことが示唆された。
- 内胚葉への自発的分化傾向が見られたφ366μm を用いて肝分化培養を行ったが、肝遺伝子マーカーの発現レベルは培養後期で若干上昇するものの、大きな変化はなかった。
- 肝機能レベルも低く、遺伝子発現量の結果と合わせて肝分化が充分に達成されていないことが示された。
- 肝分化を達成するためには、初期から分化誘導因子を用いて積極的に内胚葉分化を促進する必要があると考えられた。

5.2　今後の課題と展望

本研究では、中空糸培養法を用いたヒト iPS 細胞の培養において、7 日間の未分化維持培養で約 10 倍の高密度培養が可能であることを示し、その後の自発的分化培養では、従来の単層培養よりも 2 倍以上の効率で内胚葉前駆細胞の取得が可能であることを示した。また、CXCR4 を標識とした磁気細胞分離により CXCR4 陽性細胞の分離取得が可能であることを示した。以上の結果より、中空糸培養法から得られた CXCR4 陽性細胞を分離取得する培養・回収プロセスは肝再生医療における課題の 1 つである大量の細胞源確保に向けた解決法の 1 つとなりうる。

一方、分離した CXCR4 陽性細胞集団の特性評価では遺伝子発現解析より、肝分化マーカー *ALB, TDO2, CPS-1, SYP3A4* の顕著な発現上昇が見られなかったことから、CXCR4 陽性細胞集団の肝成熟化については、条件の最適化が必要である。例えば、本論文では用いていない FGF や BMP の組み合わせによる肝分化誘導に成功している例が報告されている[46-49]。このように肝分化誘導因子の組み合わせは様々であり、使用する分化誘導因子によって肝分化能の結果を左右する可能性がある。今後は、肝分化誘導因子や使用する培地など、分化誘導因子のための条件を検討する必要があると考えられる。

次に、細胞凝集塊内部の培養環境への影響を調査するための中空糸径を変えた検討では、中空糸径がヒト iPS 細胞の自発的分化傾向に影響を及ぼすことが明らかとなり、内径の小さい中空糸では外胚葉へ、内径の大きい中空糸では中内胚葉へ分化しやすい傾向を示した。そして上記結果より、中空糸内部の酸素濃度分布が分化傾向に影響を及ぼす可能性があることを示したことから、中空糸培養法を用いることで細胞凝集塊内部の培養環境の影響によるヒト iPS 細胞の分化傾向の違いの一端を明らかにすることができた。しかし酸素濃度分布以外にも、中空糸膜の材質や、径が異なることによる細胞が接する膜表面積の違いによる影響や、培地成分の栄養素等の中空糸内部への拡散など、様々な要素が分化傾向に影響を及ぼすと考えられる。このように様々な要素が絡む 3 次元培養内の培養環境の検討では、従来の胚葉体培養法や他の 3 次元培養法では大きさを制御できないため、何が影響しているのか検討するのが難しいが、中空糸培養法では細胞凝集塊の厚みを制御できるため、一定の条件による培養検討が可能である。このメリットを生かし、今後は酸素濃度分布だけでなく、様々な要素を考慮した検討を行うことで細胞凝集塊内部の培養環境を明らかにすることが可能になると考えられる。

また、本検討における自発的分化培養下において内胚葉分化誘導因子である Activin A を添加した予備検討では、本検討の結果よりも内胚葉遺伝子マーカー *SOX17* の発現量が増加傾向にあったことから、Activin A の添加により内胚葉分化がより促進されたことが示唆された。本検討では、肝分化誘導後の中空糸ではアンモニア除去能が低いレベルだったことから、中空糸内部の肝細胞割合が少ないことが示唆されたが、Activin A を添加することで内胚葉前駆細胞集団が本検討よりも増加し、肝分化誘導を行うことで肝細胞集団割合も増加し、結果的にアンモニア除去能といった肝機能も向上するのではないかと考えられる。

ここで、Activin A を添加した予備検討では、肝分化誘導段階において内径の小さい中空糸の方が *CXCR4* や *SOX17* の遺伝子発現量が高かった。これは自発的分化培養を用いた本検討の結果とは異なるため、分化誘導因子を添加した場合には中空糸内部への分化誘導因子の拡散を考慮する必要がある。今後は同じ膜材質・異なる中空糸径を用いることにより、1 条件を変えて中空糸内部への拡散を検討することで、Activin A 添加時に適切な中空糸径を最適化していく必要がある。

このように、分化誘導因子添加の有無や、それに伴う中空糸径の最適化を検討することにより、内胚葉前駆細胞の大量獲得が可能になると期待できる。さらに、これらの内胚葉前駆細胞を中空糸に再播種して肝分化誘導を行うことで、高純度の肝細胞集団を獲得することが可能となる。中空糸に再播種することで肝細胞集団だけでなく、3 次元の肝細胞組織体としても獲得することが可能であると考えられる。これらの肝細胞集団や 3 次元肝細胞組織体は、移植としての細胞源だけでなく人工肝臓装置等の新たなアプリケーションへの応用にも繋がると期待できる。

さらに、内胚葉は肝臓だけでなく胃や腸や膵臓など、他の臓器細胞にも分化していく可能性を有しているため、中空糸培養法により得られた内胚葉前駆細胞集団を他臓器細胞への分化誘導へと展開することが可能である。また、本検討により内径の小さい中空糸では外胚葉へ、内径の大きい中空糸では中内胚葉へと分化していく傾向を示したことから、異なる中空糸径を利用することにより、中胚葉や外胚葉への分化誘導が可能となり、中胚葉由来である心臓や骨などの臓器細胞、外胚葉由来である神経や皮膚などの臓器細胞への分化誘導が可能である。これらのように、中空糸培養法は、肝臓だけでなく様々な臓器細胞への分化展開が期待できるため、肝再生医療には留まらないバリエーション豊かな再生医療へ貢献できると考えられる。

参考文献

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 126(4): 663-76. 2006.
2. 渥美和彦. 人工臓器 不老不死の時代は来るか. 東京書籍. 1990.
3. 中井益代, 山本三毅夫, 山本直樹, 坂井建雄. Imidas Special Issue 人体とウイルス. 集英社. 1996.
4. 酒井清孝. 人工臓器(2)代謝系人工臓器. (株)コロナ社. 2003.
5. 水野美淳, 田代仁正, 大河原久子. 肝臓と膵臓のはなし. (株)培風館. 1990.
6. Novikoff, A.B, Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat: staining reactions, J Histochem Cytochem, 7(4): 240-244. 1959.
7. 内田俊和. 最新肝臓病理学. 羊土社. 1999.
8. 織田敏次. 肝臓の生物学. 東京大学出版. 1990.
9. 福田 晃也, 柳 佑典, 清水 誠一, 内田 孟, 阪本 靖介, 中村 和昭, 梅澤 明弘, 堀川 玲子, 笠原 群生. 尿素サイクル異常症に対するヒトES細胞由来肝細胞移植. 移植 55(総会臨時): 226-226. 2020.
10. Poyck PP, Hoekstra R, van Wijk AC, Attanasio C, et al. Functional and Morphological Comparison of Three Primary Liver Cell Types Cultured in the AMC Bioartificial Liver. LIVER TRANSPLANTATION. 13: 589-598. 2007.
11. Doi I. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. Gann.67:1-10. 1976.
12. Nyberg SL, Remmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, et al. Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. Ann Surg.220:59-67. 1994.
13. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. Science. 287(5456): 1258-62. 2000.
14. Totsugawa T, Yong C, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, et al. Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination. J Hepatol. 47(1): 74-82. 2007.
15. Li J, Li LJ, Cao HC, Sheng GP, et al. Establishment of highly differentiated immortalized human hepatocyte line with simian virus 40 large tumor antigen for liver based cell therapy. ASAIO J. 51(3): 262-8. 2005.
16. Schippers IJ, Moshage H, Roelofsen H, Müller M, et al. Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-) differentiation. Cell Biol Toxicol. 13(4-5): 375-86. 1997.
17. Werner A, Duvar S, Müthing J, Büntemeyer H, et al. Cultivation and characterization of a new immortalized human hepatocyte cell line, HepZ, for use in an artificial liver support system. Ann

N Y Acad Sci. 875: 364-368. 1999

18. Okitsu T, Kobayashi N, Jun HS, Shin S, et al. Transplantation of reversibly immortalized insulin-secreting human hepatocytes controls diabetes in pancreatectomized pigs. Diabetes. 53:105-12. 2004.
19. Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka. Cell choice for bioartificial livers. Keio J Med. 52(3): 151-157. 2003.
20. Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. Stem Cells.24:1852-8. 2006.
21. Asahina K, Fujimori H, Shimizu-Saito K, Kumashiro Y, Okamura K, Tanaka Y, et al. Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. Genes Cells.9:1297-308. 2004.
22. Alison MR, Golding MH, Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. Cell Prolif.29:373-402. 1996.
23. Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. Clin Sci (Lond).103:355-69. 2002.
24. Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. Pathology.33:130-41. 2001.
25. Omori M, Evarts RP, Omori N, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of alpha-fetoprotein and stem cell factor/c-kit system in bile duct ligated young rats. Hepatology.25:1115-22. 1997.
26. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. Hepatology.27:433-45. 1998.
27. Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, et al. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. Am J Pathol.163:3-9. 2003.
28. He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. Cell Prolif.37:177-87. 2004.
29. Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. J Cell Sci.116:1775-86. 2003.
30. Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. Hepatology.48:1598-607. 2008.
31. Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. Cancer Res.51:2611-20. 1991.
32. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature.292:154-6. 1981.
33. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science.282:1145-7. 1998.

34. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell.131:861-72. 2007.
35. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science.321:1218-21. 2008.
36. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science.318:1920-3. 2007.
37. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res.104:e30-41. 2009.
38. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science.322:949-53. 2008.
39. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell.4:472-6. 2009.
40. Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, et al. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. Exp Cell Res. 229:27-34. 1996.
41. Levinson-Dushnik M, Benvenisty N. Involvement of hepatocyte nuclear factor 3 in endoderm differentiation of embryonic stem cells. Mol Cell Biol. 17:3817-22. 1997.
42. Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. Exp Physiol.85:645-51. 2000.
43. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. Stem Cells.20:146-54. 2002.
44. Kumashiro Y, Asahina K, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Kida Y, et al. Enrichment of hepatocytes differentiated from mouse embryonic stem cells as a transplantable source. Transplantation.79:550-7. 2005.
45. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. FEBS Lett.497:15-9. 2001.
46. Hu AB, Cai JY, Zheng QC, He XQ, Shan Y, Pan YL, et al. High-ratio differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes in vitro. Liver Int.24:237-45. 2004.
47. Jochheim A, Hillemann T, Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, et al. Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. Int J Dev Biol.48:23-9. 2004.
48. Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, et al. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. Cell Transplant.13:197-211. 2004.
49. Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas.

Science.322:1490-4. 2008.

50. Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD, Minowada G, Kaestner KH, Martin GR, et al. An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. Dev Cell.11:339-48. 2006.
51. Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM, Deutsch GH. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. Development.132:35-47. 2005.
52. Huang H, Ruan H, Aw MY, Hussain A, Guo L, Gao C, et al. Mypt1-mediated spatial positioning of Bmp2-producing cells is essential for liver organogenesis. Development.135:3209-18. 2008.
53. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. Dev Cell.18:175-89. 2010.
54. Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. Stem Cells.27:577-605. 2009.
55. Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. Development.131:1651-62. 2004.
56. Xin Cheng, Lei Ying, Lin Lu, Aline M. Galvão, Jason A. Mills, Henry C, et al. Self-Renewing Endodermal Progenitor Lines Generated from Human Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell.10 (4):371-84.2012.
57. Ishizaka S, Shiroi A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, et al. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. FASEB J.16:1444-6. 2002.
58. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, et al. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. Mol Ther.20:127-37. 2012.
59. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, et al. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1alpha transduction. J Hepatol.57:628-36. 2012.
60. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. Cell Transplant.12:1-11. 2003.
61. Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. Gastroenterology.136:990-9. 2009.
62. Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. Proc Natl Acad Sci U S A.105:12301-6. 2008.
63. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriguen A, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. Stem Cells.26:894-902. 2008.

64. Dziadek M, Adamson E. Localization and synthesis of alphafoetoprotein in post-implantation mouse embryos. J Embryol Exp Morph. 43:289–313. 1978
65. Meehan RR., Barlow DP, Hill RE., Hogan BLM, Hastie N.D. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. EMBO J. 3:1881–1885. 1984
66. Sellem CH., Frain M., Erdos T, Sala-Trepat JM. Differential expression of albumin and α-fetoprotein genes in fetal tissues of mouse and rat. Dev Biol. 102:51–60. 1984.
67. Duncan SA., Nagy A, Chan W. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4−/– embryos. Development. 124:279–287. 1997
68. Cormier JT, zur Nieden NI, Rancourt DE, Kallos MS. Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. Tissue Eng.12:3233-45. 2006.
69. Krawetz R, Taiani JT, Liu S, Meng G, Li X, Kallos MS, et al. Large-scale expansion of pluripotent human embryonic stem cells in stirred-suspension bioreactors. Tissue Eng Part C Methods.16:573-82. 2010.
70. Amit M, Chebath J, Margulets V, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, et al. Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rev.6:248-59. 2010.
71. Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, Bjorquist P, et al. Microencapsulation technology: a powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. PLoS One.6:e23212. 2011.
72. Paccola Mesquita FC, Hochman-Mendez C, Morrissey J, Sampaio LC, Taylor D. A. Laminin as a Potent Substrate for Large-Scale Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Closed Cell Expansion System. Stem Cells Int. 2019: Article ID 9704945. 2019
73. Oh SK, Fong WJ, Teo Y, Tan HL, Padmanabhan J, Chin AC, et al. High density cultures of embryonic stem cells. Biotechnol Bioeng. 91:523-33. 2005.
74. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, et al. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 425:321-327. 2012.
75. Matsuura K, Masuda S, Shimizu T. Cell Sheet-Based Cardiac Tissue Engineering, Anat. Rec. (Hoboken). 297:65-72. 2014.
76. Mizumoto H, Ishihara K, Nakazawa K, Ijima H, Funatsu K, Kajiwara T. A new culture technique for hepatocyte organoid formation and long-term maintenance of liver-specific functions. Tissue Eng Part C Methods.14:167-75. 2008.
77. Amimoto N, Mizumoto H, Nakazawa K, Ijima H, Funatsu K, Kajiwara T. Hepatic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells During Organoid Formation in Hollow Fibers. Tissue Engineering Part A. 17(15-16): 831-839, 2011.
78. Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, et al. Molecular pathway and cell state

responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 7(2):225-239. 2010.

79. Otsuji TG, Bin J, Yoshimura A, Tomura M, Tateyama D, et al. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. Stem Cell Rep, 2: 734-745. 2014.
80. Van Winkle AP, Gates I., Kallos MS. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. Cells Tissues Organs. 196:34-47. 2012.
81. Sepulveda DE, Andrews BA., Asenjo JA., Papoutsakis ET. Comparative transcriptional analysis of embryoid body versus twodimensional differentiation of murine embryonic stem cells. Tissue Eng. Part A. 14:1603-1614. 2008.
82. Kim MH, Kino-oka M. Maintenance of an undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells through migration-dependent regulation of the balance between cell-cell and cell-substrate interactions. J. Biosci. Bioeng. 119: 617-622. 2015.
83. Kim MH, Kino-oka M. Switching between self-renewal and lineage commitment of human induced pluripotent stem cells via cell-substrate and cell-cell interactions on a dendrimer-immobilized surface. Biomaterials. 35:5670-5678. 2014.
84. Davenport C, Diekmann U, Naujok O. A Quick and Efficient Method for the Purification of Endoderm Cells Generated from Human Embryonic Stem Cells. J Vis Exp. 109:53655. 2016
85. Moon SH, Ju J, Park SJ, Bae D, Chung HM, Lee SH. Optimizing human embryonic stem cells differentiation efficiency by screening size-tunable homogenous embryoid bodies. Biomaterials. 35(23):5987-5997. 2014
86. Choi YY, Chung BG, Lee DH, Khademhosseini A, Kim JH, Lee SH. Controlled-size embryoid body formation in concave microwell arrays. Biomaterials. 31(15):4296-43303. 2010
87. Niebruegge S, Bauwens CL, Peerani R, et al. Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. Biotechnol Bioeng. 102(2):493-507. 2009.
88. Kim JM, Moon SH, Lee SG, et al. Assessment of Differentiation Aspects by the Morphological Classification of Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells Dev. 20(11):1925-35. 2011.
89. Soldatenkov VA, Prasad S, Voloshin Y, Dritschilo A. Sodium butyrate induces apoptosis and accumulation of ubiquitinated proteins in human breast carcinoma cells. Cell Death Differ. 5(4):307-12. 1998.
90. Okudaira T, Yabuta R, Mizumoto H, Kajiwara T. Fabrication of a fiber-type hepatic tissue by bottom-up method using multilayer spheroids. J Biosci Bioeng. 123(6):739-747. 2017.

謝辞

本研究を行うにあたり、的確な御指導を賜るとともに、専門的な立場からときに優しく、ときに厳しく、丁寧かつ的確に御指導頂きました九州大学大学院工学研究院化学工学部門　水本 博 准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、種々の有益な御助言を賜りました九州大学大学院工学研究院機械工学部門　工藤 奨 教授、九州大学大学院工学研究院化学工学部門　井嶋 博之 教授、に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、的確な御指導を賜るとともに、広い視野を持つことの重要性と、常に高いレベルを意識することの大切さを教えて下さった九州大学大学院工学研究院化学工学部門　梶原 稔尚 教授に厚く御礼申し上げます。

研究を行うことの意義を教えて頂き、異なる視点からアドバイスを下さった九州大学大学院工学研究院化学工学部門　名嘉山 祥也 准教授に厚く御礼申し上げます。

研究室に所属した当初から、いつも身近な先輩として相談に乗って頂き、時には厳しく指導して下さった、奥平達也氏（現 アステラス製薬株式会社)、中野優氏（現 テルモ株式会社)、藤井祐輔氏（現 株式会社 Atomis）に深く感謝申し上げます。

また後輩の指導にも精力的に協力し、共に研究活動に勤しんだ、劉懐旭氏、岳玥氏（本学大学院博士課程)、伊藤恵氏、大賀美帆氏、小出慎之佑氏、千歳皓平氏、吉田隆晃氏、盛建凱氏、李伊童氏、付雪氏(本大学大学院修士課程 2 年)、石橋知樹氏、佐々木浩二氏、志藤千紘氏、塚本壮太郎氏、三好啓太郎氏、呂博氏（本大学大学院修士課程 1 年)、木村颯氏、佐々木慧氏、谷口諒氏、中野翔太氏、湯本朝海氏（本大学 4 年）には感謝するとともに今後の活躍を期待しております。

最後に学生生活を支えてくれた、またこれからの社会人生活も支えてくれる家族をはじめ、親族の皆様、友人に感謝し謝辞といたします。