

層状組織形成過程における
マウス胚性幹細胞の多能性状態の領域特異性

安藤 悠太

目次

第1章 緒論.....	1
1.1 多能性幹細胞による多細胞組織形成.....	1
1.2 細胞接着場の調節による領域特異的な多能性状態変化.....	2
1.3 組織形状制御による組織形成過程の理解.....	4
1.4 研究の目的.....	5
参考文献.....	7
第2章 多能性維持培養条件に応じた層状組織形成.....	13
2.1 緒言.....	13
2.2 実験方法.....	15
2.2.1 マウス ES 細胞の多能性維持培養.....	15
2.2.2 微細加工メッシュ構造基板の作製と細胞培養.....	15
2.2.3 免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察.....	17
2.2.4 画像解析による層状組織形成の定量評価.....	17
2.2.5 蛍光活性化セルソーティング.....	18
2.3 実験結果.....	18
2.3.1 基底状態およびナイーブ状態の細胞による層状組織形成.....	18
2.3.2 基底状態様の細胞群による不連続な層状組織形成.....	22
2.3.3 層状組織形成におけるナイーブ状態の細胞の寄与.....	24
2.4 考察.....	26
2.5 結言.....	28
参考文献.....	28
第3章 層状組織形成に伴う多能性状態の変化.....	31
3.1 緒言.....	31

3.2 実験方法.....	32
3.2.1 マウス ES 細胞の多能性維持培養.....	32
3.2.2 微細加工メッシュ構造基板の作製と細胞培養.....	33
3.2.3 免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察.....	33
3.2.4 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析.....	35
3.3 実験結果.....	35
3.3.1 組織形成誘導に伴う層状組織の形状変化.....	35
3.3.2 層状組織形成過程における遺伝子発現の変化.....	39
3.3.3 多能性状態の変化を示すタンパク質の発現.....	47
3.4 考察.....	50
3.5 結言.....	55
参考文献.....	56
第 4 章 組織形状制御による多能性状態の領域特異性の理解.....	59
4.1 緒言.....	59
4.2 実験方法.....	60
4.2.1 マウス ES 細胞の多能性維持培養.....	60
4.2.2 微細加工メッシュ構造基板の作製と細胞培養.....	61
4.2.3 免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察.....	62
4.2.4 マウス ES 細胞の安定トランスフェクション.....	63
4.2.5 レーザーアブレーションによる組織内力学状態の評価.....	64
4.2.6 画像解析による細胞核形状とタンパク質発現の定量評価.....	64
4.2.7 RT-qPCR による遺伝子発現解析.....	65
4.3 実験結果.....	67
4.3.1 層状組織における組織形状に応じた多能性状態.....	67
4.3.2 島状メッシュ構造基板が誘導するエッジ領域形成.....	72
4.3.3 エッジ領域特異的な組織内力学状態と多能性状態の関係.....	75
4.3.4 エッジ領域特異的な多能性消失関連遺伝子の発現.....	81

4.4 考察.....	84
4.5 結論.....	86
参考文献.....	87
第5章 結論.....	91
5.1 本論文のまとめ.....	91
5.2 今後の展望.....	94
関連業績.....	96
謝辞.....	99

第 1 章

緒論

1.1 多能性幹細胞による多細胞組織形成

多能性幹細胞は、自己複製能と多分化能を有する細胞であり、適切な誘導により三胚葉すべての細胞へと分化できる。特に、胚性幹細胞（ES 細胞）が胚盤胞の内部細胞塊から樹立され[1-1, 1-2, 1-3]、体細胞をリプログラミングすることで人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を作製することが可能になって[1-4, 1-5]以来、安定した多能性維持や効率的な分化誘導のための培養技術が活発に開発されてきた。多能性幹細胞には、生体内における発生段階に対応したナイーブ（naïve）型やプライム（prime）型と呼ばれる多能性状態が存在することが明らかにされている[1-6]。マウスとヒトの ES・iPS 細胞においては、これらの多能性状態の違いにより、多能性維持培養条件が異なり、遺伝子発現プロファイルやコロニー形状なども異なる。ナイーブ型多能性幹細胞であるマウス ES 細胞の場合、多能性を規定する遺伝子群として、OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF4 などの転写因子ネットワークが重要であることがわかっている[1-7]。また、マウス ES 細胞の多能性は、白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor; LIF）を培養液に添加することにより、複数のシグナル伝達経路を介して維持され、これによってフィーダー細胞フリーでの培養が可能となっている[1-8]。

細胞集団に *in vitro* で自律的に多細胞組織を形成させるため、従来では単一細胞として独立した状態で培養されてきた細胞を凝集させることで組織形成を誘導する手法が、近年盛んに用いられるようになってきた。このような過程において見られる、細胞集団が自律的に秩序を生みながら多細胞組織を形成する現象は自己組織化と呼ばれ、複雑な多細胞システムの時空間的な発展を理解しようとする研究が進められている[1-9]。中でも、多能性幹細胞は、初期胚発生過程を模倣して自己組織化する能力を有することから、多細胞組織の構築素材としての活用が期待されている。特に、生体の器官同様の機能や形態を有するオルガノイドに代表されるような多細胞組織については、再生医療・創薬や発生生物学研究への応用が期待されていることから、さまざまな構築手法が開発され

ている[1-10]. 例として, マウス ES 細胞を, 低接着性の基板を用いて無血清培養液中で球状の細胞凝集塊を形成させることにより, 頂端-基底極性をもつ神経上皮組織を構築できることが報告された[1-11]. さらに, この手法を用いて網膜前駆組織への分化に適した条件で培養すると, 神経上皮組織の一部が突出し次いで陥入することにより, 網膜前駆組織を含む眼杯様組織が自己組織的に形成されることが示された[1-12, 1-13]. これらの報告を皮切りに, 2010 年代以降, 多能性幹細胞の集団から, 大脳, 腸, 肝臓, 腎臓など, さまざまな器官を模したオルガノイドが作製できることが次々と報告された[1-14, 1-15, 1-16, 1-17]. さらに, 初期胚発生を模倣した培養環境を実現することにより, 胚盤胞オルガノイドが作製可能であることが報告された[1-18, 1-19, 1-20, 1-21]. その後, ヒト iPS 細胞などを用いて, 胚盤胞オルガノイドを作製し, 初期胚発生を *in vitro* で再現することが技術的に可能になりつつある[1-22, 1-23, 1-24]. このようなオルガノイドの構築においては, 共通して, 適切な細胞種を用いた上で, 胚発生過程を模した培養環境を実現することにより, 細胞間相互作用を介して多細胞組織への組織形成を誘導している[1-25, 1-26]. したがって, 多能性幹細胞の集団に対して培養環境を調節することにより, 多能性幹細胞が有する組織形成能力を引き出すことで, 組織形成を誘導することができると言える.

1.2 細胞接着場の調節による領域特異的な多能性状態変化

多能性幹細胞の集団に対して組織形成を誘導するためには, 培養環境を適切に調節することが必要である. そのための手法として, 従来では, 胚発生過程における生化学的な環境を模倣するために, 培養液の組成を調節し, シグナル分子などの生化学的因子を段階的に培養液に添加するアプローチが取られてきた. この手法に加えて, 基質の剛性や培養面の形状などの細胞接着に関わる因子を調節することも重要であることがわかってきた[1-27]. このような細胞接着場の調節には, 微細加工を用いて作製した培養基板を用いる工学的アプローチが有効である. 実際に, 第 1.1 節で述べたような, 近年の多能性幹細胞の組織形成誘導手法の進歩は, これらの生化学的・工学的アプローチを組み合わせることによって実現してきたと言える. 例として, 微細構造を有する培養基板上で多能性幹細胞を培養することで, 自己組織的に初期胚に似た多細胞組織が形成される現象が発見され[1-28], さらにマイクロ流体デバイスとゲルを用いてシグナル分子

による刺激を空間的に調節することで、さらなる組織形成と分化が進行することが報告された[1-29]. このように、細胞接着場を調節する工学的アプローチは、細胞接着を介した細胞集団の挙動や、構築される組織全体の形状を制御することを可能とするため、将来的に複雑な多細胞組織を構築するための手法として有用である。

細胞接着場の調節が、多能性幹細胞の状態変化に与える影響について理解するために、細胞接着場により作り出される力学環境に着目したメカノバイオロジー・バイオメカニクス研究が進められてきた。多能性幹細胞の維持培養においては、細胞-基質間接着や細胞-細胞間接着の形成が多能性状態の維持に関わることが示されている[1-30, 1-31]. 特に、培養基板表面の細胞外基質に依存して多能性状態が変化することはよく知られている[1-32, 1-33]. また、多能性幹細胞に対する単一細胞スケールの研究においては、焦点接着斑や細胞骨格のメカノトランスダクションを介した細胞動態や遺伝子発現の変化が調べられている[1-34, 1-35]. 多能性維持や分化誘導に関わる力学環境を調べるためには、他の細胞種を用いた研究と同様に、多能性幹細胞に対して力学刺激を与える研究や剛性を計測する研究が多数行われてきた[1-36, 1-37, 1-38, 1-39]. さらに、微細加工により作製した培養基板を用いることで、基質の剛性や培養面の形状などの細胞接着場を調節し、多能性状態の変化を解析する研究も多くなされている[1-40, 1-41, 1-42, 1-43]. 一方、生体内の胚発生過程においては、初期胚における細胞運命の決定において細胞接着場や組織内力学状態が重要な役割を担っていることが判明している[1-44, 1-45]. したがって、多能性幹細胞の *in vitro* における組織形成過程においても、工学的アプローチによる細胞接着場の調節が、どのように組織内力学状態に影響し、組織を形成する細胞集団の多能性状態を変化させるかを理解することが重要となる。

多能性幹細胞による組織形成過程においては、細胞接着場の調節により、形成される組織において領域特異的な多能性状態の変化が生じることが特徴である。例えば、微細加工により作製した培養面パターン基板を用いて多能性幹細胞のコロニーを培養し、分化を誘導すると、三胚葉への分化が秩序を有した分布とともに現れることが報告された[1-46, 1-47]. また、同様の培養面パターン基板上においてコロニーに対し分化を誘導すると、細胞接着場により作り出される組織内力学状態により細胞間相互作用が変化し、領域特異的な組織形成と分化が自律的に進行することが示された[1-48, 1-49]. さらに、培養面パターン基板上のコロニーに対して管状の立体組織を形成させ、分化を誘導すると、組織内部に神経管様の立体組織が自己組織的に形成されることが報告された[1-50]. これらの研究において明らかにされた組織の領域特異的な変化は、細胞接着場の調節が組織内力学状態に影響を与え、領域特異的に多能性状態を変化させることにより引き起こされていると考えることができる。しかし、分化誘導条件下においては、細胞間相互

作用が複雑であるために、多能性状態の変化を理解することは困難である。したがって、分化誘導によらず、細胞接着場の調節のみにより多能性幹細胞の組織形成を誘導することで、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態の変化に及ぼす影響を理解すれば、多能性幹細胞を用いた組織構築手法の発展に資する知見が得られると考えられる。

1.3 組織形状制御による組織形成過程の理解

多細胞組織の形成過程における組織内力学状態と領域特異的な状態変化を解析するためには、組織形成過程の観察が容易な実験系の活用が必要である。そのために、微細構造培養基板を用いて細胞接着が可能な領域を制限することにより組織形状を制御し、特定の形状を有する組織の形成を促す手法が、主に組織工学分野で使われてきた。例えば、細胞増殖による組織成長を観察するために、微細加工により作製した窪みに線維芽細胞を播種することで、細胞骨格の発達を伴いながら窪みを埋めるように張り出した組織が形成される培養基板が用いられた[1-51]。また、曲面上に骨芽細胞様細胞を播種すると、組織が次第に成長し、細胞張力によって規定される組織形状をなすことが示された[1-52, 1-53]。さらに、網目をもつ足場に骨芽細胞様細胞を播種することにより形成される細胞シートの成長過程を観察し、数理モデルを用いた解析と組み合わせることで、細胞増殖や細胞挙動の影響を明らかにした研究も報告された[1-54, 1-55]。一方、上皮細胞シートの組織形状を足場により制御することで、組織変形に伴う組織内力学状態の解析を行った研究が複数報告されている[1-56, 1-57]。同様に、多能性幹細胞から作製したオルガノイドを用いた研究では、力学モデルを用いて組織変形過程を解析することにより、組織形成における組織内力学状態の役割を明らかにしようとしている[1-12, 1-58, 1-59]。このような解析を容易にするために、微細加工により作製した基板を用いて、脳オルガノイドの組織成長方向に拘束を与えることで、多細胞組織の変形過程の観察が容易な培養環境を実現する手法も報告されている[1-60]。また、微細構造培養基板を用いて多能性幹細胞の組織成長に拘束を与え、細胞挙動を制御することで、組織内の多能性状態の変化を調べた先行研究も報告されている[1-61, 1-62]。以上のように、微細構造培養基板を用いて組織形状を制御することにより、組織内力学状態と領域特異的な多能性状態の変化の両者の観察が容易になり、多能性幹細胞の組織形成過程を理解することが可能になると考えられる。

微細構造培養基板を用いた細胞接着場の調節のうち、細胞接着が可能な領域を制限する手法を用いることにより、組織形状を制御すると同時に、細胞-細胞間接着による細胞間相互作用を促して組織形成を誘導できると考えられる。実際に、細胞接着領域を制限した培養面パターン基板に線維芽細胞を播種すると、パターン外への水平方向の組織成長が制限され、脱分化を伴いながら立体組織を形成することが報告された[1-63, 1-64]。また、Okeyo ら[1-65]により開発された微細加工メッシュ構造基板を用いることで、細胞接着が可能な領域を制限し、さまざまな細胞種に対して細胞シートの形成を誘導できることが示されており、その組織形成過程が観察されている。微細加工メッシュ構造基板は、幅約 5 μm 、厚さ約 2 μm の細線が、数十 μm から数百 μm の非常に大きな開口部をもつ網目をなしている微細構造基板であり、スペーサーを用いて培養皿底面から離して培養液中に設置し、その上に細胞を播種することにより、細胞接着が可能な領域を細線上のみに制限する細胞培養基板である。これまでの先行研究により、ヒト iPS 細胞に対して、生化学的因子による刺激を与えずに、栄養芽細胞様細胞からなる囊胞状立体組織への自己組織化を誘導できることが示されている[1-66, 1-67, 1-68]。また、メッシュ構造基板を用いることで、筋芽細胞株に細胞シート形成を誘導するのみならず、細胞シートにおける細胞配向性が制御可能であることが示されており、組織内力学状態を制御できる可能性が示唆されている[1-69]。したがって、このメッシュ構造基板を用いて細胞接着場を調節すれば、多能性幹細胞の集団に平面的な成長を促すことで、組織形成過程の観察が容易な層状組織の形成を誘導し、さらに、層状組織における領域特異的な多能性状態の変化を誘導できると期待される。

1.4 研究の目的

本章で述べてきたように、多能性幹細胞の集団に対して細胞接着場を調節することにより、自律的な多細胞組織形成を誘導することが可能になってきたが、その過程については理解が不十分である。特に、多能性幹細胞の組織形成過程では、組織形成に伴う組織内力学状態に応じて領域特異的に多能性状態が変化することが重要であると考えられる。しかし、細胞接着場の調節が領域特異的な状態変化に及ぼす影響については、細胞間相互作用が複雑であるために十分に理解が進んでいない。そこで、本論文では、Okeyo ら[1-65]により開発された微細加工メッシュ構造基板を用いた多能性幹細胞の組

組織形成誘導手法をより発展させ、層状組織形成過程における多能性状態の領域特異性に着目して研究を行った。このメッシュ構造基板を用いることにより、観察が容易な層状組織形成を誘導し、同時に、マウス ES 細胞に内在する、初期胚発生過程において領域特異化を生み出す能力を引き出すことで、その性質を理解することを目指した。

本論文の目的は、マウス ES 細胞の組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が組織内力学状態により生じることを明らかにすることである。そのために、メッシュ構造基板を用いて細胞接着場を調節することにより、マウス ES 細胞に対して層状組織形成を誘導し、形成された層状組織における領域特異的な多能性状態を調べている。これにより、細胞接着場の調節により作り出される組織内力学状態が、層状組織形成過程における多能性状態変化の領域特異性に及ぼす影響を明らかにすることを目指す。

本論文は全 5 章により構成されている。第 1 章では、本論文の緒論として、研究の背景と目的を述べた。第 2 章では、マウス ES 細胞の維持培養条件により定まる多能性状態に応じて、組織形成能力が異なることを検証するため、メッシュ構造基板を用いて平面的な組織成長を促すことで層状組織の形成を誘導し、多能性状態の影響を調べている。第 3 章では、細胞接着場の調節により誘導される層状組織形成過程において、マウス ES 細胞に生じる多能性状態の変化を明らかにするため、メッシュ構造基板上における層状組織形成に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、多能性状態変化を示すタンパク質の発現を調べている。第 4 章では、マウス ES 細胞の層状組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が、組織内力学状態により生じることを示すため、新たに設計した島状メッシュ構造基板を用いて層状組織の組織形状を制御することで、領域特異的な組織内力学状態と多能性状態の関係を調べている。以上のように、本論文は、第 2 章、第 3 章、第 4 章を通して、微細構造培養基板を用いて細胞接着場を調節することにより、マウス ES 細胞に対して層状組織形成を誘導し、その形成過程における組織内力学状態に応じた多能性状態の領域特異性を調べたものである (Figure 1-1)。第 5 章は結論であり、本論文のまとめと展望を記述している。

Modulation of adhesion microenvironment
using microstructured mesh substrates

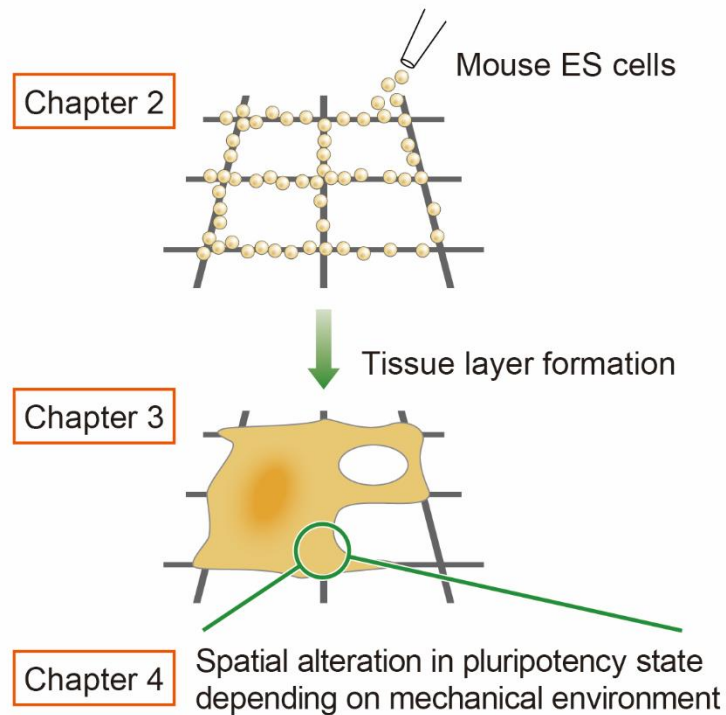


Figure 1-1 | Outline and relationship among chapters 2-4 of this dissertation. The objective of this dissertation is to characterize the spatial alteration in pluripotency state of mouse embryonic stem cells during tissue layer formation.

参考文献

- 1-1. M. J. Evans, M. H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 292, 154-156 (1981).
- 1-2. G. R. Martin, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 7634-7638 (1981).
- 1-3. J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S.

- Marshall, J. M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282, 1145-1147 (1998).
- 1-4. K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126, 663-676 (2006).
 - 1-5. K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 131, 861-872 (2007).
 - 1-6. J. Nichols, A. Smith, Naive and primed pluripotent states, *Cell Stem Cell*, 4, 487-492 (2009).
 - 1-7. A. De Los Angeles, F. Ferrari, R. Xi, Y. Fujiwara, N. Benvenisty, H. Deng, K. Hochedlinger, R. Jaenisch, S. Lee, H. G. Leitch, M. William Lensch, E. Lujan, D. Pei, J. Rossant, M. Wernig, P. J. Park, G. Q. Daley, Hallmarks of pluripotency, *Nature*, 525, 469-478 (2015).
 - 1-8. H. Niwa, K. Ogawa, D. Shimosato, K. Adachi, A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells, *Nature*, 460, 118-122 (2009).
 - 1-9. Y. Sasai, Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture, *Nature*, 493, 318 (2013).
 - 1-10. T. Takebe, J. M. Wells, Organoids by design, *Science*, 364, 956-959 (2019).
 - 1-11. M. Eiraku, K. Watanabe, M. Matsuo-Takasaki, M. Kawada, S. Yonemura, M. Matsumura, T. Wataya, A. Nishiyama, K. Muguruma, Y. Sasai, Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals, *Cell Stem Cell*, 3, 519-532 (2008).
 - 1-12. M. Eiraku, N. Takata, H. Ishibashi, M. Kawada, E. Sakakura, S. Okuda, K. Sekiguchi, T. Adachi, Y. Sasai, Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture, *Nature*, 472, 51-56 (2011).
 - 1-13. M. Eiraku, Y. Sasai, Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues, *Nat. Protocols*, 7, 69-79 (2012).
 - 1-14. M. A. Lancaster, J. A. Knoblich, Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies, *Science*, 345, 1247125 (2014).
 - 1-15. H. Clevers, Modeling development and disease with organoids, *Cell*, 165, 1586-1597 (2016).
 - 1-16. A. Fatehullah, S. H. Tan, N. Barker, Organoids as an in vitro model of human development and disease, *Nat. Cell Biol.*, 18, 246-254 (2016).
 - 1-17. M. Huch, J. A. Knoblich, M. P. Lutolf, A. Martinez-Arias, The hope and the hype of organoid research, *Development*, 144, 938-941 (2017).
 - 1-18. S. E. Harrison, B. Sozen, N. Christodoulou, C. Kyprianou, M. Zernicka-Goetz, Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro, *Science*, 356, eaal1810 (2017).
 - 1-19. N. C. Rivron, J. Frias-Aldeguer, E. J. Vrij, J.-C. Boisset, J. Korving, J. Vivié, R. K. Truckenmüller, A. van Oudenaarden, C. A. van Blitterswijk, N. Geijsen, Blastocyst-like structures generated solely from stem cells, *Nature*, 557, 106-111 (2018).

- 1-20. B. Sozen, A. L. Cox, J. D. Jonghe, M. Bao, F. Hollfelder, D. M. Glover, M. Zernicka-Goetz, Self-organization of mouse stem cells into an extended potential Blastoid, *Dev. Cell*, 51, 698-712 (2019).
- 1-21. C. Kime, H. Kiyonari, S. Ohtsuka, E. Kohbayashi, M. Asahi, S. Yamanaka, M. Takahashi, K. Tomoda, Induced 2C expression and implantation-competent blastocyst-like cysts from primed pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, 13, 485-498 (2019).
- 1-22. L. Yu, Y. Wei, J. Duan, D. A. Schmitz, M. Sakurai, L. Wang, K. Wang, S. Zhao, G. C. Hon, J. Wu, Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells, *Nature*, 591, 620-626 (2021).
- 1-23. X. Liu, J. P. Tan, J. Schröder, A. Aberkane, J. F. Ouyang, M. Mohenska, S. M. Lim, Y. B. Y. Sun, J. Chen, G. Sun, Y. Zhou, D. Poppe, R. Lister, A. T. Clark, O. J. L. Rackham, J. Zenker, J. M. Polo, Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids, *Nature*, 591, 627-632 (2021).
- 1-24. H. Kagawa, A. Javali, H. H. Khoei, T. M. Sommer, G. Sestini, M. Novatchkova, Y. S. op Reimer, G. Castel, A. Bruneau, N. Maenhoudt, J. Lammers, S. Loubersac, T. Freour, H. Vankelecom, L. David, N. Rivron, Human blastoids model blastocyst development and implantation, *Nature*, 601, 600-605 (2021).
- 1-25. X. Yin, B. E. Mead, H. Safaei, R. Langer, J. M. Karp, O. Levy, Engineering stem cell organoids, *Cell Stem Cell*, 18, 25-38 (2016).
- 1-26. J. Fu, A. Warmflash, M. P. Lutolf, Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation, *Nat. Mater.*, 20, 132-144 (2021).
- 1-27. L. M. Murrow, R. J. Weber, Z. J. Gartner, Dissecting the stem cell niche with organoid models: an engineering-based approach, *Development*, 144, 998-1007 (2017).
- 1-28. Y. Shao, K. Taniguchi, K. Gurdziel, R. F. Townshend, X. Xue, K. M. A. Yong, J. Sang, J. R. Spence, D. L. Gumucio, J. Fu, Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche, *Nat. Mater.*, 16, 419-425 (2017).
- 1-29. Y. Zheng, X. Xue, Y. Shao, S. Wang, S. N. Esfahani, Z. Li, J. M. Muncie, J. N. Lakins, V. M. Weaver, D. L. Gumucio, J. Fu, Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells, *Nature*, 573, 421-425 (2019).
- 1-30. Y. Hayashi, M. K. Furue, T. Okamoto, K. Ohnuma, Y. Myoishi, Y. Fukuhara, T. Abe, J. D. Sato, R.-I. Hata, M. Asashima, Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal, *Stem Cells*, 25, 33005-3015 (2007).
- 1-31. T. Redmer, S. Diecke, T. Grigoryan, A. Quiroga-Negreira, W. Birchmeier, D. Besser, E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming, *EMBO Rep.*, 12, 720-726 (2011).
- 1-32. A. Domogatskaya, S. Rodin, A. Boutaud, K. Tryggvason, Laminin-511 but not -332, -111, or -411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro, *Stem Cells*, 26, 2800-2809 (2008).
- 1-33. M. Caiazzo, Y. Okawa, A. Ranga, A. Piersigilli, Y. Tabata, M. P. Lutolf, Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency, *Nat. Mater.*, 15, 344-352 (2016).
- 1-34. C. Tamm, N. Böwer, C. Annerén, Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal

- by a Yes–YAP–TEAD2 signaling pathway downstream of LIF, *J. Cell Sci.*, 124, 1136-1144 (2010).
- 1-35. L. Yu, J. Li, J. Hong, Y. Takashima, N. Fujimoto, M. Nakajima, A. Yamamoto, X. Dong, Y. Dang, Y. Hou, W. Yang, I. Minami, K. Okita, M. Tanaka, C. Luo, F. Tang, Y. Chen, C. Tang, H. Kotera, L. Liu, Low cell-matrix adhesion reveals two subtypes of human pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, 11, 142-156 (2018).
 - 1-36. F. Chowdhury, S. Na, D. Li, Y.-C. Poh, T. S. Tanaka, F. Wang, N. Wang, Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells, *Nat. Mater.*, 9, 82-88 (2010).
 - 1-37. R. Horiuchi, T. Akimoto, Z. Hong, T. Uchida, Cyclic mechanical strain maintains Nanog expression through PI3K/Akt signaling in mouse embryonic stem cells, *Exp. Cell Res.*, 318, 1726-1732 (2012).
 - 1-38. S. Pagliara, K. Franze, C. R. McClain, G. W. Wylde, C. L. Fisher, R. J. M. Franklin, A. J. Kabla, U. F. Keyser, K. J. Chalut, Auxetic nuclei in embryonic stem cells exiting pluripotency, *Nat. Mater.*, 13, 638-644 (2014).
 - 1-39. Y. C. Poh, J. Chen, Y. Hong, H. Yi, S. Zhang, J. Chen, D. C. Wu, L. Wang, Q. Jia, R. Singh, W. Yao, Y. Tan, A. Tajik, T. S. Tanaka, N. Wang, Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell, *Nat. Commun.*, 5, 4000 (2014).
 - 1-40. G. Abagnale, A. Sechi, M. Steger, Q. Zhou, C.-C. Kuo, G. Aydin, C. Schalla, G. Müller-Newen, M. Zenke, I. G. Costa, P. van Rijn, A. Gillner, W. Wagner, Surface topography guides morphology and spatial patterning of induced pluripotent stem cell colonies, *Stem Cell Rep.*, 9, 654-666 (2017).
 - 1-41. B. G. David, H. Fujita, K. Yasuda, K. Okamoto, Y. Panina, J. Ichinose, O. Sato, M. Horie, T. Ichimura, Y. Okada, T. M. Watanabe, Linking substrate and nucleus via actin cytoskeleton in pluripotency maintenance of mouse embryonic stem cells, *Stem Cell Res.*, 41, 101614 (2019).
 - 1-42. C. F. Natale, T. Angrisano, L. Pistelli, G. Falco, V. Calabrò, P. A. Netti, M. Ventre, Topographic cues impact on embryonic stem cell Zscan4-metastate, *Frontiers in Bioeng. Biotech.*, 8, 178 (2020).
 - 1-43. S. Bertels, M. Jaggy, B. Richter, S. Keppler, K. Weber, E. Genthner, A. C. Fischer, M. Thiel, M. Wegener, A. M. Greiner, T. J. Autenrieth, M. Bastmeyer, Geometrically defined environments direct cell division rate and subcellular YAP localization in single mouse embryonic stem cells, *Sci. Rep.*, 11, 9269 (2021).
 - 1-44. N. Nishioka, K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R. O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E. M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa, H. Sasaki, The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass, *Dev. Cell*, 16, 398 (2009).
 - 1-45. R. Hiramatsu, T. Matsuoka, C. Kimura-Yoshida, S. Han, K. Mochida, T. Adachi, S. Takayama, I. Matsuo, External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos, *Dev. Cell*, 27, 131-144 (2013).
 - 1-46. A. Warmflash, B. Sorre, F. Etoc, E. D. Siggia, A. H. Brivanlou, A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells, *Nat. Methods*, 11, 847-

854 (2014).

- 1-47. S. M. Morgani, J. J. Metzger, J. Nichols, E. D. Siggia, A. K. Hadjantonakis, Micropattern differentiation of mouse pluripotent stem cells recapitulates embryo regionalized cell fate patterning, *eLife*, 7, e32839 (2018).
- 1-48. X. Xue, Y. Sun, A. M. Resto-Irizarry, Y. Yuan, K. M. A. Yong, Y. Zheng, S. Weng, Y. Shao, Y. Chai, L. Studer, J. Fu, Mechanics-guided embryonic patterning of neuroectoderm tissue from human pluripotent stem cells, *Nat. Mater.*, 17, 633–641 (2018).
- 1-49. J. M. Muncie, N. M. E. Ayad, J. N. Lakins, X. Xue, J. Fu, V. M. Weaver, Mechanical tension promotes formation of gastrulation-like nodes and patterns mesoderm specification in human embryonic stem cells, *Dev. Cell*, 55, 679-694 (2020).
- 1-50. E. Karzbrun, A. H. Khankhel, H. C. Megale, S. M. K. Glasauer, Y. Wyle, G. Britton, A. Warmflash, K. S. Kosik, E. D. Siggia, B. I. Shraiman, S. J. Streichan, Human neural tube morphogenesis in vitro by geometric constraints, *Nature*, 599, 268–272 (2021).
- 1-51. P. Kollmannsberger, C. M. Bidan, J. W. C. Dunlop, P. Fratzl, V. Vogel, Tensile forces drive a reversible fibroblast-to-myofibroblast transition during tissue growth in engineered clefts, *Sci. Adv.*, 4, eaao4881 (2018).
- 1-52. M. Rumpler, A. Woesz, J. W. C. Dunlop, J. T. van Dongen, P. Fratzl, The effect of geometry on three-dimensional tissue growth, *J. Royal Soc. Interface*, 5, 1173-1180 (2008).
- 1-53. S. Ehrig, B. Schamberger, C. M. Bidan, A. West, C. Jacobi, K. Lam, P. Kollmannsberger, A. Petersen, P. Tomancak, K. Kommareddy, F. D. Fischer, P. Fratzl, J. W. C. Dunlop, Surface tension determines tissue shape and growth kinetics, *Sci. Adv.*, 5, eaav9394 (2019).
- 1-54. P. R. Buenzli, M. Lanaro, C. S. Wong, M. P. McLaughlin, M. C. Allenby, M. A. Woodruff, M. J. Simpson, Cell proliferation and migration explain pore bridging dynamics in 3D printed scaffolds of different pore size, *Acta Biomaterialia*, 114, 285-295 (2020).
- 1-55. A. P. Browning, O. J. Maclaren, P. R. Buenzli, M. Lanaro, M. C. Allenby, M. A. Woodruff, M. J. Simpson, Model-based data analysis of tissue growth in thin 3D printed scaffolds, *J. Theoretical Biol.*, 528, 110852 (2021).
- 1-56. E. Latorre, S. Kale, L. Casares, M. Gómez-González, M. Uroz, L. Valon, R. V. Nair, E. Garreta, N. Montserrat, A. Del Campo, B. Ladoux, M. Arroyo, X. Trepast, Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape, *Nature*, 563, 203-208 (2018).
- 1-57. A. Trushko, I. D. Meglio, A. Merzouki, C. Blanch-Mercader, S. Abuhattum, J. Guck, K. Alessandri, P. Nassoy, K. Kruse, B. Chopard, A. Roux, Buckling of an epithelium growing under spherical confinement, *Dev. Cell*, 54, 655-668 (2020).
- 1-58. S. Okuda, N. Takata, Y. Hasegawa, M. Kawada, Y. Inoue, T. Adachi, Y. Sasai, M. Eiraku, Strain-triggered mechanical feedback in self-organizing optic-cup morphogenesis, *Sci. Adv.*, 4, eaau1354 (2018).
- 1-59. H. Takeda, Y. Kameo, Y. Inoue, T. Adachi, An energy landscape approach to understanding variety and robustness in tissue morphogenesis, *Biomech. Model Mechanobiol.* 19, 471–479 (2020).

- 1-60. E. Karzbrun, A. Kshirsagar, S. R. Cohen, J. H. Hanna, O. Reiner, Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding, *Nat. Phys.*, 14, 515-522 (2018).
- 1-61. W. Xie, B. Y. K. Binder, A. S. Khalil, S. K. Schmitt, H. J. Johnson, N. A. Zacharias, W. L. Murphy, Controlled self-assembly of stem cell aggregates instructs pluripotency and lineage bias, *Sci. Rep.*, 7, 14070 (2017).
- 1-62. N. Sagy, S. Slovin, M. Allalouf, M. Pour, G. Savyon, J. Boxman, I. Nachman, Prediction and control of symmetry breaking in embryoid bodies by environment and signal integration, *Development*, 146, dev181917 (2019).
- 1-63. B. Roy, S. Venkatachalapathy, P. Ratna, Y. Wang, D. S. Jokhun, M. Nagarajan, G. V. Shivashankar, Laterally confined growth of cells induces nuclear reprogramming in the absence of exogenous biochemical factors, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 115, E4741–E4750 (2018).
- 1-64. B. Roy, L. Yuan, Y. Lee, A. Bharti, A. Mitra, G. V. Shivashankar, Fibroblast rejuvenation by mechanical reprogramming and redifferentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 117, 10131-10141 (2020).
- 1-65. K. O. Okeyo, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, Minimization of cell-substrate interaction using suspended microstructured meshes initiates cell sheet formation by self-assembly organization, *Biomed. Phys. & Eng. Express*, 2, 065019 (2016).
- 1-66. K. O. Okeyo, O. Kurosawa, S. Yamazaki, H. Oana, H. Kotera, H. Nakauchi, M. Washizu, Cell adhesion minimization by a novel mesh culture method mechanically directs trophoblast differentiation and self-assembly organization of human pluripotent stem cells, *Tissue Eng. Part C Methods*, 21, 1105-1115 (2015).
- 1-67. K. O. Okeyo, M. Tanabe, O. Kurosawa, H. Oana, M. Washizu, Self-organization of human iPS cells into trophoblast mimicking cysts induced by adhesion restriction using microstructured mesh scaffolds, *Dev., Growth & Differ.*, 1, 1-13 (2018).
- 1-68. Z. Li, O. Kurosawa, H. Iwata, Establishment of human trophoblast stem cells from human induced pluripotent stem cell-derived cystic cells under micromesh culture, *Stem Cell Res. & Therapy*, 10, 245 (2019).
- 1-69. K. O. Okeyo, Y. Kibe, T. Adachi, Controlling macroscale cell alignment in self-organized cell sheets by tuning the microstructure of adhesion-limiting micromesh scaffolds, *Mater. Today Adv.*, 12, 100194 (2021).

第2章

多能性維持培養条件に応じた層状組織形成

2.1 緒言

多能性幹細胞は、さまざまな細胞へと分化できるだけでなく、初期胚発生過程を模倣して自己組織化する能力を有することから、多細胞組織の構築素材としての活用が期待されている[2-1]。例えば、多能性幹細胞が形成する組織は、幹細胞シートとして移植することによる再生医療への応用が期待されている[2-2]。多能性幹細胞を用いた多細胞組織構築においては、組織形成を誘導するために、細胞接着場を調節する微細構造培養基板を用いることが有効なアプローチであるとされている[2-3,2-4]。このような細胞接着場を調節する培養基板は、細胞接着を介して多能性幹細胞の相互作用を変化させ、細胞集団から組織形成能力を引き出していると考えられる。しかし、多能性維持培養条件により既定される多能性状態に応じて、多能性幹細胞の組織形成能力がどのように異なっているかについてはほとんど調べられていない。多能性状態は、多能性幹細胞の分化能に関わる要素であるため、多能性状態が組織形成過程に及ぼす影響を明らかにすることは、多能性幹細胞を用いた多細胞組織構築において重要な課題である。

マウス ES 細胞の多能性状態はナイーブ状態 (naïve state) であるとされており、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) を添加した培養液で培養することで、多能性が維持されることが知られている[2-5]。また、ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、遺伝子発現プロファイルが異なる細胞群によって構成される不均一な集団であることが知られている[2-6,2-7]。一方、ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、MEK (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase) と GSK3 (glycogen synthase kinase 3) の2つの阻害剤を加える 2i 法により培養することで基底状態 (ground state) と呼ばれる状態に遷移し、より均一な細胞群から構成される集団として多能性を維持することができる[2-8]。これらの2つの多能性状態における遺伝子発現プロファイルは、シングルセル遺伝子発現解析などを用いた研究により盛んに調べられてきた[2-9,2-10,2-11,2-12]。例えば、REX1 は、基底状態ではコロニー内で均一な発現が認められる一方で、ナイーブ状態ではモザイク状の発現分布を呈することが知られている[2-6,2-7,2-13]。このように、多能性幹細胞

胞に遺伝子発現プロファイルが異なる複数の細胞群が存在することにより、初期胚発生過程における非対称な細胞運命決定や体軸形成が駆動される可能性が示唆されている[2-14]。しかし、マウス ES 細胞の基底状態とナイーブ状態の 2 つの多能性状態の違いが組織形成に及ぼす影響は未知である。

本章では、マウス ES 細胞の維持培養条件により定まる多能性状態に応じて、組織形成能力が異なることを検証することを目的とした。そのために、微細加工メッシュ構造基板を用いて細胞接着場を調節し、マウス ES 細胞に対して平面的な組織成長を促すことで層状組織の形成を誘導する。メッシュ構造基板上では、細胞-基板間接着が可能な領域が制限されているため、細胞-細胞間接着を介した層状組織が形成される[2-15]。したがって、この層状組織形成過程を観察すれば、培養基板の影響を最小限に抑えながら、多能性状態に応じた組織形成を観察することが可能となる。そこで、本章では、このメッシュ構造基板上で形成される層状組織において、マウス ES 細胞の基底状態とナイーブ状態の 2 つの多能性状態が及ぼす影響を調べている。基底状態とナイーブ状態の 2 つの多能性状態の指標として、OCT3/4, REX1, KRT8 (cytokeratin 8) をマーカー遺伝子として用いて観察した。OCT3/4 は、多能性維持に関わる重要な転写因子としてよく知られている[2-5]。また、REX1 は、先述の通り基底状態ではすべての細胞で均一に発現し、ナイーブ状態では一部の細胞が発現している。一方、KRT8 は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞集団のうち、多能性が低く不安定な細胞群で発現していることが報告されている[2-7,2-10]。本章では、これらのマーカー遺伝子を用いて、メッシュ構造基板上で形成された層状組織の組織形状を観察することにより、多能性状態がメッシュ構造基板上での層状組織形成に影響を及ぼすことを明らかにする。

2.2 実験方法

2.2.1 マウス ES 細胞の多能性維持培養

本研究では、マウス ES 細胞株 OLV2-1 (理研セルバンク) [2-6], および, OCRG9 (理研セルバンク) [2-6]を用いた. OLV2-1 は, OCT3/4-linker-Venus ベクターがノックインされ OCT3/4 発現細胞を Venus 陽性細胞として確認できる細胞株である. OCRG9 は, REX1-EGFP-IB ベクターと OCT3/4-linker-ECFP ベクターがノックインされ REX1 発現細胞を EGFP 陽性細胞として, また, OCT3/4 発現細胞を ECFP 陽性細胞として確認できる細胞株である.

いずれの細胞株も, G-MEM (富士フィルム和光純薬) に, 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (富士フィルム和光純薬), 1% MEM non-essential amino acids (富士フィルム和光純薬), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (富士フィルム和光純薬), 1,000 units/mL LIF (富士フィルム和光純薬) を加えた培養液を用いて多能性維持培養を行った. 2i+LIF 培養には, この培養液に, 3 mM CHIR99021 (富士フィルム和光純薬), 1 mM PD0325901 (富士フィルム和光純薬) を加えた培養液を用いた. 細胞は, 0.1% gelatin from porcine skin (gel strength 300, type A; Sigma-Aldrich) でコーティングした培養皿を用いて, 37 °C, 5% CO₂ 環境で培養した. 継代時は, TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を剥離させ, 2 日間の培養には 7.0×10^3 cells/cm² に, 3 日間の培養には 2.6×10^3 cells/cm² になるように細胞密度を調整して, 新たな培養皿に播種した.

2.2.2 微細加工メッシュ構造基板の作製と細胞培養

微細加工メッシュ構造基板は, エポキシ樹脂ベースのネガティブフォトレジストである SU-8 2 (MicroChem) を用いたフォトリソグラフィにより作製した (Figure 2-1). まず, シリコンウエハ上に 2% gelatin (Sigma-Aldrich) 溶液を 2,000 rpm でスピンコーティングした. 次に, SU-8 2 を 2,000 rpm でスピンコーティングし, 65 °C で 1 分間, 95 °C で 3 分間バークした. マスクアライナーと別途作製したフォトマスクを用いて, 10

mW/cm²の紫外線により 12 秒間露光し，65 °C で 1 分間，95 °C で 1 分間ベークした．最後に，propylene glycol methyl ether acetate (PGMEA) に 3 分間，isopropanol に 1 分間浸すことで現像を行った．シリコンウエハ上に作製したメッシュ構造に φ4 mm の穴を開けた Kapton polyimide film (日東電工) を貼り付け，ゼラチン犠牲層を溶かすために 50 °C で湯煎し，メッシュ構造基板をシリコンウエハから剥離させた．剥離させたメッシュ構造基板は，スペーサーとなる φ6 mm の穴を開けた 0.5 mm 厚の silicon rubber sheet (タイガースポリマー) に貼り付け，紫外線により滅菌した．

本研究では，一辺 70 μm (対角線長約 100 μm) の正方形の網目が幅 5 μm の細線により形作られているメッシュ構造基板を設計して用いた．細胞播種を行う前に，メッシュ構造基板を培養皿に設置し，10 μg/mL laminin-511 E8 fragment (iMatrix-511 silk; ニッピ) / phosphate buffered saline (PBS) 溶液により 37 °C で 1 時間コーティングした．次に，細胞密度が 1.0-5.0×10⁶ cells/mL になるように調製した細胞懸濁液 100 μL をメッシュ構造基板上に静かに滴下し，細胞を播種した．播種した細胞がメッシュ線に接着するように，37 °C，5% CO₂ 環境下で 6 時間の培養を行った．その後，メッシュ構造基板に接着できずに落下した細胞を除去するため，細胞が接着したメッシュ構造基板を新しい培養皿へと移設し，新しい培養液を加えた．メッシュ構造基板に細胞を播種した時点を Day 0 と定めた．

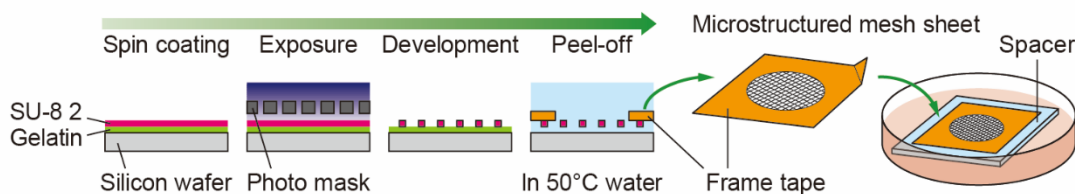


Figure 2-1 | Schematic illustration of mesh fabrication and setup for cell culture. Microstructured mesh sheets were fabricated by photolithography using SU-8 2. Mesh sheets were reinforced with frame tapes with a punched hole (4 mm in diameter) and then setup suspended on a culture dish using a 0.5 mm-thick silicon rubber spacer with a punched hole (6 mm in diameter).

2.2.3 免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察

タンパク質の発現を観察するために細胞染色を行った。細胞は、4% paraformaldehyde / PBS 溶液を用いて室温で 30 分間静置して固定し、0.1% polyethylene glycol mono-p-isoctylphenyl ether / PBS 溶液を用いて室温で 15 分間静置して脱膜した。その後、3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) / PBS 溶液を用いてブロッキングを施し、1% BSA / PBS 溶液を用いて抗体を反応させた。免疫蛍光染色には、一次抗体として anti-cytokeratin 8 antibody (1:200; ab53280; Abcam) を用い、二次抗体として F(ab')₂-goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody Alexa Fluor 546 (1:500; A-11071; Thermo Fisher Scientific), または, goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 568 (1:500; ab175471; Abcam) を用いた。細胞核の染色には、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:500; D1306; Thermo Fisher Scientific), または, 7-amino-actinomycin D (7-AAD; 1:50; ab228563; Abcam) を用いた。アクチンフィラメントの染色には、Alexa Fluor 647 phalloidin (1:100; A22287; Thermo Fisher Scientific) を用いた。蛍光画像は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV3000 (オリンパス) を用いて取得した。画像処理には Fiji [2-16] を用いた。

2.2.4 画像解析による層状組織形成の定量評価

層状組織の画像に対して定量評価を行うため、共焦点顕微鏡で取得した三次元画像に対して、各チャンネルのそれぞれに閾値を定めることで二値化処理を施した。閾値は、Fiji [2-16] の Auto Threshold プラグインに実装されている大津法を用いて、各チャンネルにおける三次元画像の全ボクセルの輝度ヒストグラムから一つの閾値を定め、すべての Z スライス画像に対して共通の閾値を適用した。次に、細胞核 (DAPI あるいは 7-AAD) とアクチンフィラメント (phalloidin) の画像にそれぞれ二値化処理を施し、両方の二値化画像を重ねることで層状組織が存在するボクセルを決定した。この情報を用いて、層状組織が存在するボクセル数を Z 方向に数え上げることで、各 XY 座標に対して厚さ (layer thickness) $d(x,y)$ を求めた。さらに、すべての $d(x,y)$ に対して非零の $d(x,y)$ の割合を算出することで、被覆率 (mesh coverage) を求めた。また、非零の $d(x,y)$ の平均値を求めることで、平均厚さ (mean layer thickness) を求めた。

2.2.5 蛍光活性化セルソーティング

ナイーブ状態のマウス ES 細胞集団から REX1-high 細胞群をソーティングするために、蛍光活性化セルソーティングを行った。まず、ナイーブ状態のマウス ES 細胞を培養皿から剥離させ、培養液を用いて細胞懸濁液として回収し、BD FACSMelody cell sorter (BD Biosciences) を用いて解析した。次に、前方散乱光 (forward scatter; FSC) シグナルと側方散乱光 (side scatter; SSC) シグナルの値から細胞と思われる集団に対して手動でゲーティングを行った。REX1-EGFP-high ゲートは、はじめに非蛍光のマウス ES 細胞を用いて REX1-EGFP 陽性ゲートを定めた後、手動で設定した。セルソーティングの結果の可視化には、FlowJo single cell analysis software (BD Biosciences) を用いた。

2.3 実験結果

2.3.1 基底状態およびナイーブ状態の細胞による層状組織形成

マウス ES 細胞には、多能性維持培養の条件に応じて遺伝子発現プロファイルの異なる多能性状態が存在しており、特に、基底状態とナイーブ状態がよく知られている (Figure 2-2A)。多能性状態に応じたマウス ES 細胞の層状組織形成能力を調べるため、基底状態とナイーブ状態のマウス ES 細胞をメッシュ構造基板上で培養し、層状組織形成を観察した。はじめに、ナイーブ状態のマウス ES 細胞を基底状態に遷移させるために、2i+LIF 条件で継代を 2 回行い、1 週間の培養を行った。その結果、基底状態のマウス ES 細胞では、REX1 が全域で発現していた一方で、KRT8+細胞は観察されなかった (Figure 2-2B, left)。ナイーブ状態のマウス ES 細胞では、コンパクトなコロニーを形成している OCT3/4+細胞群と、コロニー周囲に点在している KRT8+細胞群の 2 種類の細胞群が観察された (Figure 2-2B, right)。特に、KRT8+細胞は、OCT3/4+細胞群とは異なり、伸展した細胞形状をしており、また、単独で点在していることが観察され、先行研究の観察結果とも一致していた[2-7, 2-17]。これらの REX1 と KRT8 を用いた観察結果と先行研究[2-10, 2-13]から、基底状態とナイーブ状態のマウス ES 細胞において、異な

る細胞群が存在していることが確認できた。さらに、基底状態とナイーブ状態のマウス ES 細胞における異なる細胞群の存在は、蛍光活性化セルソーターによる REX1 の輝度の解析からも確認でき、基底状態のマウス ES 細胞と比較して、ナイーブ状態のマウス ES 細胞では REX1 の発現が低い細胞群が存在することが確かめられた (Figure 2-2C)。本研究では、これらの 2 つの多能性状態のマウス ES 細胞を、それぞれ一辺 70 μm の正方形形状のメッシュ構造基板を用いて培養し、層状組織形成の差異を観察した (Figure 2-2D)。

メッシュ構造基板に対して、基底状態とナイーブ状態のマウス ES 細胞をそれぞれ播種し、2i+LIF 条件または LIF 条件において 3 日間の培養を行うことで、メッシュ構造基板上において形成される層状組織の形状を観察した。基底状態のマウス ES 細胞は、2i+LIF 条件では、主に OCT3/4+細胞から構成されるパンケーキ状の孤立した組織を形成し、KRT8+細胞は観察されなかった (Figure 2-3A, left)。この孤立した組織は、細胞が層をなした層状組織であることが、三次元再構築画像から確認できた (Figure 2-3A, left,

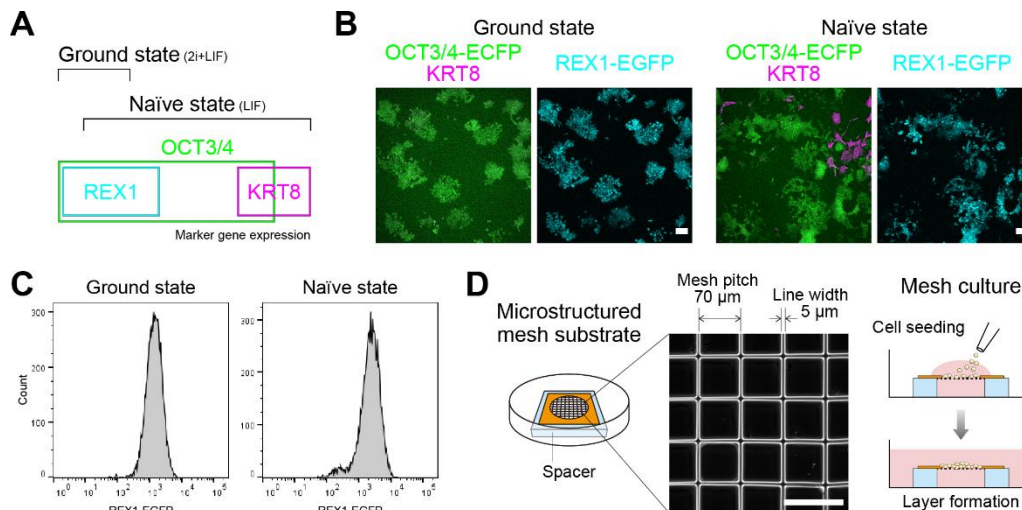


Figure 2-2 | Experimental setup to induce layer formation by mESCs in different pluripotency states on microstructured mesh substrates. (A) Schematic illustration of ground and naïve states, and marker gene expressions used in this study. (B) Microscopic images of the ground and naïve state mESCs. (C) REX1 expression of ground and naïve state mESCs cultured on typical culture dishes. (D) Schematic illustration of mesh substrate setup in a suspended position for cell seeding, and the cell culture processes leading to layer formation.

vertical cross-section). 一方、LIF 条件では、基底状態のマウス ES 細胞は、層状組織形成能力がやや向上し 2i+LIF 条件よりも広い範囲でメッシュ構造基板の網目を覆ったが、細胞によって覆われていない網目が残る不連続な層状組織を形成した (Figure 2-3A, right). ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、2i+LIF 条件と LIF 条件の両方において、3 日間でメッシュ構造基板の網目をすべて覆い、連続した層状組織を形成した (Figure 2-3B). これらの連続した層状組織は、数細胞の厚みをもつ層状組織であることが、三次元再構築画像から確認できた (Figure 2-3B, vertical cross-sections). また、これらの層状組織においては、KRT8+細胞が層状組織の上下表面に分布しており、層状組織の内部の OCT3/4+細胞が存在する領域を挟むように存在していることが、三次元再構築画像から観察された (Figure 2-3B, vertical cross-sections). ナイーブ状態のマウス ES 細胞が 2i+LIF 条件において形成する層状組織において KRT8+細胞が存在するのは、細胞播種時に存在していた KRT8+細胞が、2i+LIF 条件の 3 日間の培養を経た場合でも残存しているためと考えられた. また、画像解析を用いて被覆率と平均厚さの定量評価を行ったところ、ナイーブ状態のマウス ES 細胞が連続した層状組織を形成したのに比べて、基底状態のマウス ES 細胞は 2i+LIF 条件において、水平方向への成長が少なく分厚い ($51.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$) 組織を形成していることが確認できた (Figure 2-3C). 以上の結果から、メッシュ構造基板上での層状組織形成においては、層状組織形成過程における培養条件よりも、基板への播種時における、多能性維持培養条件に応じたマウス ES 細胞の多能性状態の影響をより受けることを、形成された層状組織の形状から明らかにした.

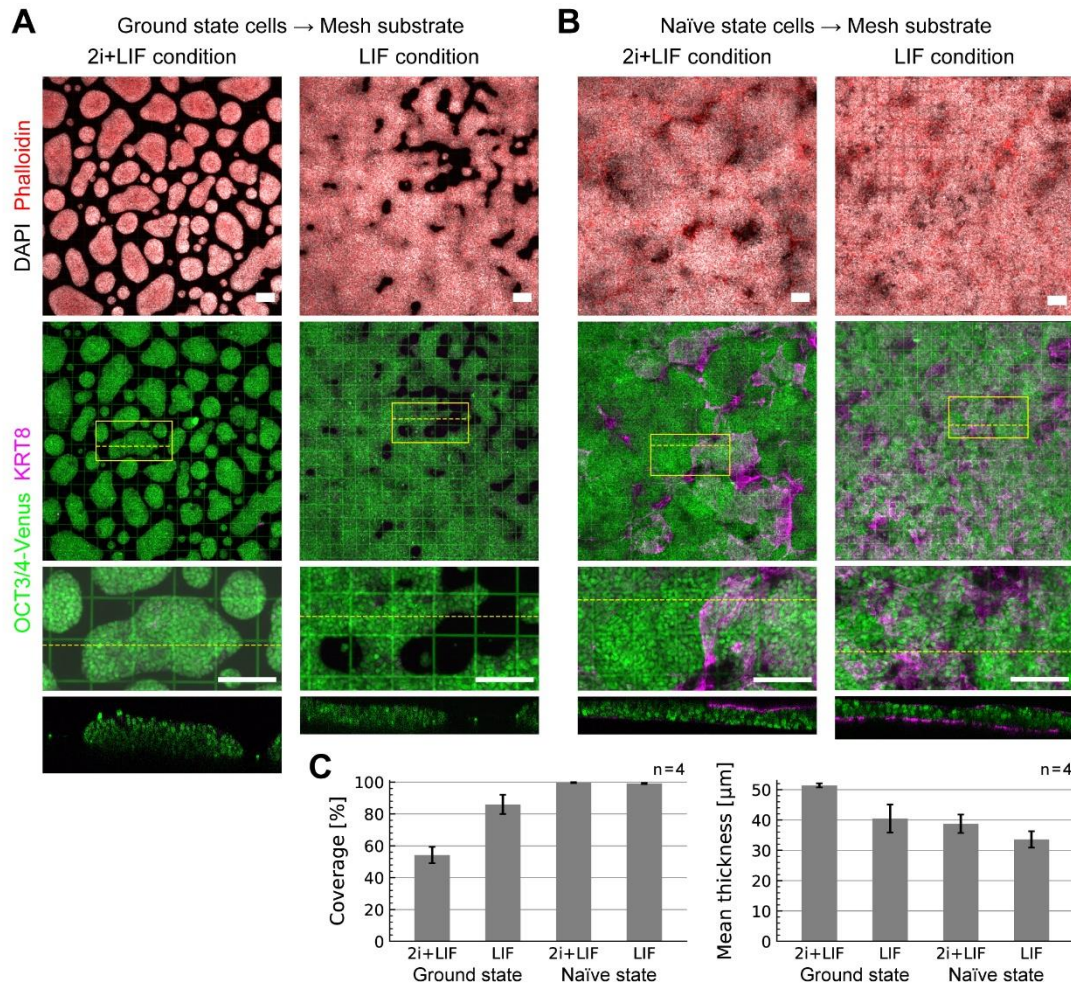


Figure 2-3 | Layer formation assays for the ground and naïve state cells on mesh substrates. (A) Discontinuous layer formation by the ground state cells on mesh substrates under 2i+LIF and LIF conditions at Day 3. (B) Continuous layer formation by the naïve state cells on mesh substrates under 2i+LIF and LIF conditions at Day 3. Enlarged views of the yellow boxed region and vertical cross-sections at position of the yellow broken line were shown in bottom panels. (C) Quantitative image analyses for the mesh coverage and mean thickness of each condition. The analyses for coverage and mean thickness were performed using 4 biological samples (4 images each) for each condition. Scale bars: 100 μm . Error bars: mean \pm SD.

2.3.2 基底状態様の細胞群による不連続な層状組織形成

ナイーブ状態のマウス ES 細胞のうち REX1 を発現している細胞群は、先行研究により、基底状態のマウス ES 細胞と遺伝子発現プロファイルが完全には一致しないことが知られている[2-13]が、基底状態のマウス ES 細胞と類似した性質を示す可能性が考えられる。そこで、REX1 を発現している基底状態様の細胞群をナイーブ状態のマウス ES 細胞からソーティングし (Figure 2-4A)、基底状態のマウス ES 細胞と同様に、メッシュ構造基板上で不連続な層状組織を形成するかどうかを確かめた。ナイーブ状態のマウス ES 細胞から REX1 を発現している細胞群をソーティングする際には、より基底状態のマウス ES 細胞に近い性質を示すと考えられる、REX1 を強く発現している細胞群 (REX1-high 細胞群) を取得するため、REX1-EGFP の輝度が上位 30%程度となる細胞群に対してゲーティングを行った (Figure 2-4B, histogram)。

ソーティングした REX1-high 細胞群をメッシュ構造基板上に播種し LIF 条件にて培養を行ったところ、Day 3 において、細胞によって覆われていない網目が残る不連続な層状組織を形成した (Figure 2-4B)。さらに、OCT3/4 と REX1 の発現は層状組織の全域で観察されたのに対し、KRT8 の発現は観察されなかった (Figure 2-4B)。これらの結果は、LIF 条件で培養した基底状態のマウス ES 細胞の場合と類似していた。画像解析による定量評価の結果、組織の平均厚さ ($31.8 \pm 7.9 \mu\text{m}$) には、LIF 条件のナイーブ状態のマウス ES 細胞と比較して有意な差は見られなかったが、被覆率は不完全であることが示された (Figure 2-4C)。以上の結果から、REX1-high 細胞群は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞と比較して、メッシュ構造基板上での層状組織形成能力が低く、網目を覆いきらないことが示された。結果として、多様な細胞群から構成されるナイーブ状態のマウス ES 細胞のうち、基底状態様の REX1-high 細胞群は、基底状態のマウス ES 細胞に類似した限定的な層状組織形成能力を示すことが明らかになった。このことにより、メッシュ構造基板上における層状組織形成においては、基底状態様の REX1-high 細胞群だけでは網目を覆いきらず、基底状態から離れた多能性が低い不安定な多能性状態にある細胞群の存在が重要であることが示唆された。

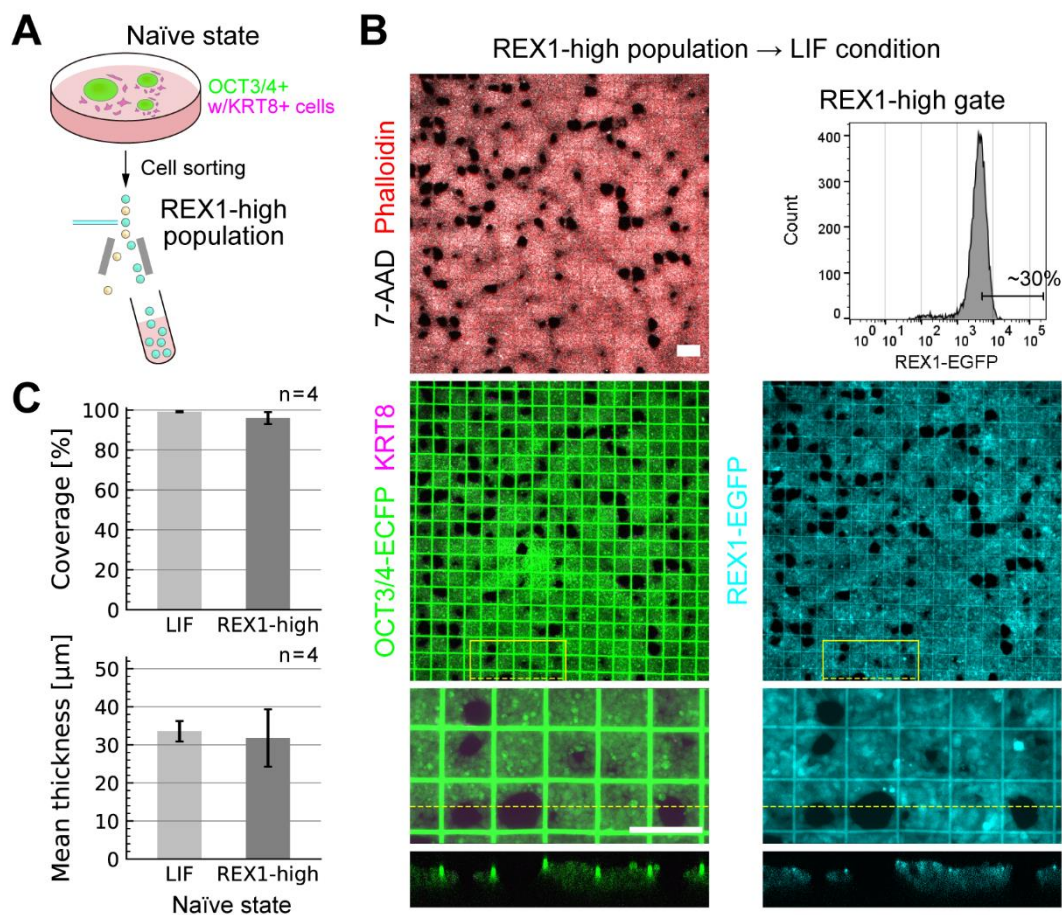


Figure 2-4 | Discontinuous layer formation by REX1-high population on mesh substrates under LIF conditions at Day 3. (A) Schematic illustration of cell sorting to obtain REX1-high population from a naïve state mESCs. (B) Microscopic images showing discontinuous cell layers formed by REX1-high population at Day 3 under LIF condition. Enlarged views of the yellow boxed region and vertical cross-sections at the position of the yellow broken line are shown in the bottom panels. (C) Quantitative image analyses of mesh coverage and mean thickness for each condition. The analyses of coverage and mean thickness were performed using 4 biological samples (4 images each). Scale bars: 100 μm. Error bars: mean ± SD.

2.3.3 層状組織形成におけるナイーブ状態の細胞の寄与

ナイーブ状態のマウス ES 細胞がどのようにメッシュ構造基板上での層状組織形成に寄与しているかを調べるため、ナイーブ状態のマウス ES 細胞を構成する細胞群のうち、培養皿上で OCT3/4+細胞のコロニーから離れて点在している KRT8+細胞に着目した (Figure 2-2B, right). そこで、ナイーブ状態のマウス ES 細胞をメッシュ構造基板上で LIF 条件にて培養し、層状組織形成過程の 6 hours, Day 1, Day 2 における組織形状と KRT8 の発現を観察した (Figure 2-5A). 播種 6 時間後では、細胞はメッシュ線上に接着しており、メッシュ基板上の一部ではほぼ単層の組織が形成されていた (Figure 2-5A, 6 hours). また、DAPI と phalloidin を用いた細胞核とアクチンフィラメントの蛍光画像から、メッシュ構造基板上に、細胞によって覆われていない網目が残っていることが明確に確認できた. この覆われていない網目における孔の周囲では、KRT8+細胞がメッシュ線に沿って伸展しており孔の周囲に位置していることが観察された. Day 1 においては、層状組織は数細胞の厚さまで成長しており、OCT3/4+細胞によって形成された比較的分厚い領域の周りを KRT8+細胞が占めていることが観察された (Figure 2-5A, Day 1). Day 2 では、メッシュ構造基板のすべての網目が、細胞によって形成された層状組織によって覆われていた (Figure 2-5A, Day 2). 画像解析による定量評価では、Day 2 で被覆率がほぼ 100%になっている一方で、層状組織の平均厚さは Day 3 まで増加し続けた (Figure 2-5B). また、Figure 2-5C で見られるように、KRT8+細胞が孔の周囲を取り囲んでおり、KRT8 のケラチン繊維がアクチンフィラメントに比べてよく発達していた. さらに、孔の周囲の細胞には、OCT3/4 を発現していない細胞も存在していた. これらの観察結果と、KRT8+細胞はナイーブ状態のマウス ES 細胞のうち多能性が低い細胞である [2-10] ことを踏まえると、KRT8+細胞がメッシュ構造基板上での層状組織形成の駆動力となっていることが考えられる. 以上のことから、メッシュ構造基板上でナイーブ状態のマウス ES 細胞が層状組織を形成する際には、網目を覆う過程で生じる孔埋め領域において、KRT8+細胞が駆動力となっていることが示唆された.

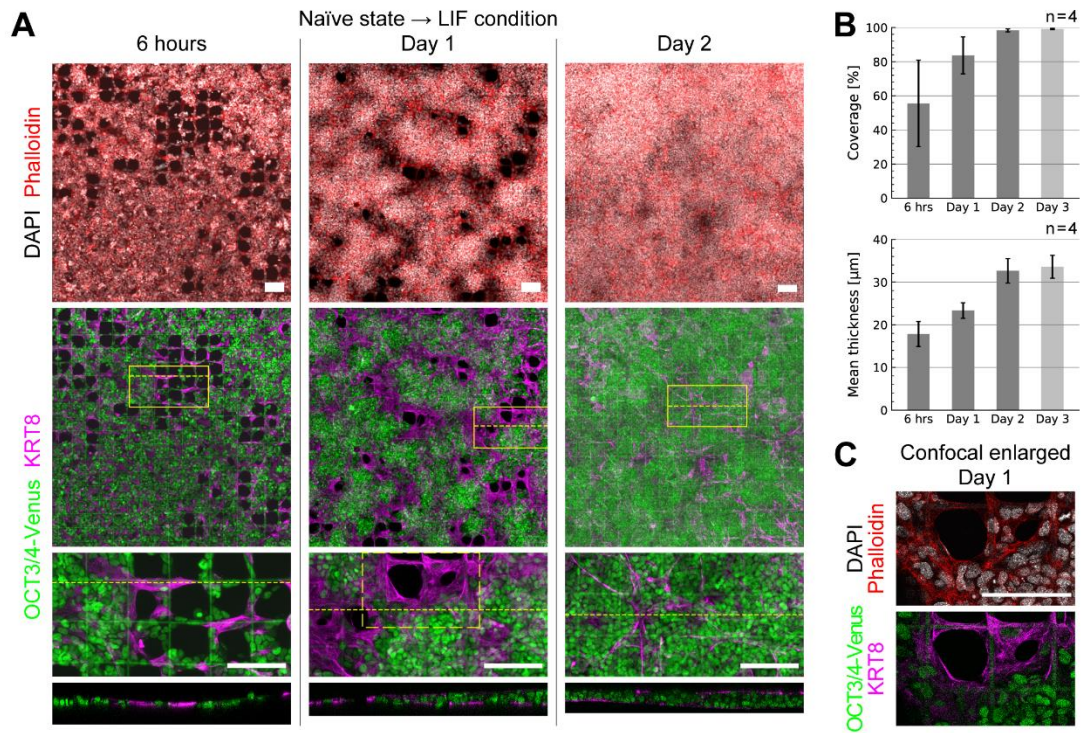


Figure 2-5 | Layer formation of the naïve state cells comprising KRT8⁺ cells on mesh substrates under LIF condition. (A) Microscopic images showing the mesh filling process of mESC layers on mesh substrates at 6 hours, Day 1 and Day 2. Enlarged views of the yellow boxed region and vertical cross-sections at position of the yellow broken line were shown in bottom panels. (B) Quantitative image analyses for the mesh coverage and mean thickness of layers at 6 hours, Day 1, Day 2 and Day 3. These analyses were performed using 4 biological samples (4 images each) for each time point. (C) Confocal enlarged views of the yellow dashed-lined boxed region in Fig. 4A, Day 1. Scale bars: 100 μm . Error bars: mean \pm SD.

2.4 考察

本研究では、基底状態とナイーブ状態のマウス ES 細胞をそれぞれメッシュ構造基板上で 3 日間培養することで、層状組織形成能力を比較した。基底状態のマウス ES 細胞と、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からソーティングした REX1-high 細胞群は、ともに 3 日間の培養期間ではメッシュ構造基板の網目を覆いきらず、不連続な層状組織を形成した。一方、ナイーブ状態のマウス ES 細胞は 3 日以内にメッシュ構造基板をすべて覆い、連続した層状組織を形成した。培養を継続した場合、層状組織がさらに成長し網目をすべて覆うことも考えられるが、本研究は、多能性状態に応じて、水平方向へ網目を覆いながら組織成長する速さが異なることを示したものであり、3 日間の培養における層状組織形成能力の差異を示したものである。

KRT8+細胞を含むナイーブ状態のマウス ES 細胞がメッシュ構造基板上で高い層状組織形成能力を示した要因として、KRT8+細胞が伸展した細胞形状を示し、孔の周囲にケラチン繊維を発達させていることが考えられる。実際に、ケラチン繊維を含む中間径フィラメントは、さまざまな細胞活動において力学的強度を保つ役割を有することが知られている[2-18]。また、マウス胚盤胞の胚発生過程において、KRT8 が内側-外側極性の決定や力学的な安定性の担保に重要であることが報告されている[2-19, 2-20]。したがって、これらの例から、メッシュ構造基板上での層状組織形成における網目を覆う過程においても、KRT8+細胞が重要な役割を担っている可能性が示唆される。しかし、本研究では、KRT8 の発現を蛍光標識として観察できるノックインマウス ES 細胞株を用いてセルソーティングやライブイメージングを実施することが困難だったことから、KRT8+細胞が層状組織形成に及ぼす寄与を直接的に示すことはできなかった。ただし、先述の先行研究[2-19, 2-20]に基づけば、メッシュ構造基板の孔の周囲で観察されたケラチン繊維の発達は、マウス ES 細胞による *in vitro* での多細胞組織形成過程において、組織内力学状態に応じた細胞運命決定のメカニズム解明に向けて、重要な現象である可能性が示唆されている。

本研究で見られた層状組織形成は、水平方向への組織成長により駆動されていると考えられる。事実、メッシュ構造基板上で 2i+LIF 条件にて培養した基底状態のマウス ES 細胞は、3 日間の培養で孤立した層状組織 (Figure 2-3A, left) を形成したことから、水平方向への組織成長が限定的であったことがわかる。これは、細胞-細胞間接着による凝集が優位であり、水平方向への組織成長よりも、細胞同士が互いに集まろうとする性質が現れたものと考えられる。一方、メッシュ構造基板上で LIF 条件にて培養

した基底状態のマウス ES 細胞や、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からソーティングした REX1-high 細胞群の場合は、細胞によって覆われていない網目が残る不連続な層状組織 (Figure 2-3A, right & 2-4B) を形成した。この不連続な層状組織は、孤立した層状組織と比較して水平方向への組織成長が優位である一方、網目をすべて覆い連続した層状組織 (Figure 2-3B) と比較して、孔を埋めるための組織成長が十分でなかったことが示唆される。孔を埋めるための組織成長には、細胞増殖による組織成長が増加するか、孔の周囲の細胞の張力が増加することが必要である。細胞増殖による組織成長を考察するためには、基底状態のマウス ES 細胞や REX1-high 細胞群における細胞周期を議論する必要がある。先行研究により、REX1 ノックアウトマウス ES 細胞において、細胞周期に関わる遺伝子の発現が低下することが示されている [2-21]。この先行研究は REX1 ノックアウトにより細胞周期が長くなることを示唆しており、本研究の REX1-high 細胞群において、組織成長が減少することを説明することは難しい。したがって、細胞周期による組織成長の差異は、本研究では詳細に考察することはできなかった。また、孔の周囲の細胞の張力については、先述のように、ケラチン繊維の発達により考察でき、ナイーブ状態の細胞における層状組織形成過程を説明可能である。以上のことから、本研究における層状組織形成能力の差異は、層状組織形成過程における細胞接着と水平方向への組織成長の関係により理解できる可能性が示唆された。

一般的に、基底状態のマウス ES 細胞は、ナイーブ状態よりも均一な細胞集団であり、特定の細胞種への分化誘導を行った際に比較的均一な分化細胞集団が得られることから、より望ましい多能性状態であるとされてきた [2-22]。しかし、本研究で示したように、より均一な集団である基底状態のマウス ES 細胞や、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からソーティングした REX1-high 細胞群よりも、KRT8+細胞を含む不均一な細胞群からなるナイーブ状態のマウス ES 細胞の方が、層状組織形成能力が高いことがわかった。多能性状態に応じた層状組織形成能力の差異をさらに確かめるためには、3日間を越えた長期間培養によるさらなる観察が必要であるが、その過程においては、メッシュ構造基板により多能性状態そのものが変化することが十分に考えられる。したがって、長期間培養により細胞集団における多能性状態の不均一性が増すことが考えられるため、その影響を評価することが必要となろう。同様に、ナイーブ状態のマウス ES 細胞集団における不均一性がどのように層状組織形成に関わっているのかを明らかにするためには、網目を覆いながら層状組織を形成する過程における細胞動態の観察や、細胞張力に関わる遺伝子の発現解析などを行い、メカニズムを明らかにすることが必要である。

2.5 結言

本章では、マウス ES 細胞の維持培養条件により定まる多能性状態に応じて、組織形成能力が異なることを検証するため、メッシュ構造基板を用いて平面的な組織成長を促すことで層状組織の形成を誘導し、多能性状態の影響を調べた。マウス ES 細胞のナイーブ状態と基底状態の2つの多能性状態に応じた層状組織形成の差異を調べるため、メッシュ構造基板により層状組織形成を誘導し、形成された層状組織の形状を観察した。3日間培養した結果、基底状態の細胞は不連続な層状組織を形成した一方で、ナイーブ状態の細胞は網目をすべて覆い連続した層状組織を形成した。また、ナイーブ状態の細胞の層状組織形成過程においては、網目を覆う際に生じる孔を囲むように、KRT8 発現細胞がケラチン繊維を発達させている様子が、免疫蛍光染色法により観察できた。このことから、KRT8 発現細胞が層状組織形成における網目を埋める過程に寄与している可能性が示唆された。以上のことから、基底状態のマウス ES 細胞と比較し、KRT8 発現細胞群を含むナイーブ状態のマウス ES 細胞の方が、メッシュ構造基板上における層状組織形成能力が高いことを示した。このことは、組織形成の誘導において多能性状態の選択が必要であることを示しており、多細胞組織を構築する上で重要な知見が得られた。

参考文献

- 2-1. J. Fu, A. Warmflash, M. P. Lutolf, Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation, *Nat. Mater.*, 20, 132-144 (2021).
- 2-2. R. Guo, M. Morimatsu, T. Feng, F. Lan, D. Chang, F. Wan, Y. Ling, Stem cell-derived cell sheet transplantation for heart tissue repair in myocardial infarction, *Stem Cell Res. Therapy*, 11, 19 (2020).
- 2-3. T. Takebe, J. M. Wells, Organoids by design, *Science*, 364, 956–959 (2019).
- 2-4. L. M. Murrow, R. J. Weber, Z. J. Gartner, Dissecting the stem cell niche with organoid models: an engineering-based approach, *Development*, 144, 998-1007 (2017).
- 2-5. H. Niwa, K. Ogawa, D. Shimosato, K. Adachi, A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells, *Nature*, 460, 118-122 (2009).
- 2-6. Y. Toyooka, D. Shimosato, K. Murakami, K. Takahashi, H. Niwa, Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture, *Development*, 135,

- 909–918 (2008).
- 2-7. M. G. Carter, C. A. Stagg, G. Falco, T. Yoshikawa, U. C. Bassey, K. Aiba, L. V. Sharova, N. Shaik, M. S. H. Ko, An in situ hybridization-based screen for heterogeneously expressed genes in mouse ES cells, *Gene Expression Patterns*, 8, 181–198 (2008).
 - 2-8. Q. L. Ying, J. Wray, J. Nichols, L. Batlle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen, A. Smith, The ground state of embryonic stem cell self-renewal, *Nature*, 453, 519-523 (2008).
 - 2-9. G. Guo, L. Pinello, X. Han, S. Lai, L. Shen, T. W. Lin, K. Zou, G. C. Yuan, S. H. Orkin, Serum-based culture conditions provoke gene expression variability in mouse embryonic stem cells as revealed by single-cell analysis, *Cell Rep.*, 14, 956-965 (2006).
 - 2-10. A. Kolodziejczyk, J. K. Kim, J. C.H. Tsang, T. Ilicic, J. Henriksson, K. N. Natarajan, A. C. Tuck, X. Gao, M. Bühler, P. Liu, J. C. Marioni, S. A. Teichmann, Single cell RNA-sequencing of pluripotent states unlocks modular transcriptional variation, *Cell Stem Cell*, 17, 471-485 (2015).
 - 2-11. D. Papatsenko, H. Darr, I. V. Kulakovskiy, A. Waghray, V. J. Makeev, B. D. MacArthur, I. R. Lemischka, Single-cell analyses of ESCs reveal alternative pluripotent cell states and molecular mechanisms that control self-renewal, *Stem Cell Rep.*, 5, 207-220 (2015).
 - 2-12. R. M. Kumar, P. Cahan, A. K. Shalek, R. Satija, A. DaleyKeyser, H. Li, J. Zhang, K. Pardee, D. Gennert, J. J. Trombetta, T. C. Ferrante, A. Regev, G. Q. Daley, J. J. Collins, Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells, *Nature*, 516, 56-61 (2014).
 - 2-13. H. Marks, T. Kalkan, R. Menafrá, S. Denissov, K. Jones, H. Hofemeister, J. Nichols, A. Kranz, A. F. Stewart, A. Smith, H. G. Stunnenberg, The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency, *Cell*, 149, 590-604 (2012).
 - 2-14. C. S. Simon, A. K. Hadjantonakis, C. Schröter, Making lineage decisions with biological noise: Lessons from the early mouse embryo, *WIREs Dev. Biol.*, 7, e319 (2018).
 - 2-15. K. O. Okeyo, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, Minimization of cell-substrate interaction using suspended microstructured meshes initiates cell sheet formation by self-assembly organization, *Biomed. Phys. & Eng. Express*, 2, 065019 (2016).
 - 2-16. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods*, 9, 676-682 (2012).
 - 2-17. N. Schwarz, R. Windoffer, T. M. Magin, R. E. Leube, Dissection of keratin network formation, turnover and reorganization in living murine embryos, *Sci. Rep.*, 5, 9007 (2015).
 - 2-18. P. A. Coulombe, P. Wong, Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds, *Nat. Cell Biol.*, 8, 699-706 (2004).
 - 2-19. H. Y. G. Lim, Y. D. Alvarez, M. Gasnier, Y. Wang, P. Tetlak, S. Bissiere, H. Wang, M. Biro, N. Plachta, Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo, *Nature*, 585, 404-409 (2020).
 - 2-20. H. Y. G. Lim, N. Plachta, Cytoskeletal control of early mammalian development, *Nat. Rev.*

Molecular Cell Biol., 22, 548–562 (2001).

- 2-21. K. B. Scotland, S. Chen, R. Sylvester, L. J. Gudas, Analysis of Rex1 (Zfp42) function in embryonic stem cell differentiation, *Dev. Dynamics*, 238, 1863-1877 (2009).
- 2-22. Q. L. Ying, A. Smith, The art of capturing pluripotency: Creating the right culture, *Stem Cell Rep.*, 8, 1457-1464 (2017).

第3章

層状組織形成に伴う多能性状態の変化

3.1 緒言

多能性幹細胞の集団に対して組織形成を誘導する際には、*in vivo*での胚発生過程を模倣するために、三次元培養環境においてシグナル分子などの生化学的因子の調節を行うことが多い[3-1, 3-2, 3-3]。これらの生化学的因子に加えて、工学技術を用いて作製した培養基板を用いて、基質の剛性、表面性状、接着領域パターンなどの細胞接着場を調節することで、組織形成過程における分化細胞の秩序を有した分布の自発的な出現や、立体組織の形成が誘導されることが報告されている[3-4, 3-5, 3-6]。したがって、第2章で示したように、多能性維持培養液を用いた条件において、微細加工メッシュ構造基板を用いて細胞接着場の調節のみを施してマウス ES 細胞の層状組織形成を誘導した場合にも、初期胚発生において見られるのと類似した多能性状態の変化が生じていることが考えられる。また、このような多能性状態の変化に伴い、細胞動態が変化することで、自発的な立体組織の形成が生じる可能性が考えられる。実際に、メッシュ構造基板を用いてヒト iPS 細胞を長期間に渡り培養した場合には、栄養芽細胞様細胞からなる嚢胞状の立体組織が形成されることが先行研究により明らかにされている[3-7, 3-8]。そこで、本章では、メッシュ構造基板を用いた層状組織形成において、自発的な多能性状態の変化に着目して、組織形成過程の観察と遺伝子発現変化の網羅的解析を行う。

マウス ES 細胞は、マウスの初期胚発生過程において、胚齢 3.5 日の胚盤胞における内部細胞塊から樹立された多能性状態である。胚が着床した後、内部細胞塊はエピブラスト（原始外胚葉）へと分化する。着床後の胚齢 6 日の卵筒胚において、後側のエピブラストから、始原生殖細胞（primordial germ cell; PGC）が出現する[3-9]。始原生殖細胞は、最も初期の生殖細胞系列の細胞であり、特にヒト始原生殖細胞を用いた研究は倫理的な観点から容易ではないため、多能性幹細胞から始原生殖細胞を作製する手法の開発は、医学・基礎生物学の両者において重要となっている。実際に、マウス多能性幹細胞およびヒト多能性幹細胞を始原生殖細胞様細胞へと分化させる手法は、初期胚発生過程における生化学的な分化条件を模倣して、培養環境を調節することにより既に確立され

ており、生殖系細胞へのさらなる分化を誘導する手法も開発されている[3-10,3-11]. 一方で、マウスの初期胚発生過程においては、組織内力学状態が細胞運命決定に重要な役割を果たすことが報告されている[3-12]. 特に、始原生殖細胞の出現領域を規定する前後軸の形成において、組織内力学状態が寄与していることが報告されている[3-13]. しかし、多能性幹細胞から始原生殖細胞への分化誘導過程においては、工学技術により作製した培養基板を用いた分化誘導手法は報告されておらず、細胞接着場の調節や組織内力学状態がどのような影響を及ぼすかについては十分に明らかでない.

本章では、細胞接着場の調節により誘導される層状組織形成過程において、マウス ES 細胞に生じる多能性状態の変化を明らかにすることを目的とした. そこで、まず、第 2 章において示したように、ナイーブ状態のマウス ES 細胞を微細加工メッシュ構造基板上で培養することで、層状組織の形成を誘導する. 次に、層状組織が形成された後、培養を継続した場合に形成される立体組織を観察する. さらに、この一連の組織形成過程における遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、多能性状態に関わるタンパク質の発現を調べることで、多能性状態に変化が生じていることを示す.

3.2 実験方法

3.2.1 マウス ES 細胞の多能性維持培養

本研究では、マウス ES 細胞株 E14tg2a (理研セルバンク) [3-14]を用い、G-MEM (富士フィルム和光純薬) に、15% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (富士フィルム和光純薬), 1% MEM non-essential amino acids (富士フィルム和光純薬), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (富士フィルム和光純薬), 1,000 units/mL leukemia inhibitory factor (LIF; 富士フィルム和光純薬) を加えた培養液を用いて多能性維持培養を行った. 細胞は、0.1% gelatin from porcine skin (gel strength 300, type A; Sigma-Aldrich) でコーティングした培養皿を用いて、37 °C, 5% CO₂ 環境で培養した. 継代時は、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を剥離させ、2 日間の培養には 7.0×10^3 cells/cm² に、3 日間の培養には 2.6×10^3 cells/cm² になるように細胞密度を調整して、新たな培養皿に播種した.

3.2.2 微細加工メッシュ構造基板の作製と細胞培養

微細加工メッシュ構造基板は、第 2.2.2 項で示した方法を用いて作製した。本研究では、一对の内角が 50° の菱形の網目が幅 $5\ \mu\text{m}$ の細線により形作られており、菱形の短い対角線長がそれぞれ $100\ \mu\text{m}$, $200\ \mu\text{m}$, $300\ \mu\text{m}$ である 3 種類のサイズの網目を有するメッシュ構造基板を設計して用いた。

細胞播種を行う前に、メッシュ構造基板を培養皿に設置し、 $10\ \mu\text{g/mL}$ laminin-511 E8 fragment (iMatrix-511; ニッピ) / phosphate buffered saline (PBS) 溶液により 4°C で 12 時間以上コーティングした。次に、 $200\ \mu\text{m}$ のメッシュ構造基板へ細胞を播種する場合には、細胞密度が $4.0\text{-}8.0\times 10^6\ \text{cells/mL}$ になるように調製した細胞懸濁液 $100\ \mu\text{L}$ をメッシュ構造基板上に静かに滴下し、細胞を播種した。 $100\ \mu\text{m}$ および $300\ \mu\text{m}$ のメッシュ構造基板へ細胞を播種する場合には、網目のサイズに応じて接着率が変化するため、細胞懸濁液 $100\ \mu\text{L}$ に含まれる細胞数をそれぞれ 0.5 倍 ($2.0\text{-}4.0\times 10^6\ \text{cells/mL}$) および 1.5 倍 ($6.0\times 10^6\text{-}1.2\times 10^7\ \text{cells/mL}$) に調製した。播種した細胞がメッシュ線に接着するように、 37°C , $5\%\ \text{CO}_2$ 環境下で 6 時間の培養を行った。その後、メッシュ構造基板に接着できずに落下した細胞を除去するため、細胞が接着したメッシュ構造基板を新しい培養皿へと移設し、新しい培養液を加えた。メッシュ構造基板に細胞を播種した時点を Day 0 と定めた。Day 3 以降も培養を継続する場合は、2, 3 日ごとに培養液を交換した。

3.2.3 免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察

細胞染色は、第 2.2.3 項で示した方法を用いて行った。免疫蛍光染色には、Table 3-1 に示した一次抗体と二次抗体を用いた。細胞核の染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:500; D1306; Thermo Fisher Scientific) を、アクチンフィラメントの染色には Alexa Flour 546 phalloidin (1:30; A22283; Thermo Fisher Scientific) を用いた。

蛍光画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV3000 (オリンパス) を用いて取得した。ライブイメージングには、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス) とステージトップインキュベーター INUG2-KIW (東海ヒット) を用いた。画像処理には Fiji [3-15] と Imaris (Bitplane) を用いた。

Table 3-1 | Lists of antibodies used for immunofluorescence microscopy.

Primary antibodies

Gene	Dilution	ID	Vendor
STELLA	1:200	ab19878	Abcam
AP-2 γ	1:100	sc-12762	Santa Cruz Biotechnology
BLIMP1	1:50	14-5963-80	Thermo Fisher Scientific
DAZL	1:200	ab34139	Abcam
OCT3/4	1:100	sc-5279	Santa Cruz Biotechnology
NANOG	1:200	ab80892	Abcam

Secondary antibodies

Name	Dilution	ID	Vendor
F(ab') ₂ -goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 546	1:500	A-11017 or A-11018	Thermo Fisher Scientific
F(ab') ₂ -goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 546	1:500	A-11070 or A-11071	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-rat IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody Alexa Fluor 647	1:500	A-21247	Thermo Fisher Scientific

3.2.4 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

細胞の total RNA は、ISOGEN (ニッポンジーン), chloroform, isopropanol を用いて RNA を含む水層を回収した後、NucleoSpin RNA (タカラバイオ) を用いて精製して抽出した。

DNA マイクロアレイ解析には、Clariom S Assay, mouse (Thermo Fisher Scientific) を用いた。解析に用いたサンプルは、dish-cultured mESCs ($n=3$), mesh-cultured cells at Day 2 ($n=3$), Day 3 ($n=3$), Day 6 ($n=4$) とした。マイクロアレイ解析結果に対する正規化処理と統計解析には Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 (Thermo Fisher Scientific) を、gene ontology (GO) enrichment 解析には DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) [3-16, 3-17, 3-18] を、階層的クラスタリング解析とヒートマップ作成には Multiple Experiment Viewer (<http://mev.tm4.org>) をそれぞれ用いた。

3.3 実験結果

3.3.1 組織形成誘導に伴う層状組織の形状変化

はじめに、異なるサイズの網目を有するメッシュ構造基板を用いてマウス ES 細胞を培養することで組織形成を誘導し、層状組織形成の様子を観察し、組織形状を比較した (Figure 3-1A)。比較のため、菱形の短い対角線長がそれぞれ 100 μm , 200 μm , 300 μm である 3 種類の網目サイズのメッシュ構造基板を用いた。網目が細胞に比べて非常に大きい場合、Day 0 では、いずれの網目サイズのメッシュ構造基板においても、メッシュ線に接着した細胞は網目をほとんど覆っていなかった (Figure 3-1A, Day 0)。Day 3 においては、網目サイズが小さいメッシュほど広い範囲に層状組織が形成されていたが、100 μm のメッシュ構造基板においても網目をすべて覆ってはいなかった (Figure 3-1A, Day 3)。この 100 μm のメッシュ構造基板は、第 2 章で用いたメッシュ構造基板よりも大きな網目を有しているため、ナイーブ状態のマウス ES 細胞を用いて LIF 条件で培養した場合でも、網目をすべて覆うことはなく、連続した層状組織は形成されなかったと

考えられる。続いて、Day 8 まで継続して培養すると、層状組織が厚みを増し、盛り上がった形状の立体組織を形成している様子が観察された (Figure 3-1A, Day 8)。特に、100 μm のメッシュ構造基板とは異なり、200 μm と 300 μm のメッシュ構造基板では、層状組織の一部からドーム状の立体組織が形成されていることが観察された。加えて、さらに培養を続けると、まれに球状の立体組織が形成されることがあった (Figure 3-1B)。この球状の立体組織は、phalloidin を用いたアクチンフィラメントの観察により、薄い単層組織であることがわかった。

メッシュ構造基板上での培養により誘導された組織形成における、層状組織とドーム状立体組織の形成という一連の組織形状変化は、LIF を添加した多能性維持培養液を用いていることから、生化学的因子による分化誘導ではなく、細胞接着場の調節により生じたものであると考えられる (Figure 3-2A)。そこで、この過程における組織形状を詳しく観察するため、網目サイズが 200 μm のメッシュ構造基板を用いて、マウス ES 細胞の組織形成過程における層状組織の形状変化を観察した。メッシュ構造基板への播種直後に観察した結果、メッシュ構造基板に播種した細胞のうち多くの細胞は接着できずに培養皿底面に落下していたが、メッシュ線上に接着できた細胞は足場に沿って伸展していた (Figure 3-2B, Day 0)。メッシュ線上の細胞は、増殖しながら細胞-細胞間接着を介して、次第にメッシュ線の存在しない網目を覆い始め、Day 3 頃にはメッシュ構造基板の一部の領域で、数細胞の厚みの層状組織を形成した (Figure 3-2B, Day 0-3)。培養を継続すると、位相差顕微鏡像で暗く写る領域が増えたことから、細胞は網目を覆うのを止め、層状組織の一部の厚みが増していく様子が観察された (Figure 3-2B, Day 3-4)。さらに、Day 4 から Day 6 にかけて、層状組織の一部が突出してドーム状の立体組織を形成した (Figure 3-2B, Day 4-6, yellow arrows)。形成されたドーム状組織の三次元再構築画像から、アクチンフィラメントが発達した数細胞の厚みの層状組織が、薄い中空の構造をなしていることがわかった (Figure 3-2C)。また、アクチンフィラメントはドームの内側表面よりも外側表面でより発達している様子が観察された。これらのドーム状の立体組織は、メッシュ構造基板の上側と下側の両方に形成されており、幅 200-400 μm 、高さ 50-200 μm 程度の大きさを有していた。

以上のように、メッシュ構造基板上でのマウス ES 細胞の培養により、層状組織の形成が誘導され、さらに培養を継続すると、層状組織の一部が突出してドーム状の立体組織が形成されることがわかった。このような組織形状の変化に伴い、多能性状態の変化が生じている可能性が考えられるため、以降では遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、その変化を明らかにする。

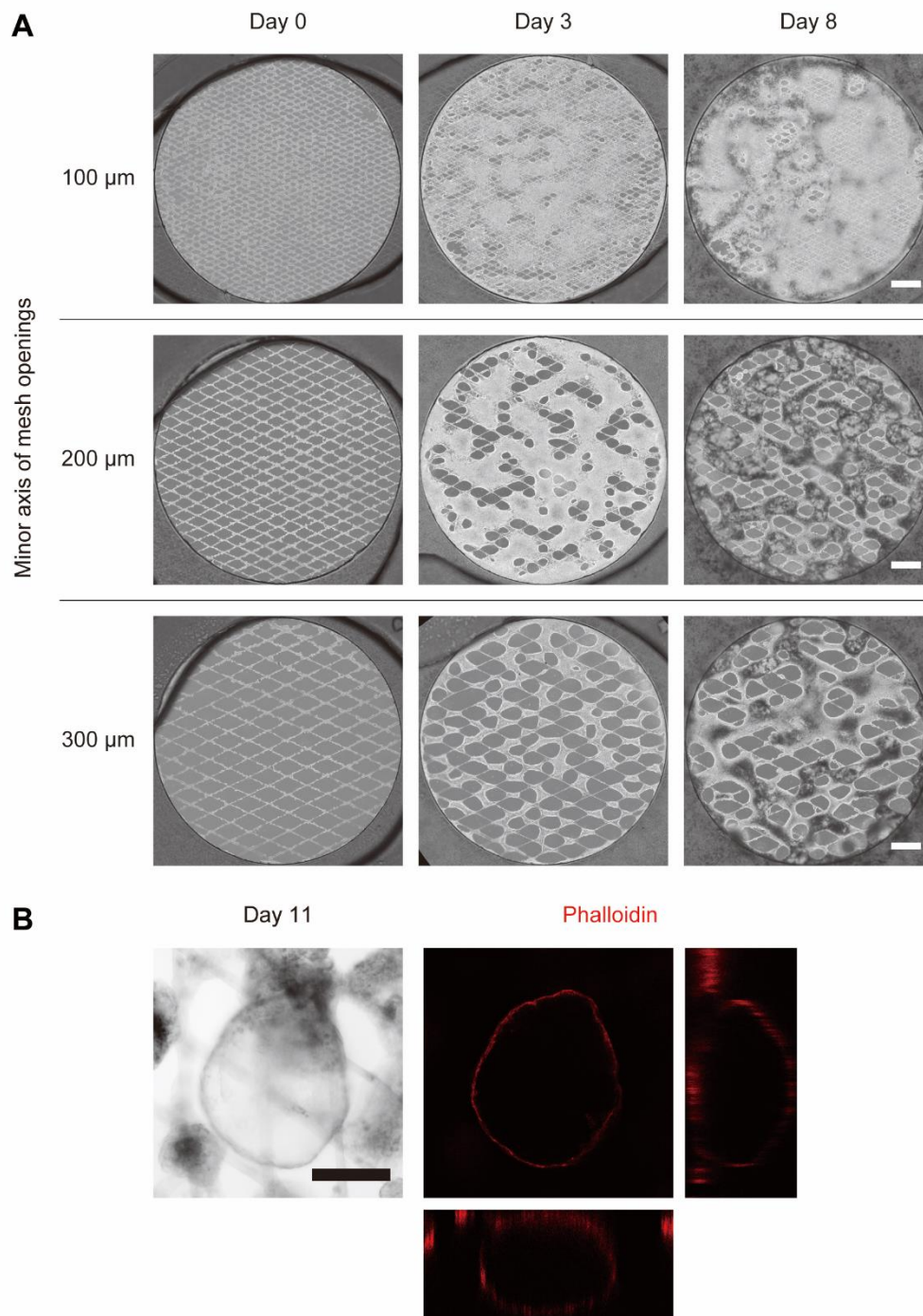


Figure 3-1 | Tissue formation induced by different sized mesh substrates. (A) The comparison between 3 types of mesh substrates at Day 0, 3 and 8. The 3 types of mesh substrates had different size of mesh openings which had the minor axes of 100, 200 or 300 μm . The cells could form cell layers more easily on finer mesh substrate at Day 3. The bigger and clearer dome-shaped tissues were able to be generated on the 200 μm mesh substrates. Scale bars: 500 μm . (B) The morphology of spherical cyst at Day 11 shown using confocal microscopy. Scale bar: 200 μm .

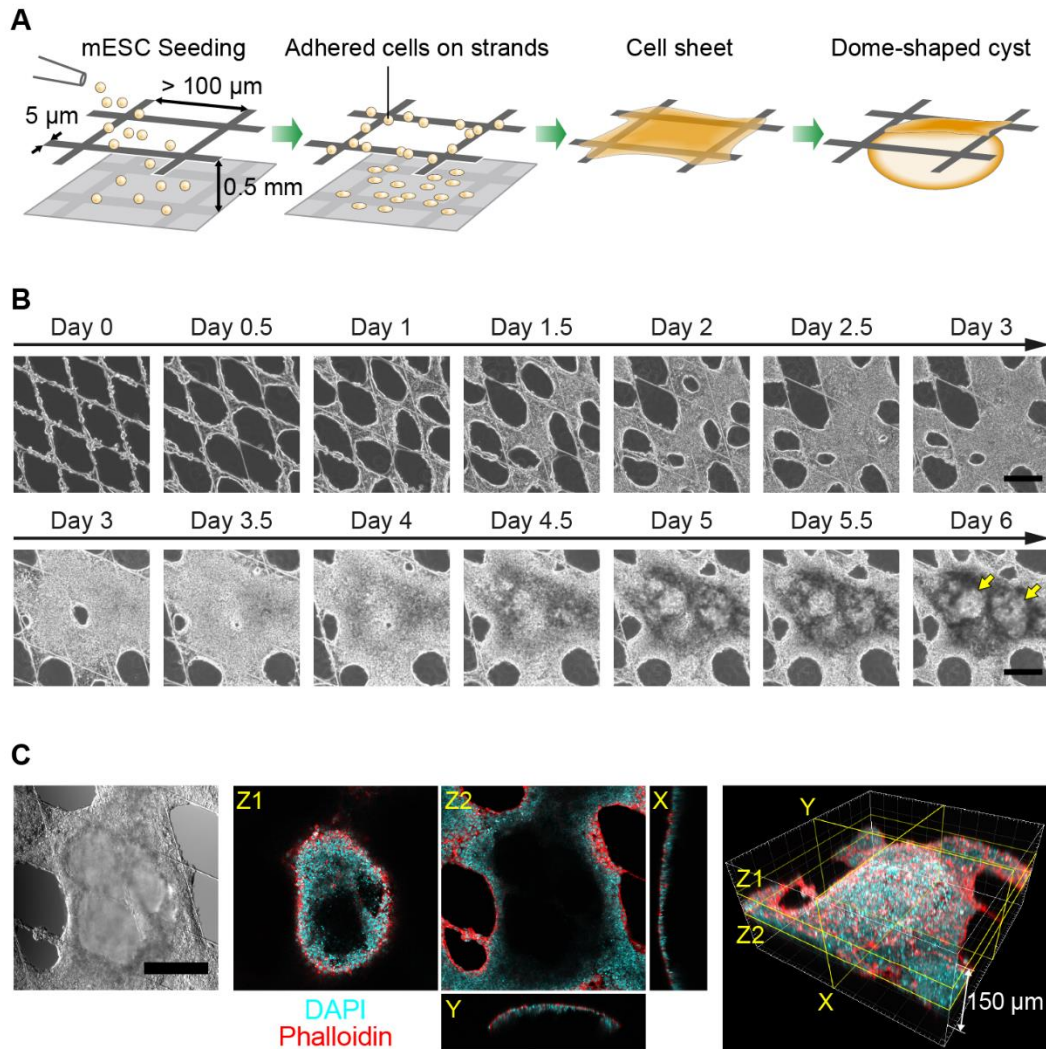


Figure 3-2 | Tissue formation of mESCs cultured on microstructured mesh substrates. (A) Schematic illustration of mESC culture on mesh substrates. mESCs cultured on the suspended mesh substrates formed cell layers and dome-shaped tissues. (B) Timelapse images of mesh-cultured mESCs from Day 0 to Day 3 and from Day 3 to Day 6, taken separately. Cells on the mesh lines proliferated successfully and began to fill the mesh openings to form cell layers by Day 3. Between Day 4 and Day 6, dome-shaped tissue formation occurred on the cell layers spontaneously. The yellow arrows on the image at Day 6 indicate the generated dome-shaped tissues. (C) Confocal and 3D reconstructed images of a dome-shaped tissue at Day 6. Scale bars: 200 μm .

3.3.2 層状組織形成過程における遺伝子発現の変化

メッシュ構造基板により誘導される組織形成過程においては、LIFを添加した多能性維持培養液を用いており、生化学的因子による分化誘導によるものではないことから、マウスES細胞の樹立元である内部細胞塊から発生可能な細胞系列と類似した遺伝子発現変化が生じることが予想される。そこで、メッシュ構造基板により誘導される組織形成過程において生じる遺伝子発現変化を調べるため、200 μm のメッシュ構造基板を用いてLIF条件にて培養したナীব状態のマウスES細胞に対して、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。解析には、培養皿上にてLIF条件で多能性維持培養を行ったDish mESC ($n=3$) をコントロールとして、メッシュ構造基板で培養したMesh Day 2 ($n=3$)、Mesh Day 3 ($n=3$)、Mesh Day 6 ($n=4$) の細胞を用いた。ここで、Day 2は層状組織形成の初期段階を、Day 3は層状組織がやや厚みを増した段階を、Day 6はドーム状の立体組織を形成する段階として定めた。

DNAマイクロアレイ解析の結果から、Dish mESCとMesh Day 2、Mesh Day 2とMesh Day 3、Mesh Day 3とMesh Day 6の2群間におけるそれぞれのfold changeに基づき、発現が大きく上昇した上位50遺伝子をTable 3-2に、発現が大きく低下した上位50遺伝子をTable 3-3に示した。その結果、大きく発現変化した遺伝子は、4条件のそれぞれの2群間において異なっていることがわかった。さらに、一元配置分散分析による4群間比較を行ったところ、 $P\text{-value} < 0.00001$ を満たす遺伝子は1,287個あり、さらには、これらの遺伝子に対して階層的クラスタリング解析 (Pearson correlation and average linkage, distance threshold=0.35)を行ったところ、8個のクラスターに分類された (Figure 3-3A)。メッシュ構造基板における組織形成過程において、発現上昇が認められた遺伝子群はクラスターI-Vに、発現低下が認められた遺伝子群はクラスターVI-VIIIに含まれている。さらに、それぞれのクラスターにおいて、クラスターに含まれる遺伝子に対してGO enrichment解析を行った。その結果、特に、クラスターI、II、III、IVにおいて、“GO:0050793~regulation of the developmental process”, “GO:0003006~developmental process involved in reproduction”, “GO:0022414~reproductive process”などの発生過程や生殖に関わるGO termが多く抽出された (Table 3-4)。

次に、メッシュ構造基板上でマウスES細胞が示す遺伝子発現変化を明らかにするために、マウスの初期胚発生に関わるマーカー遺伝子の発現を調べた。はじめに、三胚葉へと分化した細胞が示すマーカー遺伝子[3-19]の発現変化をそれぞれ調べたところ、特徴的な発現変化は確認できなかった (Figure 3-3B)。続いて、マウスの初期胚発生にお

いて、ES 細胞の樹立元である内部細胞塊が存在する胚齢 3.5 日の胚盤胞から、始原生殖細胞が出現する胚齢 6 日の卵筒胚までに出現する各細胞系列のマーカー遺伝子の発現変化を調べた。その結果、生殖細胞系列への分化に関わるマーカー遺伝子[3-10, 3-20, 3-21]として、BLIMP1 (*Prdm1*), AP-2 γ (*Tfap2c/Tcfap2c*), PRDM14 を中心とした始原生殖細胞の転写制御ネットワーク[3-20]に含まれる遺伝子に発現変化が見受けられた (Figure 3-4A)。特に、始原生殖細胞のマーカー遺伝子である *Prdm1*, *Tfap2c*, *Prdm14*, *Dppa3/Stella/Pgc7*, *Kit*, *Dazl* の発現が有意に (P-value < 0.00002) 上昇していることがわかった。中でも、*Tfap2c*, *Kit*, *Dazl* は fold change で 10 倍以上に発現上昇していた (Figure 3-4B)。また、始原生殖細胞分化において発現が抑制されることが知られている、DNA メチル化を促進する遺伝子や体細胞分化に関わる遺伝子[3-10, 3-20, 3-21]の発現変化を調べたところ、*Dnmt3b*, *Myc*, *T* は fold change で 10 分の 1 以下に低下していた (Figure 3-4B)。しかし、*Nanos3*, *Dnd1* は、*in vitro* で始原生殖細胞を作製した先行研究[3-10, 3-21]の結果とは異なり、発現上昇を示さず、低い発現を維持していた (Figure 3-4A)。一方、初期胚発生において始原生殖細胞と同時期に出現するエピブラスト、原始内胚葉、栄養外胚葉のマーカー遺伝子[3-10, 3-22, 3-23]の発現変化を調べたところ、特徴的な発現変化は確認されなかった (Figure 3-4A)。加えて、マウス ES 細胞の多能性マーカー遺伝子である *Pou5f1* (OCT3/4) は有意な発現変化を示さず、*Nanog*, *Sox2* は発現上昇を示した (Figure 3-4C)。これらの多能性に関わる遺伝子が始原生殖細胞においても高い発現を示すことは、先行研究[3-10]においても観察されている。以上のことから、メッシュ構造基板上で培養したマウス ES 細胞は、その層状組織形成過程において、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化を示すことを明らかにした。

Table 3-2 | List of top 50 up-regulated genes and their corresponding fold change (F.C.) values compared between; dish-cultured control mESCs and mesh-cultured cells at Day 2, mesh-cultured cells at Day 2 and 3, and mesh-cultured cells at Day 3 and 6.

Mesh Day 2 / Dish mESC		Mesh Day 3 / Mesh Day 2		Mesh Day 6 / Mesh Day 3	
Gene symbol	F.C.	Gene symbol	F.C.	Gene symbol	F.C.
<i>Aldoc</i>	16.8	<i>Zscan4f</i>	5.07	<i>Serpib9e</i>	25.83
<i>Ndufa412</i>	16.18	<i>Tuba3a</i>	4.31	<i>Arhgef6</i>	21.41
<i>Egln3</i>	13.28	<i>Ass1; Gm5424</i>	3.73	<i>Gm11397</i>	16.51
<i>Bnip3</i>	12.45	<i>Igf2</i>	3.67	<i>Serpib9g</i>	16.07
<i>Ccng2</i>	10.33	<i>Gm2a</i>	3.6	<i>Plac1</i>	16.04
<i>Lrrc34</i>	9.9	<i>Adgre5; Mir1668</i>	3.59	<i>Dlk1</i>	11.69
<i>Sycp3</i>	9.88	<i>Mobp</i>	3.47	<i>Tns4</i>	8.93
<i>Iqcb1</i>	9.53	<i>Zscan4d</i>	3.46	<i>Serpib9d</i>	7.61
<i>Fabp3</i>	9.03	<i>Ephx1</i>	3.45	<i>Tinagl1</i>	7.51
<i>Gm11096</i>	8.98	<i>Tfap2c</i>	3.44	<i>Serpib9f</i>	7.37
<i>Ephx2</i>	8.86	<i>Alpl</i>	3.36	<i>Nxf7</i>	7.13
<i>Meiob</i>	8.75	<i>Lama1</i>	3.33	<i>Fam90a1b</i>	6.64
<i>Lamp2</i>	8.7	<i>Sohlh2</i>	3.31	<i>Rhox9</i>	6.6
<i>Prelid2</i>	8.47	<i>Sdc4</i>	3.29	<i>Dazl</i>	6.3
<i>Lrrc31</i>	8.34	<i>Inpp5d</i>	3.27	<i>Hand1</i>	6.3
<i>Got1l1</i>	7.96	<i>Pacsin1</i>	3.21	<i>Knng1</i>	6.05
<i>Ldhd</i>	7.82	<i>Sptbn2</i>	3.17	<i>Rhox6</i>	5.85
<i>Sox15</i>	7.72	<i>Aebp1</i>	3.12	<i>Gpr50</i>	5.45
<i>Dzip3</i>	7.69	<i>Crtac1</i>	3.11	<i>Parm1</i>	5.45
<i>Usp11</i>	7.56	<i>Zscan4c</i>	3.05	<i>Sep4</i>	5.45
<i>Clybl</i>	7.54	<i>Mep1b</i>	2.99	<i>Plet1</i>	4.5
<i>Cntd1</i>	7.4	<i>Aqp3</i>	2.99	<i>Dysf</i>	4.36
<i>Ddit4</i>	7.29	<i>Zscan4b</i>	2.99	<i>Syna</i>	4.25
<i>Zc3h6</i>	7.15	<i>Glpr1</i>	2.97	<i>Lgals9</i>	4.12
<i>Txnip</i>	7.02	<i>Mctpl</i>	2.93	<i>2610528A11Rik</i>	4.07
<i>Pik3ip1</i>	7	<i>Acp6</i>	2.91	<i>Vnn1</i>	3.82
<i>Pycr1</i>	6.83	<i>Hesx1</i>	2.9	<i>Serpine1</i>	3.77
<i>Dram2</i>	6.77	<i>Pde8a</i>	2.88	<i>Mmp2</i>	3.75
<i>Kit</i>	6.72	<i>Kit</i>	2.85	<i>Nr2f2</i>	3.62
<i>Igf2</i>	6.7	<i>Acss1</i>	2.83	<i>3830417A13Rik</i>	3.6
<i>Pacsin1</i>	6.64	<i>Rhox9</i>	2.81	<i>Isg20</i>	3.6
<i>Pgm2</i>	6.47	<i>Rbm47</i>	2.8	<i>Lims2</i>	3.6
<i>Scaper</i>	6.46	<i>Ptch1</i>	2.8	<i>Pparg</i>	3.58
<i>Acot13</i>	6.44	<i>Khdc3</i>	2.76	<i>Usp29</i>	3.56
<i>Foxj1; Rnf157</i>	6.35	<i>Pygl</i>	2.76	<i>Zim1</i>	3.52
<i>Gstm3</i>	6.12	<i>Tbx3</i>	2.74	<i>Phf19</i>	3.49
<i>Pltp</i>	5.88	<i>Syne2; Mir5101</i>	2.73	<i>Npnt</i>	3.49
<i>Gbp3</i>	5.79	<i>Gstp1</i>	2.7	<i>Igf2</i>	3.48
<i>Pfkip</i>	5.56	<i>Hpcal1</i>	2.7	<i>Krt7</i>	3.47
<i>Sep1</i>	5.46	<i>Cdh6</i>	2.69	<i>St3gal1</i>	3.44
<i>Mpv17l</i>	5.29	<i>Gstp2</i>	2.67	<i>Myl4</i>	3.41
<i>Rad51b</i>	5.13	<i>Cmklr1</i>	2.65	<i>Serpib9b</i>	3.33
<i>Smc1b</i>	5.09	<i>Bmp7</i>	2.61	<i>Man1a</i>	3.3
<i>Gstk1</i>	5.08	<i>Pld1</i>	2.6	<i>Ndr1</i>	3.27
<i>Gm17266</i>	5.06	<i>Aurkc</i>	2.6	<i>Zfp36l3</i>	3.12
<i>Crebrf</i>	5.06	<i>Zscan4e</i>	2.59	<i>Zc3hav1</i>	3.11
<i>Slc25a36</i>	4.88	<i>Parvb</i>	2.55	<i>Gm3934</i>	3.08
<i>Krt7</i>	4.84	<i>Casz1</i>	2.54	<i>Cd55b</i>	3.01
<i>Rfesd</i>	4.77	<i>Eng</i>	2.53	<i>Tulp1</i>	3
<i>Triml1</i>	4.68	<i>Gm5662</i>	2.51	<i>Tcn2</i>	2.99
<i>Ndr2</i>	4.65	<i>Idh2</i>	2.5	<i>Smc1b</i>	2.96

Table 3-3 | List of top 50 down-regulated genes and their corresponding fold change (F.C.) values compared between; dish-cultured control mESCs and mesh-cultured cells at Day 2, mesh-cultured cells at Day 2 and 3, and mesh-cultured cells at Day 3 and 6.

Mesh Day 2 / Dish mESC		Mesh Day 3 / Mesh Day 2		Mesh Day 6 / Mesh Day 3	
Gene symbol	F.C.	Gene symbol	F.C.	Gene symbol	F.C.
<i>Nefl</i>	-15.29	<i>Gm11096</i>	-15.28	<i>Lefty2</i>	-7.14
<i>Tmem54</i>	-8.22	<i>T; t</i>	-8.37	<i>Dok2</i>	-6.33
<i>Myc</i>	-7.81	<i>Gm17482</i>	-7.22	<i>Lefty1</i>	-5.69
<i>Pop1</i>	-7.29	<i>Gbp2</i>	-7	<i>Zscan4f</i>	-5.52
<i>Gng3</i>	-7.2	<i>Dok2</i>	-6.97	<i>Ina</i>	-5.34
<i>Gabra5</i>	-7.09	<i>Sprrr2a3; Sprrr2a1</i>	-6.41	<i>Pcolce2</i>	-5.06
<i>Syt11</i>	-6.76	<i>Kcnj3</i>	-5.91	<i>Pcyt1b</i>	-4.82
<i>Dnmt3b</i>	-6.58	<i>Pim2</i>	-5.56	<i>Csn3</i>	-4.33
<i>Dnmt3l</i>	-6.36	<i>Sprrr2a2; Sprrr2a1</i>	-5.12	<i>Zscan4d</i>	-4.13
<i>Coch</i>	-6.21	<i>Gbp3</i>	-4.93	<i>Zscan4c</i>	-4.01
<i>Epha2</i>	-6.09	<i>Ghr</i>	-4.83	<i>Spry4</i>	-3.89
<i>Enpp2</i>	-5.95	<i>Tbx20</i>	-4.67	<i>Zscan4f</i>	-3.69
<i>Car3</i>	-5.91	<i>Slc6a15</i>	-4.34	<i>Gbp2</i>	-3.66
<i>Zfp423</i>	-5.74	<i>Cxcl16</i>	-4.08	<i>Zscan4e</i>	-3.51
<i>Srf</i>	-5.64	<i>Nefl</i>	-4.05	<i>Calml4</i>	-3.46
<i>Acta2</i>	-5.56	<i>Ltb</i>	-3.89	<i>Zscan4b</i>	-3.39
<i>Ccnd1; Mir3962</i>	-5.54	<i>Cxcl11</i>	-3.83	<i>Zscan4a</i>	-3.3
<i>Nes</i>	-5.53	<i>Igfbp3</i>	-3.8	<i>Tagln</i>	-3.12
<i>Tgm1</i>	-5.38	<i>Slc39a8</i>	-3.76	<i>Elavl3</i>	-2.99
<i>Sfn</i>	-5.36	<i>Zdhhc15</i>	-3.75	<i>Gm5662</i>	-2.97
<i>N6amt2</i>	-5.36	<i>Parp12</i>	-3.67	<i>Bcl3</i>	-2.95
<i>Zfp365</i>	-5.21	<i>Cyp2j13</i>	-3.62	<i>Tmem254c; Tmem2.</i>	-2.92
<i>St8sia3</i>	-5.16	<i>Ppp4r4</i>	-3.6	<i>Fndc3c1</i>	-2.87
<i>Crmp1</i>	-5.09	<i>Tspan6</i>	-3.6	<i>Glipr1</i>	-2.85
<i>Cnn1</i>	-4.94	<i>Efemp1</i>	-3.59	<i>Crmp1</i>	-2.84
<i>Foxi3</i>	-4.72	<i>Irf1</i>	-3.56	<i>Cldn9</i>	-2.82
<i>E2f8</i>	-4.54	<i>Psmb8</i>	-3.52	<i>Tuba4a</i>	-2.79
<i>Slc27a2</i>	-4.53	<i>Oasl2</i>	-3.5	<i>Tmem254b;</i> <i>Tmem254c; Tmem2.</i>	-2.79
<i>Vrtm</i>	-4.49	<i>Mmp25</i>	-3.47	<i>Gng3</i>	-2.72
<i>Wdr46</i>	-4.47	<i>Mapk4</i>	-3.46	<i>Mapk11</i>	-2.67
<i>Bop1</i>	-4.45	<i>Vwa5a</i>	-3.45	<i>Isyna1</i>	-2.65
<i>Spink1</i>	-4.41	<i>Cnn1</i>	-3.45	<i>Car2</i>	-2.62
<i>Ncdn</i>	-4.4	<i>BC023829</i>	-3.32	<i>Rab31</i>	-2.61
<i>Nbeal2; Mir8107</i>	-4.33	<i>Sema6a</i>	-3.28	<i>Epha2</i>	-2.59
<i>Fasn</i>	-4.29	<i>Car2</i>	-3.27	<i>Acta1</i>	-2.57
<i>Htr1b</i>	-4.25	<i>Dtx3l</i>	-3.24	<i>Stmn2</i>	-2.54
<i>Akr1b8</i>	-4.25	<i>Lpar4</i>	-3.22	<i>Tmem54</i>	-2.52
<i>Scap</i>	-4.22	<i>Anxa3</i>	-3.21	<i>Tmem254c; Tmem2.</i>	-2.47
<i>Neto2</i>	-4.2	<i>Cd274</i>	-3.2	<i>Ccne1</i>	-2.45
<i>Dlk1</i>	-4.19	<i>Irgm1</i>	-3.19	<i>Pla2g1b</i>	-2.44
<i>Igsf9</i>	-4.16	<i>Fndc3c1</i>	-3.19	<i>Tmem8</i>	-2.43
<i>Sult4a1</i>	-4.15	<i>Gbp7</i>	-3.14	<i>Tmem180</i>	-2.41
<i>Noct</i>	-4.14	<i>Acta1</i>	-3.13	<i>Hist1h1b</i>	-2.41
<i>Polr1b</i>	-4.08	<i>Gm8069</i>	-3.06	<i>Depdc7</i>	-2.4
<i>2900011008Rik</i>	-4.07	<i>Trim67</i>	-3.05	<i>Trim36</i>	-2.4
<i>Ccdc85a</i>	-4.07	<i>Tmem176b</i>	-3.05	<i>Dhcr7</i>	-2.38
<i>Elac2</i>	-4.04	<i>Slc27a2</i>	-3	<i>Gm21293; Gm4340</i>	-2.37
<i>Srm</i>	-4.04	<i>Gstt2</i>	-3	<i>Aven</i>	-2.37
<i>Pcolce2</i>	-4.04	<i>Mab21l2</i>	-2.97	<i>Gbp3</i>	-2.36
<i>Nolc1</i>	-4.03	<i>Syp</i>	-2.96	<i>Id3</i>	-2.36
<i>Cltb</i>	-4.03	<i>Mal2</i>	-2.95	<i>Ly6c1</i>	-2.34

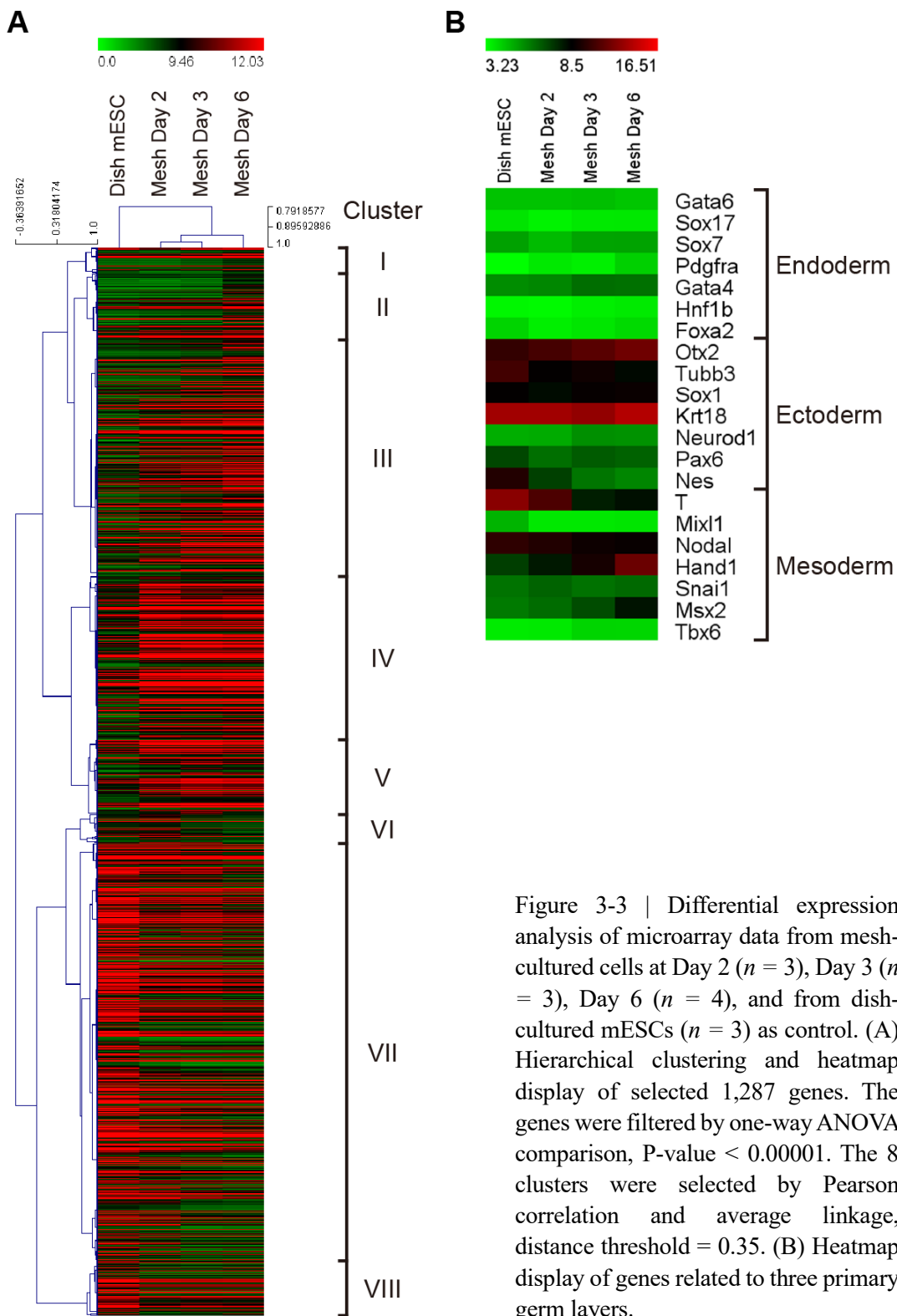


Figure 3-3 | Differential expression analysis of microarray data from mesh-cultured cells at Day 2 ($n = 3$), Day 3 ($n = 3$), Day 6 ($n = 4$), and from dish-cultured mESCs ($n = 3$) as control. (A) Hierarchical clustering and heatmap display of selected 1,287 genes. The genes were filtered by one-way ANOVA comparison, P -value < 0.00001 . The 8 clusters were selected by Pearson correlation and average linkage, distance threshold = 0.35. (B) Heatmap display of genes related to three primary germ layers.

Table 3-4 | Lists of top 10 enriched gene ontology (GO) terms and the EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) scores using DAVID Bioinformatics Resources 6.8 in Cluster I-VIII. The red-highlighted terms are related to developmental process or reproductions. The GO terms are included in “GOTERM_BP_2” category, which is at level 2 of “Biological Process” hierarchy in GO database. EASE score is the modified Fisher’s exact test P-value developed by DAVID. [Table 3-4 continued next page.]

Cluster I (31 genes)				Cluster II (80 genes)			
GO term	EASE	GO term	EASE	GO term	EASE	GO term	EASE
GO:0048523~negative regulation of cellular process	3.02E-04	GO:0003006~developmental process involved in reproduction	0.00795	GO:0002684~positive regulation of immune system process	0.018847	GO:0006955~immune response	0.026664
GO:0048519~negative regulation of biological process	7.15E-04	GO:0006950~response to stress	0.028303	GO:0006950~response to stress	0.028647	GO:002682~regulation of immune system process	0.028673
GO:0050794~regulation of cellular process	0.022649	GO:0022414~reproductive process	0.028647	GO:0048583~regulation of response to stimulus	0.032637	GO:0048585~negative regulation of response to stimulus	0.043895
GO:0023057~negative regulation of signaling	0.023428	GO:0050793~regulation of developmental process	0.039725	GO:0009605~response to external stimulus	0.052223	GO:0048523~negative regulation of cellular process	0.071399
GO:0023051~regulation of signaling	0.038895	GO:0048585~negative regulation of response to stimulus	0.040964				
GO:0050793~regulation of developmental process	0.039725	GO:0030155~regulation of cell adhesion	0.062874				
GO:0048585~negative regulation of response to stimulus	0.040964	GO:0007155~cell adhesion	0.072212				
GO:0030155~regulation of cell adhesion	0.062874	GO:0048583~regulation of response to stimulus	0.090628				
GO:0007155~cell adhesion	0.072212						
GO:0048583~regulation of response to stimulus	0.090628						

Cluster III (285 genes)				Cluster IV (197 genes)			
GO term	EASE	GO term	EASE	GO term	EASE	GO term	EASE
GO:0044707~single-multicellular organism process	2.96E-06	GO:0022402~cell cycle process	8.00E-05	GO:1903046~meiotic cell cycle process	4.54E-04	GO:0051321~meiotic cell cycle	0.001829
GO:0009893~positive regulation of metabolic process	8.80E-06	GO:0051321~meiotic cell cycle	0.001829	GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	0.002752	GO:0006914~autophagy	0.003315
GO:0019222~regulation of metabolic process	6.10E-05	GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	0.002752	GO:0044237~cellular metabolic process	0.004869	GO:0006950~response to stress	0.010439
GO:0009056~catabolic process	8.27E-05	GO:0006914~autophagy	0.003315	GO:0006950~response to stress	0.010439	GO:0044238~primary metabolic process	0.014578
GO:0044767~single-organism developmental process	1.04E-04	GO:0044237~cellular metabolic process	0.004869	GO:0044238~primary metabolic process	0.014578	GO:0048523~negative regulation of cellular process	0.026692
GO:0008283~cell proliferation	1.20E-04	GO:0006950~response to stress	0.010439	GO:0048523~negative regulation of cellular process	0.026692	GO:0022414~reproductive process	0.032758
GO:0048522~positive regulation of cellular process	1.77E-04	GO:0022414~reproductive process	0.032758				
GO:0003006~developmental process involved in reproduction	1.81E-04						
GO:0044237~cellular metabolic process	1.86E-04						
GO:0048518~positive regulation of biological process	1.87E-04						

Cluster V (90 genes)		Cluster VI (35 genes)	
GO term	EASE	GO term	EASE
GO:0044710~single-organism metabolic process	4.85E-04	GO:0044406~adhesion of symbiont to host	2.96E-04
GO:0009056~catabolic process	0.002938	GO:0042221~response to chemical	4.14E-04
GO:1902578~single-organism localization	0.025941	GO:0019882~antigen processing and presentation	0.002055
GO:0009628~response to abiotic stimulus	0.027805	GO:0009893~positive regulation of metabolic process	0.00277
GO:0051235~maintenance of location	0.041365	GO:0006955~immune response	0.004211
GO:0042221~response to chemical	0.070387	GO:0048583~regulation of response to stimulus	0.006572
GO:0051051~negative regulation of transport	0.072873	GO:0009605~response to external stimulus	0.0128
GO:0006950~response to stress	0.07716	GO:0051716~cellular response to stimulus	0.014233
GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	0.085239	GO:0019222~regulation of metabolic process	0.030664
GO:0044707~single-multicellular organism process	0.095817	GO:0023051~regulation of signaling	0.041862

Cluster VII (503 genes)		Cluster VIII (66 genes)	
GO term	EASE	GO term	EASE
GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	8.62E-14	GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	5.67E-04
GO:0044237~cellular metabolic process	4.70E-11	GO:0009892~negative regulation of metabolic process	0.002461
GO:0044238~primary metabolic process	2.58E-09	GO:0008283~cell proliferation	0.004557
GO:0044085~cellular component biogenesis	7.31E-09	GO:0044237~cellular metabolic process	0.016762
GO:0071704~organic substance metabolic process	9.00E-09	GO:0071704~organic substance metabolic process	0.018575
GO:0009058~biosynthetic process	9.33E-08	GO:0043900~regulation of multi-organism process	0.018964
GO:0016043~cellular component organization	5.77E-07	GO:0044238~primary metabolic process	0.019037
GO:0048522~positive regulation of cellular process	8.72E-07	GO:0098602~single organism cell adhesion	0.020556
GO:0048518~positive regulation of biological process	1.35E-06	GO:0002520~immune system development	0.020639
GO:0008283~cell proliferation	1.80E-06	GO:0048523~negative regulation of cellular process	0.02209

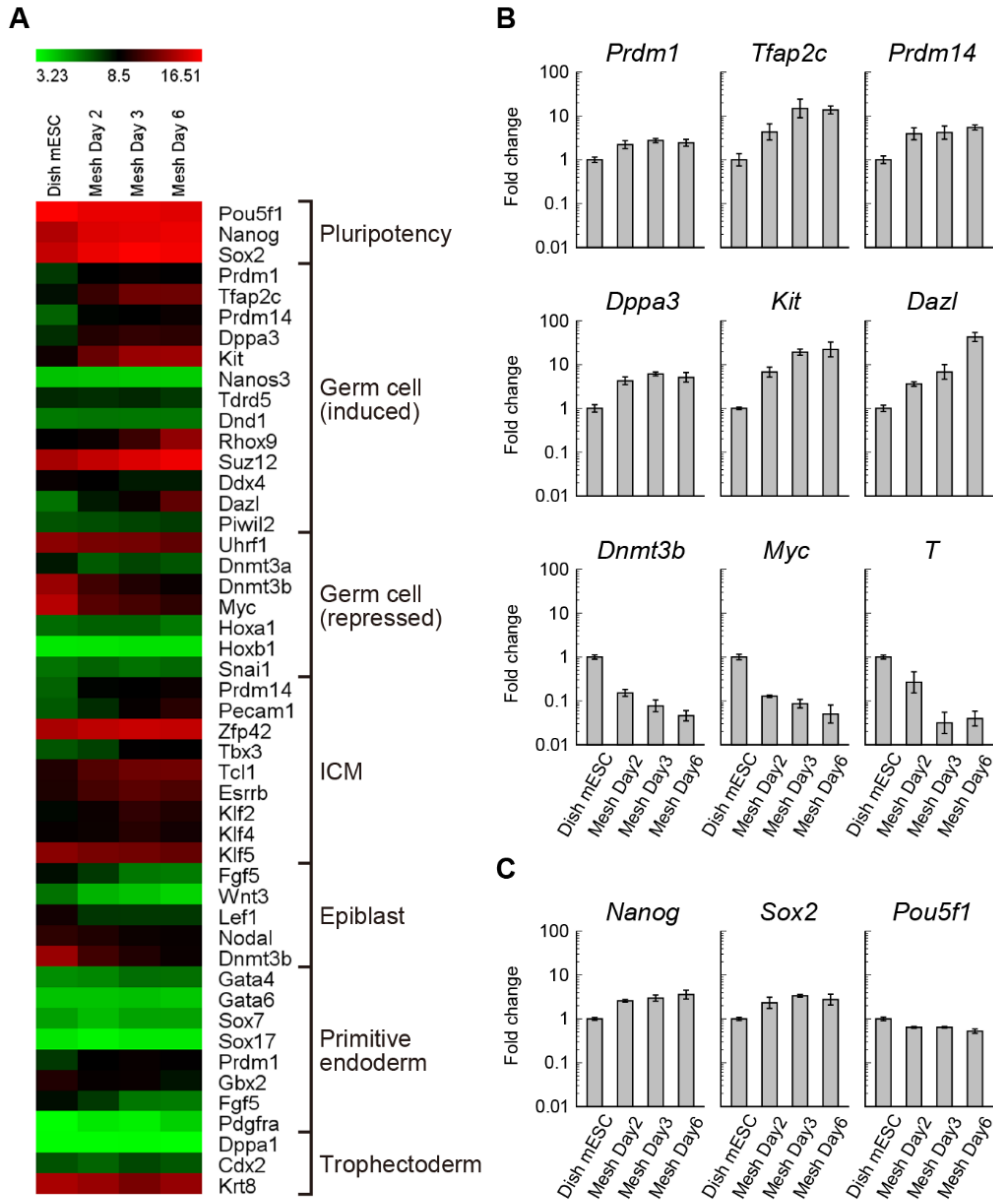


Figure 3-4 | Differential expression analysis of microarray data for PGC-related genes from mesh-cultured cells at Day 2 ($n = 3$), Day 3 ($n = 3$), Day 6 ($n = 4$), and from dish-cultured mESCs ($n = 3$) as control. (A) Heatmap display of genes related to germ cell and early embryogenesis. (B) Fold changes of PGC marker genes (*Prdm1*, *Tfap2c*, *Prdm14*, *Dppa3*, *Kit* and *Dazl*) in log₁₀ scale, with SDs. (C) Fold changes of mESC pluripotency marker genes (*Nanog*, *Sox2* and *Pou5f1*) in log₁₀ scale, with SDs.

3.3.3 多能性状態の変化を示すタンパク質の発現

第 3.3.2 項の DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的解析では、mRNA の発現により、層状組織形成過程における遺伝子発現の変化を調べた。本項では、同様の条件により培養した、培養皿で多能性維持培養した Dish mESC と、メッシュ構造基板上で培養した Mesh Day 2 および Mesh Day 6 にあたる細胞に対して、免疫蛍光染色法により多能性マーカー遺伝子および始原生殖細胞マーカー遺伝子のタンパク質発現を調べた。これにより、メッシュ構造基板上での層状組織形成過程における多能性状態の変化を明らかにする。

免疫蛍光染色は、多能性マーカー遺伝子のうち NANOG, OCT3/4 (*Pou5f1*) に対して、また、始原生殖細胞マーカー遺伝子のうち、第 3.3.2 項の遺伝子発現変化の網羅的解析において有意な発現上昇が認められた STELLA (*Dppa3*), AP-2 γ (*Tfap2c*), BLIMP1 (*Prdm1*), DAZL に対して施した (Figure 3-5)。NANOG と OCT3/4 の発現は、Dish mESC および Mesh Day 2 では多くの細胞において観察されたが、Mesh Day 6 では一部の細胞のみが強く発現している様子が観察された。特に、NANOG については、Dish mESC および Mesh Day 2 において発現が認められない細胞も少なからず存在しており、ほぼ一様に発現している OCT3/4 に比べて不均一な発現分布を示していた。これらの結果は、DNA マイクロアレイによる解析結果が一部の高発現の細胞に敏感である性質などを加味すれば、第 3.3.2 項で示した遺伝子発現変化の結果と一致していると考えられる。STELLA は、Dish mESC では微弱な蛍光が観察できたのみであったが、Mesh Day 2 および Day 6 では強い発現が観察された。特に、Day 6 においては、STELLA の発現は不均一な分布を示した。AP-2 γ は、Dish mESC ではほぼ発現が観察されなかったが、Mesh Day 2 および Day 6 では一部の細胞で発現していることが確認でき、AP-2 γ を強く発現している細胞の多くは層状組織の周縁部に位置していた。BLIMP1 は、Dish mESC では発現が確認されなかったが、Mesh Day 2 および Day 6 では微弱な蛍光が観察できた。しかし、先行研究の観察結果[3-22]とは異なり、細胞核に局在した発現ではなく、細胞全体において蛍光が観察されたことに留意する必要がある。DAZL は、Dish mESC では発現が観察されなかったが、Mesh Day 2 および Day 6 では明確な蛍光が観察され、AP-2 γ と同様に層状組織の周縁部に特異的な発現が観察された。

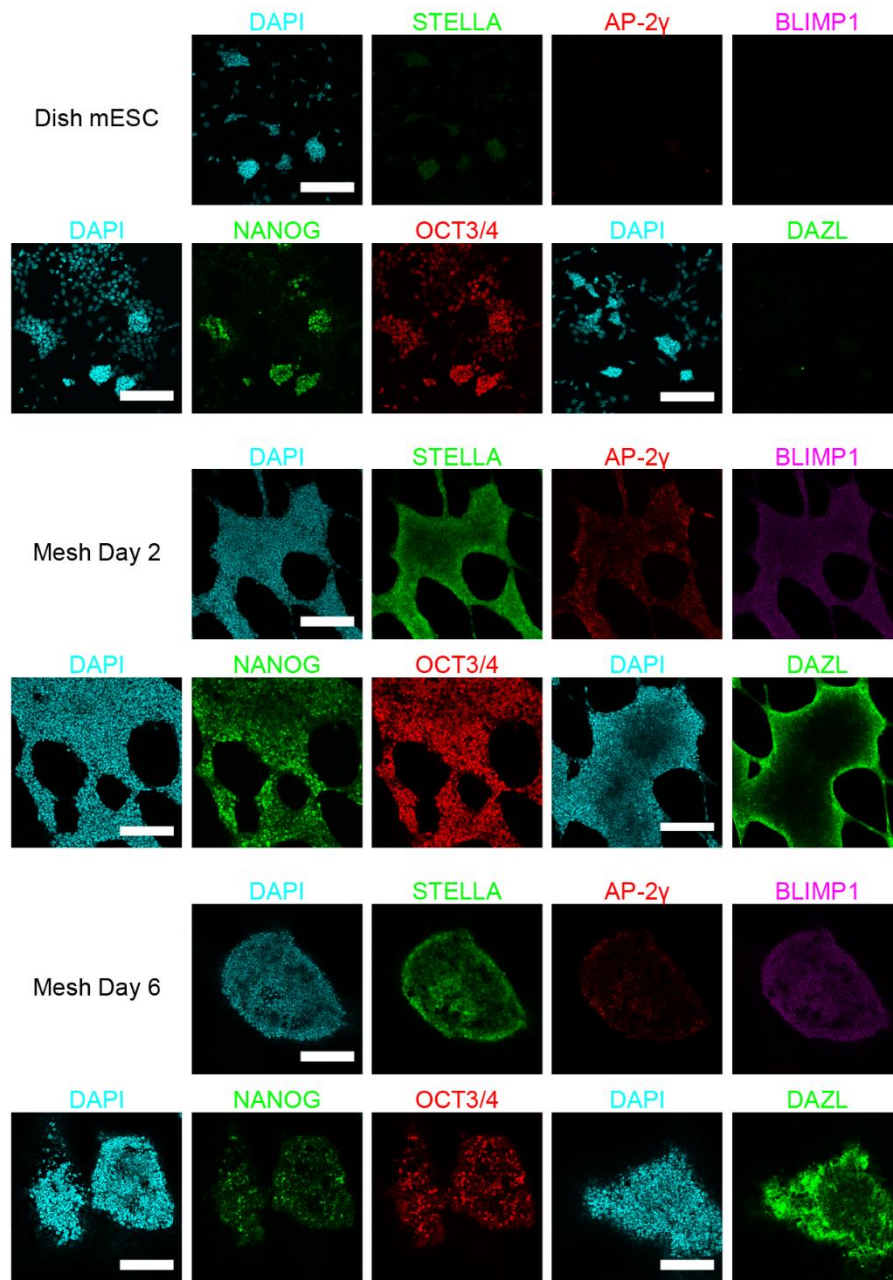


Figure 3-5 | Comparative expression of PGC and pluripotency markers in dish-cultured mESCs versus mesh-cultured cells at Day 2 and Day 6 obtained by confocal microscopy. We performed immunofluorescence staining for STELLA (green), AP-2 γ (red), BLIMP1 (purple), DAZL (green), NANOG (green) and OCT3/4 (red). For each sample, co-staining was performed for STELLA, AP-2 γ and BLIMP1, and separately for NANOG and OCT3/4. Scale bars: 200 μ m.

以上の結果から、メッシュ構造基板上での層状組織形成過程において、多能性マーカー遺伝子および始原生殖細胞マーカー遺伝子のタンパク質発現に変化が生じていることが観察できた。特に、Dish mESC においてほとんど観察されなかった始原生殖細胞マーカー遺伝子のタンパク質発現が、Mesh Day 2 および Day 6 において確認できた。しかし、Day 6 までに自発的に形成される幅 200-400 μm 程度のドーム状の立体組織において、始原生殖細胞マーカータンパク質の発現と立体組織形成が生じた領域の両者に関連があることを示唆する結果は得られなかった (Figure 3-5 & 3-6)。このことは、メッシュ構造基板上で培養したナイーブ状態のマウス ES 細胞において、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化と、ドーム状の立体組織の形成は、異なる段階で生じていることを示している。実際、DNA マイクロアレイによる解析結果より、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化は Day 2 から認められることも、このことを支持している (Figure 3-4)。

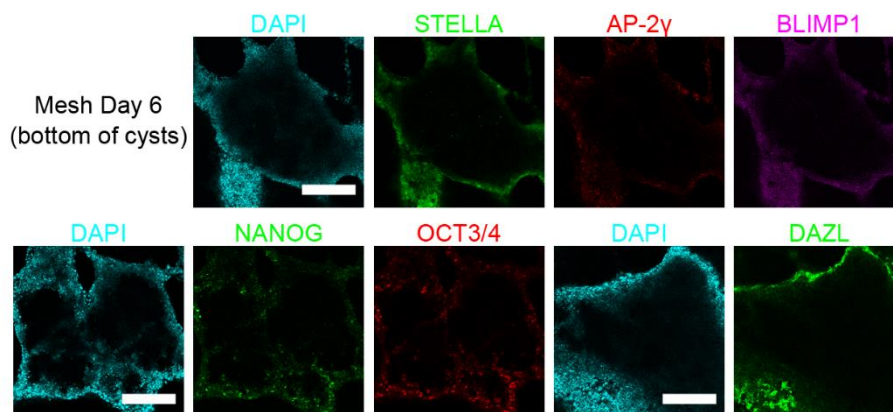


Figure 3-6 | Comparative expression of PGC and pluripotency markers in dish-cultured mESCs versus mesh-cultured cells at Day 2 and Day 6 obtained by confocal microscopy. The optical slices represent the bottom plains of the dome-shaped tissues shown in Figure 3-5. For each sample, co-staining was performed for STELLA, AP-2 γ and BLIMP1, and separately for NANOG and OCT3/4. Scale bars: 200 μm .

3.4 考察

本研究では、メッシュ構造基板を用いて細胞接着場を調節することでマウス ES 細胞に層状組織形成を誘導し、培養を継続した際に生じる組織形状の変化を調べた。また、この一連の組織形成過程における遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。ドーム状の立体組織の形成においては、ドームを形成する薄い層状組織の外側表面においてアクチンフィラメントの発達が観察された (Figure 3-2C) ことから、ドームの内側表面における基底膜の存在が示唆された。実際に、DNA マイクロアレイによる解析結果から、細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) に関わる遺伝子の発現変化を抽出すると、*fibronectin 1*, *collagen type I $\alpha 2$* , *collagen type IV $\alpha 2$* , *laminin $\alpha 1$* , *laminin $\beta 1$* の発現が上昇していた (Figure 3-7)。このことから、メッシュ構造基板上で培養したナイーブ状態のマウス ES 細胞が、網目を覆う過程で分泌した細胞外基質により、ドーム状の立体組織を形成する薄い層状組織において基底膜が形成されている可能性が示唆されるが、さらなる検証が必要である。

本研究で行った遺伝子発現変化の網羅的解析と免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察により、メッシュ構造基板上で LIF 条件にて培養したナイーブ状態のマウス ES 細胞が、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化を示すことが明らかになった。先行研究で報告されているように、始原生殖細胞マーカー遺伝子である *Prdm1*, *Tfap2c*, *Dppa3*, *Dazl* はマウス ES 細胞においても発現しうる [3-19, 3-22, 3-25]。したがって、これらの遺伝子の発現が、メッシュ構造基板上で培養したマウス ES 細胞において上昇することが確認されたことから、メッシュ構造基板による細胞接着場の調節により始原生殖細胞様の遺伝子発現変化が駆動されたことを示している。一方、先行研究により、多能性幹細胞の自己複製能に関わる遺伝子である LIN28 は、多能性を維持したマウス ES 細胞において let-7 miRNA の成熟を阻害しているため、let-7 miRNA の発現は始原生殖細胞への分化過程の後期においてのみ上昇することが示されている [3-26, 3-27]。本研究の結果では、*Lin28a* の発現はメッシュ構造基板を用いた培養により上昇しているにも関わらず、始原生殖細胞の分化に重要とされる *Nanos3* [3-28] の発現上昇は確認できなかった。したがって、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化は確認できたが、始原生殖細胞への分化過程のどの段階にあたるのかは不明確な結果となった。

マウスの始原生殖細胞は、着床後のエピブラストが、胚体外外胚葉から BMP4 (bone morphogenetic protein 4) により、また、臓側内胚葉から BMP2 (bone morphogenetic protein 2) により刺激されることで生じることが明らかになっている [3-20]。この分化条件を *in*

in vitro で再構成することで、多能性幹細胞から始原生殖細胞様細胞へと分化誘導する方法が既に確立されている[3-10]. マウス ES 細胞の場合、まず、2i+LIF 条件で培養して多能性状態を基底状態に遷移させた後に、ActivinA および bFGF (basic fibroblast growth factor) によりエピブラスト様細胞へと分化誘導し、さらに BMP4 で刺激することで始原生殖細胞様細胞を得る[3-10]. この過程では、初期胚発生過程において内部細胞塊がエピブラストへと分化した後に、エピブラストから始原生殖細胞へと分化する現象を模倣したものである. そのため、多能性幹細胞からエピブラスト様細胞を経て始原生殖細胞様細胞へと分化させる過程においては、一時的に、*Dnmt3b* や *T* などのエピブラストと中胚葉のマーカー遺伝子の発現が上昇し、*Nanog* や *Sox2* などの多能性マーカー遺伝子の発現が低下することが報告されている[3-10]. しかし、本研究における DNA マイクロアレイによる解析結果からは、6 日間の培養期間において、エピブラストや中胚葉のマーカー遺伝子は発現上昇を示さず、多能性マーカー遺伝子は高い水準で発現を保っていた (Figure 3-4A).

さらに、先行研究で示された始原生殖細胞に関わる遺伝子の発現プロファイル[3-10]と、本研究で得られた遺伝子発現変化の結果を比較したところ、本研究で確認された遺伝子発現変化は、先行研究で示されたマウス ES 細胞がエピブラスト様細胞へ分化する際の遺伝子発現変化よりも、エピブラスト様細胞が始原生殖細胞様細胞へ分化する際の遺伝子発現変化に類似していることが示された (Table 3-5). 特に、始原生殖細胞に関わる遺伝子である *Prdm1*, *Tfap2c*, *Prdm14*, *Dppa3*, *Kit*, *Dazl*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Myc* は、先行研究と本研究で似た発現変化を示していた. また、始原生殖細胞様細胞の表面マーカーである *integrin β3* は、メッシュ構造基板上で培養したマウス ES 細胞においても発現が上昇していた (Figure 3-7). 以上のことから、本研究で確認した始原生殖細胞様の遺伝子発現変化は、先行研究[3-10]で示された分化過程とは異なるメカニズムによるものだと考えられる. つまり、メッシュ構造基板を用いた細胞接着場の調節により引き起こされた始原生殖細胞様の遺伝子発現変化は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からエピブラスト様細胞を経由せずに生じる、多能性状態の変化により生じたものであると考えられる.

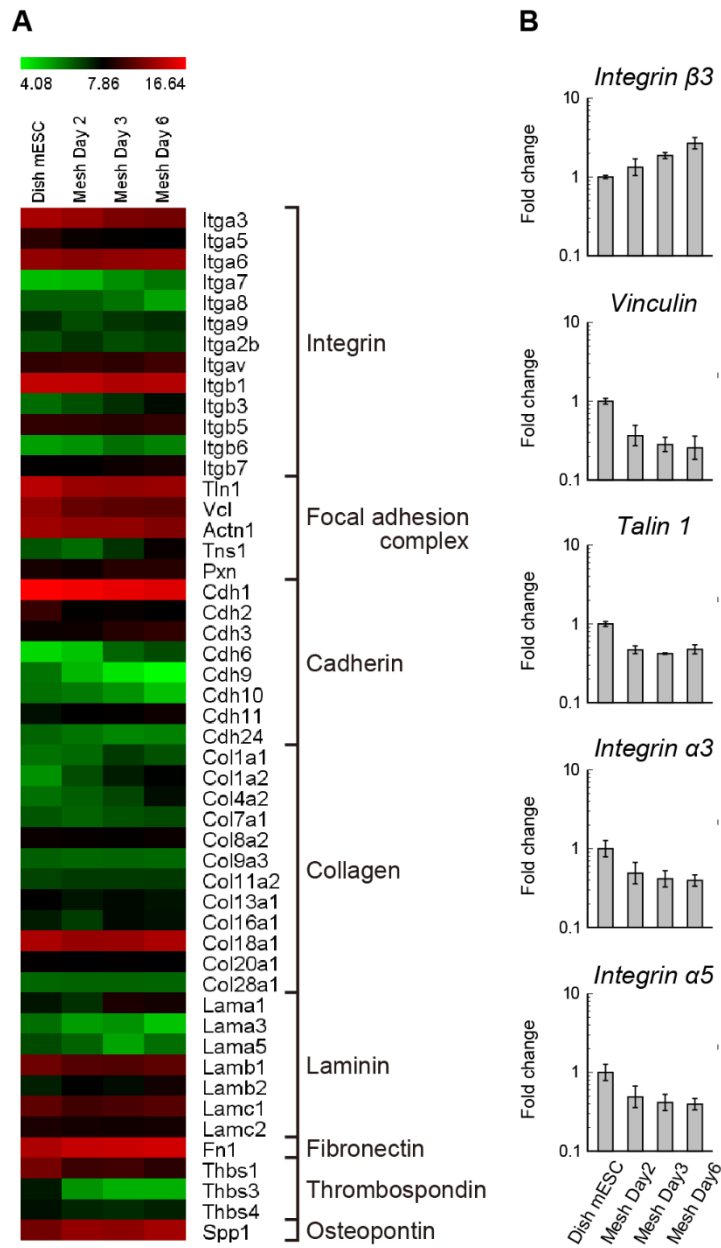


Figure 3-7 | Differential expression analysis of microarray data for genes related to cell adhesion and ECMs from mesh-cultured cells at Day 2 ($n = 3$), Day 3 ($n = 3$), Day 6 ($n = 4$), and from dish-cultured mESCs ($n = 3$) as control. (A) Heatmap display of the related genes which showed more than 6 of expression values. (B) Fold changes of a surface marker of PGC-like cells (*integrin $\beta 3$*) and differentially changed genes (*vinculin*, *talin 1*, *integrin $\alpha 3$* and *$\alpha 5$*) in log10 scale, with SDs.

Table 3-5 | Comparison of expression changes of PGC-related genes between this study and a previous study [3-10]. Right-pointing arrow indicates less than 2-fold increase or decrease, single up-pointing and down-pointing arrows represent between 2-fold and 4-fold increase and decrease, respectively, and double up-pointing and down-pointing arrows indicate more than 4-fold increase and decrease, respectively. The red colored arrows represent data which are consistent with the previous research. Asterisks: data presented in Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession number; GSE30056). Bars: no data in the previous study. EpiLC (d2): epiblast-like cells after 2-days culture. PGCLC (d6): PGC-like cells after 6-days culture. BVSC: *Blimp1-mVenus* and *Stella-ECFP* in the previous study.

	This study			K. Hayashi, et al., Cell 146, 519 (2011)			
	Dish mESC	Mesh Day 2	Mesh Day 6	ESC	EpiLC (d2)	PGCLC (d6) BV/BVSC(+)	BV(-)
<i>Pou5f1</i>	→	→	→	→		→	↓
<i>Nanog</i>	↑	→	→	↓↓		↑	→
<i>Sox2</i>	↑	→	→	↓		↑↑	↑
<i>Prdm1</i>	↑	→	→	↓↓		↑↑	↑↑
<i>Tfap2c</i>	↑↑	→	↑	↓↓*		↑↑	↑↑
<i>Prdm14</i>	↑	→	→	↓↓		↑↑	↑↑
<i>Dppa3</i>	↑↑	→	→	→*		↑↑	→
<i>Kit</i>	↑↑	→	↑↑	↓↓*		↑↑*	-
<i>Nanos3</i>	→	→	→	→*		↑↑	↑
<i>Tdrd5</i>	→	→	→	↑↑*		↑	↓↓
<i>Dnd1</i>	→	→	→	→*		↑↑	→
<i>Rhox9</i>	→	→	↑↑	→*		↑↑*	-
<i>Suz12</i>	→	→	↑	→*		→*	-
<i>Ddx4</i>	→	→	→	↑↑*		↑	↓
<i>Dazl</i>	↑	→	↑↑	→*		↑↑	↑
<i>Piwil2</i>	→	→	→	→*		→*	-
<i>Uhrf1</i>	→	→	→	→*		↓↓	→
<i>Dnmt3a</i>	↓	→	→	↑↑*		↓↓	↓↓
<i>Dnmt3b</i>	↓↓	→	↓	↑↑		↓↓	↓↓
<i>Myc</i>	↓↓	→	↓	↑↑*		↓↓	→
<i>Hoxa1</i>	→	→	→	→*		↓↓	↑
<i>Hoxb1</i>	→	→	→	↑*		↓↓	→
<i>Snai1</i>	→	→	→	→*		→	↑↑
<i>Prdm14</i>	↑	→	→	↓↓*		↑↑	↑↑
<i>Dnmt1</i>	→	→	→	→*		↑	↑
<i>Tcl1</i>	↑	→	→	↓↓		↑↑*	-
<i>Esrrb</i>	↑	→	→	↓↓		↑↑*	-
<i>Klf2</i>	→	→	→	↓↓		↑↑*	-
<i>Fgf5</i>	→	→	↓	↑↑		↓↓*	-

次に、本研究で見られた始原生殖細胞様の遺伝子発現変化を引き起こすメカニズムを考察する。先行研究により、OP9 フィーダー細胞を用いた中胚葉分化条件下において培養したマウス ES 細胞に対して、ERK (extracellular signal-regulated kinase) シグナル伝達経路を阻害すると、始原生殖細胞様細胞への分化を誘導できることが報告されている [3-21]。ERK シグナル伝達経路は、さまざまな細胞種において非常に広範な機能を有しており、細胞外からの刺激に応答することや、焦点接着班複合体により活性化されることが知られている [3-29]。これらの事実を考慮すれば、メッシュ構造基板による細胞-基板間接着が可能な領域の制限が、培養皿上での多能性維持培養と比較して、マウス ES 細胞に対して焦点接着班の形成を阻害し、ERK シグナル伝達経路に影響を与え、始原生殖細胞様分化を駆動するきっかけとなっていることが十分に考えられる (Figure 3-8)。本研究の結果からも、メッシュ構造基板上的細胞においては、*vinculin*, *talin 1*, *integrin $\alpha 3$* , *integrin $\alpha 5$* といった焦点接着班複合体に関わる遺伝子の発現低下が認められる (Figure 3-7)。また、*Hoxa1*, *Hoxb1*, *Snai1* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現が低

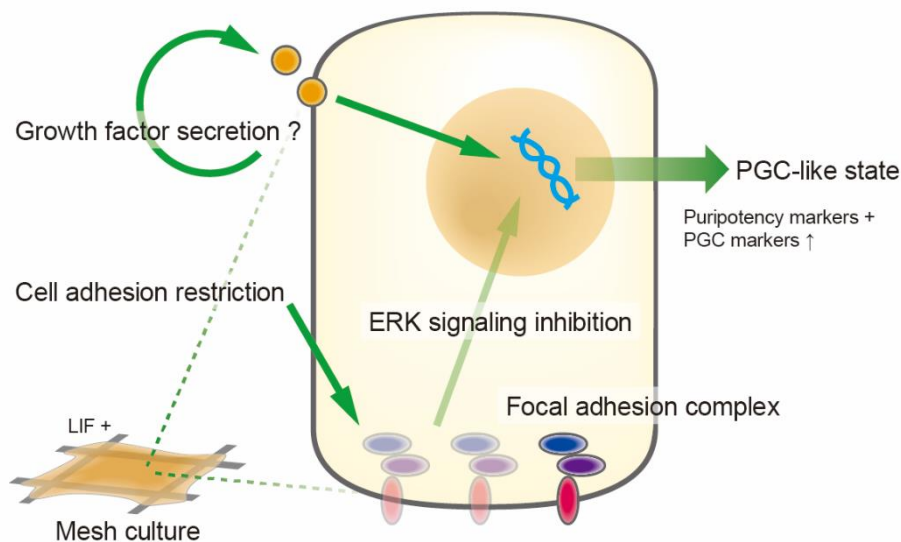


Figure 3-8 | A plausible mechanism for PGC-like differentiation under the mesh culture. We hypothesize that the mesh culture microenvironment may act as a primary trigger of ERK signaling inhibition via restriction of the formation of focal adhesion complexes and growth factor secretion which acts to eventually initiate PGC-like differentiation.

下していた (Figure 3-3) 一方で, *Vegfa* の発現は上昇していた. ERK シグナル伝達経路を阻害して始原生殖細胞様分化を誘導する先行研究[3-21]における OP9 フィーダー細胞の寄与は不明であるが, VEGF (vascular endothelial growth factor) のような生化学的因子を分泌している可能性が, *Vegfa* の発現上昇から考えられる. 以上のことから, メッシュ構造基板による細胞接着場の調節が, ERK シグナル伝達経路などのメカノトランスダクションに関わるシグナル伝達経路を介して, ナイーブ状態のマウス ES 細胞に対して始原生殖細胞様の遺伝子発現変化を引き起こしたことが考えられる.

3.5 結言

本章では, 細胞接着場の調節により誘導される層状組織形成過程において, マウス ES 細胞に生じる多能性状態の変化を明らかにするため, メッシュ構造基板上における層状組織形成に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析を行い, 多能性状態変化を示すタンパク質の発現を調べた. まず, ナイーブ状態のマウス ES 細胞をメッシュ構造基板上で3日間培養して層状組織を形成させ, その後さらに3日間培養を継続した. その結果, 層状組織の一部が突出してドーム状の立体組織が形成されることが観察された. また, この一連の組織形成過程において, DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的解析を行った結果, 始原生殖細胞様の遺伝子発現変化が生じることが確認された. さらに, 免疫蛍光染色法により, この結果に対応した多能性状態変化を示すタンパク質の発現が確認された. したがって, 多能性維持培養液を用いた条件にも関わらず, 細胞接着が可能な領域を制限したメッシュ構造基板上でマウス ES 細胞を培養すると, 組織形成に伴い, 多能性状態の変化が自発的に進行することが明らかとなった. この結果は, 多能性幹細胞に対して細胞接着場を調節することにより, 自発的な組織形成と分化を誘導できる可能性を示唆したものである.

参考文献

- 3-1. M. Eiraku, N. Takata, H. Ishibashi, M. Kawada, E. Sakakura, S. Okuda, K. Sekiguchi, T. Adachi, Y. Sasai, Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture, *Nature*, 472, 51-56 (2011).
- 3-2. S. C. van den Brink, P. Baillie-Johnson, T. Balayo, A. K. Hadjantonakis, S. Nowotschin, D. A. Turner, A. M. Arias, Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells, *Development*, 141, 4231 (2014).
- 3-3. S. E. Harrison, B. Sozen, N. Christodoulou, C. Kyprianou, M. Zernicka-Goetz, Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro, *Science*, 356, eaal1810 (2017).
- 3-4. Y. C. Poh, J. Chen, Y. Hong, H. Yi, S. Zhang, J. Chen, D. C. Wu, L. Wang, Q. Jia, R. Singh, W. Yao, Y. Tan, A. Tajik, T. S. Tanaka, N. Wang, Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell, *Nat. Commun.*, 5, 4000 (2014).
- 3-5. Y. Shao, K. Taniguchi, K. Gurdziel, R. F. Townshend, X. Xue, K. M. A. Yong, J. Sang, J. R. Spence, D. L. Gumucio, J. Fu, Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche, *Nat. Mater.*, 16, 419-425 (2017).
- 3-6. A. Warmflash, B. Sorre, F. Etoc, E. D. Siggia, A. H. Brivanlou, A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells, *Nat. Methods*, 11, 847-854 (2014).
- 3-7. K. O. Okeyo, O. Kurosawa, S. Yamazaki, H. Oana, H. Kotera, H. Nakauchi, M. Washizu, Cell adhesion minimization by a novel mesh culture method mechanically directs trophoblast differentiation and self-assembly organization of human pluripotent stem cells, *Tissue Eng. Part C Methods*, 21, 1105-1115 (2015).
- 3-8. K. O. Okeyo, M. Tanabe, O. Kurosawa, H. Oana, M. Washizu, Self-organization of human iPS cells into trophoblast mimicking cysts induced by adhesion restriction using microstructured mesh scaffolds, *Dev., Growth & Differ.*, 1, 1-13 (2018).
- 3-9. A. McLaren, Primordial germ cells in the mouse, *Dev. Biol.*, 262, 1 (2003).
- 3-10. K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki, M. Saitou, Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells, *Cell*, 146, 519-532 (2011).
- 3-11. M. Saitou, H. Miyauchi, Gametogenesis from pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 18, 721 (2016).
- 3-12. N. Nishioka, K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R. O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E. M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa, H. Sasaki, The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophoblast from inner cell mass, *Dev. Cell*, 16, 398 (2009).
- 3-13. R. Hiramatsu, T. Matsuoka, C. Kimura-Yoshida, S. Han, K. Mochida, T. Adachi, S.

- Takayama, I. Matsuo, External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos, *Dev. Cell*, 27, 131-144 (2013).
- 3-14. M. Hooper, K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter, M. Monk, HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells, *Nature*, 326, 292-295 (1987).
- 3-15. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods*, 9, 676-682 (2012).
- 3-16. G. Dennis, R. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, R. A. Lempicki, DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, *Genome Biology* 4, R60 (2003).
- 3-17. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic Acids Res.*, 37, 1 (2008).
- 3-18. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protocols* 4, 44 (2008).
- 3-19. J. A. Hackett, T. Kobayashi, S. Dietmann, M. A. Surani, Activation of lineage regulators and transposable elements across a pluripotent spectrum, *Stem Cell Rep.*, 8, 1645 (2017).
- 3-20. E. Magnúsdóttir, M. A. Surani, How to make a primordial germ cell, *Development*, 141, 245 (2014).
- 3-21. T. Kimura, Y. Kaga, H. Ohta, M. Odamoto, Y. Sekita, K. Li, N. Yamano, K. Fujikawa, A. Isotani, N. Sasaki, M. Toyoda, K. Hayashi, M. Okabe, T. Shinohara, M. Saitou, T. Nakano, Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition, *Stem Cells*, 32, 2668-2678 (2014).
- 3-22. K. Hayashi, S. M. Chuva de Sousa Lopes, F. Tang, M. A. Surani, Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states, *Cell Stem Cell*, 3, 391 (2008).
- 3-23. T. Boroviak, R. Loos, P. Bertone, A. Smith, J. Nichols, The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification *Nat. Cell Biol.*, 16, 513 (2014).
- 3-24. K. Murakami, U. Günesdogan, J. J. Zyllicz, W. W. C. Tang, R. Sengupta, T. Kobayashi, S. Kim, R. Butler, S. Dietmann, M. A. Surani, NANOG alone induces germ cells in primed epiblast in vitro by activation of enhancers, *Nature*, 529, 403 (2016).
- 3-25. N. Grabole, J. Tischler, J. A. Hackett, S. Kim, F. Tang, H. G. Leitch, E. Magnúsdóttir, M. A. Surani, Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signaling and DNA methylation, *EMBO Rep.*, 14, 629 (2013).
- 3-26. J. A. West, S. R. Viswanathan, A. Yabuuchi, K. Cunniff, A. Takeuchi, I. H. Park, J. E. Sero, H. Zhu, A. Perez-Atayde, A. L. Frazier, M. A. Surani, G. Q. Daley, A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy, *Nature*, 460, 909 (2009).
- 3-27. K. Hayashi, S. M. Chuva de Sousa Lopes, M. Kaneda, F. Tang, P. Hajkova, K. Lao, D. O'Carroll, P. P. Das, A. Tarakhovsky, E. A. Miska, M. A. Surani, MicroRNA biogenesis is

required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis, PLoS one, 3, e1738 (2008).

- 3-28. H. Suzuki, M. Tsuda, M. Kiso, Y. Saga, Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways, Dev. Biol., 318, 133 (2008).
- 3-29. M. M. McKay, D. K. Morrison, Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK, Oncogene, 26, 3113 (2007).

第4章

組織形状制御による多能性状態の領域特異性の理解

4.1 緒言

多細胞組織の形成は、増殖、変形、再配置などの細胞活動が、細胞接着場に応じて空間的に協調することで進行しており、形成された組織は、特徴的な組織形状を呈する[4-1, 4-2]. また、多能性幹細胞を用いた *in vitro* 培養系では、組織形成に伴い、遺伝子発現プロファイルの異なる多様な分化細胞が空間的な配置を伴って出現することが知られている[4-3, 4-4]. 多能性幹細胞の組織形成過程におけるこのような分化細胞の分布の出現は、培養液の組成に応じた生化学的因子と、組織内力学状態が、領域特異的に遺伝子発現を変化させることで誘導されている[4-5, 4-6]. また、多能性幹細胞の集団に対して細胞接着場を調節した培養系を用いることで、多能性状態の変化や細胞運命の決定に際して、組織内力学状態が重要であることが先行研究により示されている[4-7, 4-8]. 第3章においては、微細加工メッシュ構造基板を用いた細胞接着場の調節により、ナイーブ状態のマウス ES 細胞による層状組織形成に伴い始原生殖細胞様の遺伝子発現変化が生じることを明らかにした. しかし、第3章で行った遺伝子発現変化の網羅的解析では、層状組織形成過程における多能性状態の変化が、組織内力学状態に応じてどのようにして生じたのかは明らかにすることができなかった. また、第3章で行った免疫蛍光染色法を用いた観察により、多能性状態変化に領域特異性が生じることが示唆されたが、その詳細は示すことはできなかった. そこで、本章では、メッシュ構造基板による組織形成誘導手法をさらに発展させ、層状組織の形状を制御することで、組織内力学状態に着目して領域特異的な多能性状態の変化を明らかにする.

多能性幹細胞が、組織内力学状態に応じて多能性状態を変化させることは、いくつかの先行研究によって報告されている. 例えば、多能性幹細胞のコロニーにおいては、組織表面に張力が生じており、細胞運命決定に関わることが報告されている[4-9]. また、コロニー周縁部における多能性幹細胞の力学的性質が、分化に関与していることも示されている[4-10]. さらに、工学的アプローチにより細胞接着場を調節し、多能性幹細胞の自己組織化過程における細胞挙動を制御することで、遺伝子発現の変化を調べた先行

研究が報告されている[4-11,4-12]. これらの先行研究により, 組織内力学状態が多能性状態を変化させることは明らかだが, 多能性幹細胞の組織形成過程においては, 組織内力学状態に関わる組織形状に応じて領域特異的な多能性状態がどのように変化するかについて十分に調べられていない.

本章では, マウス ES 細胞の層状組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が, 組織内力学状態により生じることを示すことを目的とした. そのために, まず, メッシュ構造基板上でマウス ES 細胞が形成した層状組織を観察することにより, 厚さの異なる山と谷が繰り返される領域をもつ特徴的な組織形状を呈することがわかり, 領域特異的な多能性状態が観察されることを確認した. これらの領域は不規則に分布していたため, 新しく「島状メッシュ構造基板」を設計し, これを用いて水平方向への組織成長を拘束することで組織形状を制御し, 層状組織が互いに孤立して形成されるようにした. このことにより, 張り出したエッジ領域を有した島状の層状組織の形成を誘導することに成功した. この島状の層状組織のエッジ領域の細胞と組織内部の細胞を比較して, エッジ領域特異的な多能性状態の変化が, 組織形状に由来するエッジ領域特異的な組織内力学状態によるものであることを示す.

4.2 実験方法

4.2.1 マウス ES 細胞の多能性維持培養

本研究では, マウス ES 細胞株 E14tg2a (理研セルバンク) [4-13], および, OLV2-1 (理研セルバンク) [4-14]を用いた. OLV2-1 は, OCT3/4-linker-Venus ベクターがノックインされ OCT3/4 発現細胞を Venus 陽性細胞として確認できる細胞株である.

いずれの細胞株も, G-MEM (富士フィルム和光純薬) に, 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (富士フィルム和光純薬), 1% MEM non-essential amino acids (富士フィルム和光純薬), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (富士フィルム和光純薬), 1,000 units/mL leukemia inhibitory factor (LIF; 富士フィルム和光純薬) を加えた培養液を用いて多能性維持培養を行った. 細胞は, 0.1% gelatin from porcine skin (gel strength 300, type A; Sigma-Aldrich) でコーティングした培養皿を用いて, 37 °C, 5% CO₂ 環境で

培養した。継代時は、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を剥離させ、2日間の培養には 7.0×10^3 cells/cm² に、3日間の培養には 2.6×10^3 cells/cm² になるように細胞密度を調整して、新たな培養皿に播種した。

4.2.2 微細加工メッシュ構造基板の作製と細胞培養

微細加工メッシュ構造基板は、第 2.2.2 項で示した方法を用いて作製した。本研究では、対角線長 100 μ m または 200 μ m の正方形の網目が幅 5 μ m の細線により形作られているメッシュ構造基板を設計して用いた。また、新たに、対角線長 50 μ m の正方形 36 個の網目からなる対角線長 300 μ m の正方形の島状の網目が、互いに 600 μ m の距離をもって配置された形状をしている、島状メッシュ構造基板を設計して用いた。

細胞播種を行う前に、メッシュ構造基板を培養皿に設置し、10 μ g/mL laminin-511 E8 fragment (iMatrix-511 silk; ニッピ) / phosphate buffered saline (PBS) 溶液により 37°C で 1 時間コーティングした。次に、細胞密度が $1.0\text{-}5.0 \times 10^6$ cells/mL になるように調製した細胞懸濁液 100 μ L をメッシュ構造基板上に静かに滴下し、細胞を播種した。播種した細胞がメッシュ線に接着するように、37°C、5% CO₂ 環境下で 6 時間の培養を行った。その後、メッシュ構造基板に接着できずに落下した細胞を除去するため、細胞が接着したメッシュ構造基板を新しい培養皿へと移設し、新しい培養液を加えた。阻害剤を用いた培養を行う場合、この時点で培養液に 10 μ M blebbistatin (Sigma-Aldrich)、または、10 μ M Y-27632 (富士フィルム和光純薬) を加えた。メッシュ構造基板に細胞を播種した時点を Day 0 と定めた。Day 6 まで培養を継続する場合は、Day 3 で培養液を交換した。

4.2.3 免疫蛍光染色法によるタンパク質発現の観察

細胞染色は、第 2.2.3 項で示した方法を用いて行った。免疫蛍光染色には、Table 4-1 に示した一次抗体と二次抗体を用いた。細胞核の染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:500; D1306; Thermo Fisher Scientific) を、アクチンフィラメントの染色には Alexa Flour 647 phalloidin (1:100; A22287; Thermo Fisher Scientific) を用いた。蛍光画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV3000 (オリンパス) を用いて取得した。また、LifeAct-tdTomato knocked-in E14tg2a 細胞株に対するライブイメージングには、インキュベーター型多光子走査型レーザー顕微鏡 LCV-MPE (オリンパス) を用い、2 時間間隔で 60 時間のタイムラプス撮影した。画像処理には Fiji [4-15] と Imaris (Bitplane) を用いた。

Table 4-1 | Lists of antibodies used for immunofluorescence microscopy.

Primary antibodies

Gene	Dilution	ID	Vendor
AP-2 γ	1:100	sc-12762	Santa Cruz Biotechnology
NANOG	1:200	ab80892	Abcam
OCT3/4	1:100	sc-5279	Santa Cruz Biotechnology
DAZL	1:200	ab34139	Abcam
phospho-myosin light chain 2 (Thr18/Ser19)	1:100	#3674	Cell Signaling Technology
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	1:200	#4370	Cell Signaling Technology

Secondary antibodies

Name	Dilution	ID	Vendor
F(ab') ₂ -goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody Alexa Flour 546	1:500	A-11018	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 647 antibody	1:500	ab150079	Abcam

4.2.4 マウス ES 細胞の安定トランスフェクション

マウス ES 細胞株 E14tg2a に対して、pCAG プロモーターの下流において tdTomato でタグ付けした LifeAct [4-16]を発現する LifeAct-tdTomato ベクターをノックインし、LifeAct-tdTomato knocked-in E14tg2a 細胞株を新たに樹立した。樹立した LifeAct-tdTomato knocked-in E14tg2a 細胞株が多能性を維持していることを確認するため、免疫蛍光染色法により観察し、多能性マーカーの発現を確認した (Figure 4-1)。また、本研究で用いた LifeAct-tdTomato knocked-in E14tg2a 細胞株の継代数は 40 以下とした。

マウス ES 細胞株 E14tg2a に対する LifeAct-tdTomato ベクターのリポフェクションには、FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) を用いた。LifeAct-tdTomato ベクターは、*E. coli* 株 DH5 α competent cells (東洋紡) に対してアンピシリンによる標準的な形質転換手法を用いることで増やした。プラスミド DNA の抽出には、QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kits (Qiagen) を用いた。抽出したプラスミド DNA を用いて、E14tg2a 細胞株に対してトランスフェクションを実施する際には、細胞密度が 2.8×10^4 cells/cm² となるように播種し 8 時間培養した後、14 μ L FuGENE HD Transfection Reagent を含む 357 μ L の 0.02 μ g/ μ L プラスミド DNA / G-MEM 溶液を添加し、さらに 40 時間培養した。その

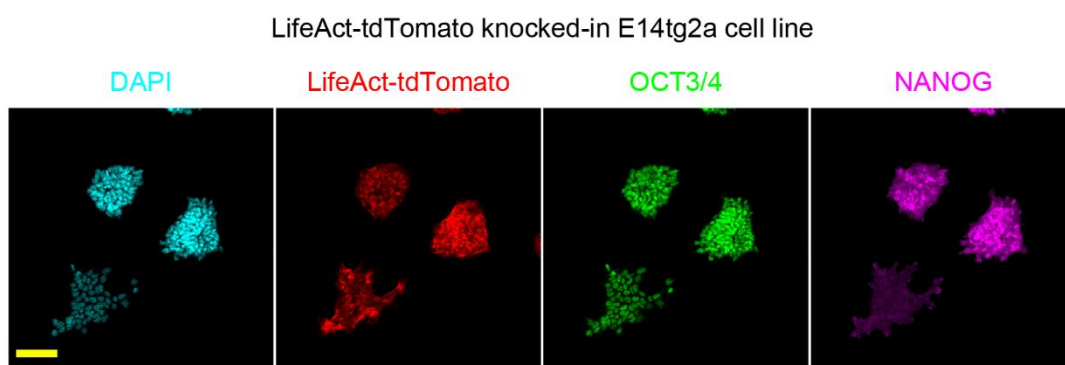


Figure 4-1 | Pluripotency check for the established LifeAct-tdTomato knocked-in E14tg2a cell line cultured on gelatin-coated culture dish under pluripotency maintenance condition at Day 3 (passage number 31). Scale bar: 100 μ m.

後, LifeAct-tdTomato を発現している細胞をソーティングするため, BD FACSMelody cell sorter (BD Biosciences) を用いてセルソーティングを実施した. ソーティングした細胞は, 再び培養皿に播種し十分に増殖させた. 計 4 回に渡り, 増殖のための培養とセルソーティングを実施することにより, 安定して LifeAct-tdTomato を発現する細胞株を樹立した.

4.2.5 レーザーアブレーションによる組織内力学状態の評価

メッシュ構造基板上で形成された層状組織における組織内力学状態を評価するために, 多光子走査型レーザー顕微鏡 FLUOVIEW FV1200MPE (オリンパス) を用いてレーザーアブレーション実験とライブイメージングを行った. レーザーアブレーションの実施前には, 10 分間のタイムラプス撮影を行うことで, 組織の状態を確認した. 次に, レーザーアブレーションにより刺激する座標を定め, 波長 900 nm のチタン・サファイアレーザーを最大出力で 5-10 秒間照射した. その後, 組織の変形を観察するため, 20 分間のタイムラプス撮影を行った.

4.2.6 画像解析による細胞核形状とタンパク質発現の定量評価

細胞核形状の定量評価を行うために, 共焦点レーザー走査型顕微鏡による DAPI の三次元再構築画像から, 細胞核にあたる領域を抽出する際には, VoTracer2 (<http://www2.riken.jp/briect/Ijiri/VoTracer/index.html>) の Segmentation Contour Mesh (B-HRBF) 機能を用いた. 細胞核領域を抽出した後は, Fiji の 3D Roi Manager プラグイン [4-17]を用いて, 各細胞核における輝度を測定した. OCT3/4-Venus および AP-2 γ の平均輝度は, DAPI の平均輝度を用いて正規化し, 各細胞核に対して正規化された比率を算出した. また, 細胞核の形状を解析するために, 上記の 3D Roi Manager プラグインを用いて, 細胞核領域のそれぞれに対して楕円体フィッティングを行った. フィッティングした各楕円体の 3 つの軸をそれぞれ 1 軸, 2 軸, 3 軸とし, それぞれの長さを L_1 , L_2 , L_3 ($L_1 \geq L_2 \geq L_3$) として定めた. さらに, 各楕円体に対して, 伸長比を L_1/L_2 , 扁平率

を L_2/L_3 として算出し、細胞核の伸展度合いを評価した。

タンパク質発現の定量評価を行うために、共焦点レーザー走査型顕微鏡による三次元再構築画像から、メッシュ構造基板の基板面に沿ってスライスした画像を基にして、島状の層状組織における周縁部から中央部にかけての、OCT3/4, AP-2 γ , アクチンフィラメント, リン酸化ミオシン軽鎖 (phospho-myosin light chain; pMLC), pERK (phospho-extracellular signal-regulated kinase) の輝度の分布を解析した。まず、層状組織の輪郭を取得するために、アクチンフィラメントまたは pERK の蛍光画像に対して Fiji [4-15] を用いて自動で閾値を定めて二値化処理を施し、さらに、二値化画像に対して領域の拡大と縮小を 3 ピクセル幅で 2 回繰り返して、輪郭を平滑化した。次に、得られた輪郭を、周縁側から中央側へ向かって 16 ピクセル幅で縮小させることにより順番に分割し、4 つの同心円状の関心領域として定めた。各関心領域について、各チャンネルの平均輝度値を計算し、DAPI の平均輝度値を基に正規化した。最後に、各関心領域における正規化された値を、最も中央側の関心領域の値を 1 とした比率としてさらに正規化し、周縁側から中央側にかけての輝度の分布を定量的に評価した。

4.2.7 RT-qPCR による遺伝子発現解析

メッシュ構造基板上で培養した細胞のうち、OCT3/4 の発現が低い low OCT3/4-Venus 細胞群に対して RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction) 解析を行うために、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を剥離させ、BD FACSMelody cell sorter (BD Biosciences) を用いたセルソーティングを行い、low OCT3/4-Venus 細胞株をソーティングした。次に、前方散乱光 (forward scatter; FSC) シグナルと側方散乱光 (side scatter; SSC) シグナルの値から、細胞と思われる集団に対して手動でゲーティングを行った。Venus low ゲートは、島状メッシュ構造基板上で培養した非蛍光のマウス ES 細胞を用いて手動で設定した。セルソーティングの結果の可視化には、FlowJo single cell analysis software (BD Biosciences) を用いた。

細胞の total RNA は、ISOGEN II (ニッポンジーン), p-bromoanisole を用いて RNA を含む水層を回収した後、NucleoSpin RNA (タカラバイオ) を用いて精製して抽出した。RT-qPCR 解析に用いたサンプルは、dish-cultured mESCs ($n = 6$), low OCT3/4-Venus expressing OLV2-1 cells on the island meshes ($n = 6$) とし、それぞれ 3 回ずつの技術的反

復実験を行った。抽出した total RNA に対する逆転写反応には、Transcriptor Universal cDNA Master (Sigma-Aldrich) を用いた。RT-qPCR には、StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) と PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた。RT-qPCR 解析に用いたプライマーセットの配列は、Table 4-2 に示した通りである。mRNA 発現量の比較定量のためには、*Gapdh* を内在性コントロール遺伝子として、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。なお、 ΔCt 値に対しては、四分位範囲 (interquartile range; IQR) を 3 倍にした値を用いて、統計的に外れ値を決定し除外した。

Table 4-2 | List of primer sequences (5' -> 3') used for RT-qPCR analysis. The two references are represented as [4-18] and [4-19] in this chapter.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Reference
<i>Pou5f1</i>	GATGCTGTGAGCCAAGGCAAG	GGCTCCTGATCAACAGCATCAC	Hayashi et al.,2011
<i>Nanog</i>	CTTTCACCTATTAAGGTGCTTGC	TGGCATCGGTTTCATCATGGTAC	Hayashi et al.,2011
<i>Tfap2c</i>	GGGCTTTTCTCTCTTGGCTGGT	TCCACACGTCACCCACACAA	Hayashi et al.,2011
<i>Prdm1</i>	AGCATGACCTGACATTGACACC	CTCAACACTCTCATGTAAGAGGC	Hayashi et al.,2011
<i>Myc</i>	AAGGAGAACGGTTCCTTCTGAC	GCTGAAGCTTACAGTCCCAAAG	Hayashi et al.,2011
<i>Map2k1</i>	CAAGGTCTCCCACAAGCCAT	GTAGAAGGCCCGTAGAAGC	Designed
<i>Mapk3</i>	GTCTCTGCCCTCGAAAACCA	TGATGCGCTTGTTTGGGTTG	Designed
<i>Dusp6</i>	CAGCGACTGGAATGAGAACAC	GGAACTTACTGAAGCCACCT	Yang et al.,2012
<i>Gapdh</i>	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	Designed

4.3 実験結果

4.3.1 層状組織における組織形状に応じた多能性状態

細胞集団による組織形成は、細胞接着場の影響の下で、細胞集団による増殖、変形、再配置、分化などの活動により生じている[4-20, 4-21, 4-22, 4-23]。そこで、メッシュ構造基板による細胞接着場の調節によりマウス ES 細胞に対して層状組織形成を誘導し、形成された層状組織における組織形状を観察することで、多能性状態にどのような領域特異的な変化が生じているか調べた (Figure 4-2A)。マウス ES 細胞は、ナイーブ状態で多能性を維持したものを用い、対角線長 200 μm の正方形形状のメッシュ構造基板に播種し、LIF 条件にて培養した。

メッシュ構造基板上で増殖したマウス ES 細胞は、細胞-細胞間接着を介して Day 3 までに層状組織を形成した。形成された層状組織には、厚さの異なる山と谷が繰り返される領域をもつ特徴的な組織形状を呈することがわかった。これらの組織形状の特徴から、Figure 4-2B に示すように、「エッジ領域」(edge)、「谷領域」(trough)、「山領域」(crest) として、層状組織における特徴的な領域を区別した。ここで、エッジ領域は、メッシュ構造基板上で層状組織により覆われていない網目に隣接している、層状組織の周縁部の領域である (Figure 4-2C)。山領域は、層状組織が分厚い領域であり、谷領域は、山領域の間に存在する薄い領域である (Figure 4-2C)。この谷領域は、分厚い山領域を取り囲むように分布していることが観察できた。また、このような特徴的な組織形状は、網目サイズの異なるメッシュ構造基板上においても観察された。Figure 4-2C に示す 200 μm のメッシュ構造基板と比較して、網目サイズが小さい 100 μm のメッシュ構造基板においては、エッジ領域がより少ない様子が観察された (Figure 4-3)。このことは、網目サイズに応じて層状組織によるメッシュ構造基板の被覆率が変化し、エッジ領域が形成可能な領域が減少するためであると考えられる。一方、谷領域については、網目サイズが異なる場合においても、変わらず形成されていた。したがって、谷領域は、層状組織が水平方向に成長する過程で、山領域を囲むエッジ領域が網目を覆う際に、隣り合う層状組織のエッジ領域同士が出会い融合した際に生じているものであると考えられた。

次に、これらの特徴的な組織形状がマウス ES 細胞の多能性状態に及ぼす影響を調べるため、それぞれの領域において、多能性マーカーである OCT3/4 の発現とアクチンフィラメントの発達を観察した。興味深いことに、共焦点レーザー走査型顕微鏡により

撮影した層状組織の三次元再構築画像から、山領域の組織内部の細胞においては、OCT3/4 の発現が比較的高いことがわかった (Figure 4-2D). また、山領域の組織内部の細胞は、丸い細胞核形状をしておりアクチンフィラメントがそれほど発達していないことがわかった (Figure 4-2D). 一方、山領域の組織表面の細胞においては、OCT3/4 の発現が低く、細胞核が扁平になっており、アクチンフィラメントが発達していることがわかった (Figure 4-2D). また、谷領域の細胞においては、OCT3/4 の発現が低く、アクチンフィラメントが非常に発達していた (Figure 4-2E). 同様に、エッジ領域の細胞においては、OCT3/4 が発現していない細胞が見受けられ、アクチンフィラメントが非常に発達していた (Figure 4-2E). これらの特徴は、100 μm のメッシュ構造基板においても同様に観察された (Figure 4-3). また、200 μm および 100 μm のメッシュ構造基板の両方において、Day 6 まで培養を継続した場合にも同様の領域特異性が観察された (Figure 4-4). このことから、それぞれの領域における領域特異的な性質は網目のサイズに依存しないことが示された.

したがって、メッシュ構造基板上で形成される層状組織において、特徴的な組織形状に応じた領域特異的な OCT3/4 の発現低下とアクチンフィラメントの発達が観察されることがわかった. アクチンフィラメントの発達は組織内力学状態に応じて生じることが、先行研究により示されている [4-24]. そのため、層状組織内部の細胞に比べて、山領域の組織表面の細胞、および、谷領域とエッジ領域の細胞においては、組織内力学状態の影響により多能性状態が変化していることが示唆される. 特に、谷領域とエッジ領域においては、山領域の組織内部の細胞が凝集することにより生じる力に対して、領域特異的に張力が生じていることが、アクチンフィラメントの発達などにより示唆された. したがって、このような層状組織における領域特異的な組織内力学状態に応じて、これらの領域の細胞においてアクチンフィラメントが発達し、領域特異的な多能性状態の変化が引き起こされたことが考えられる.

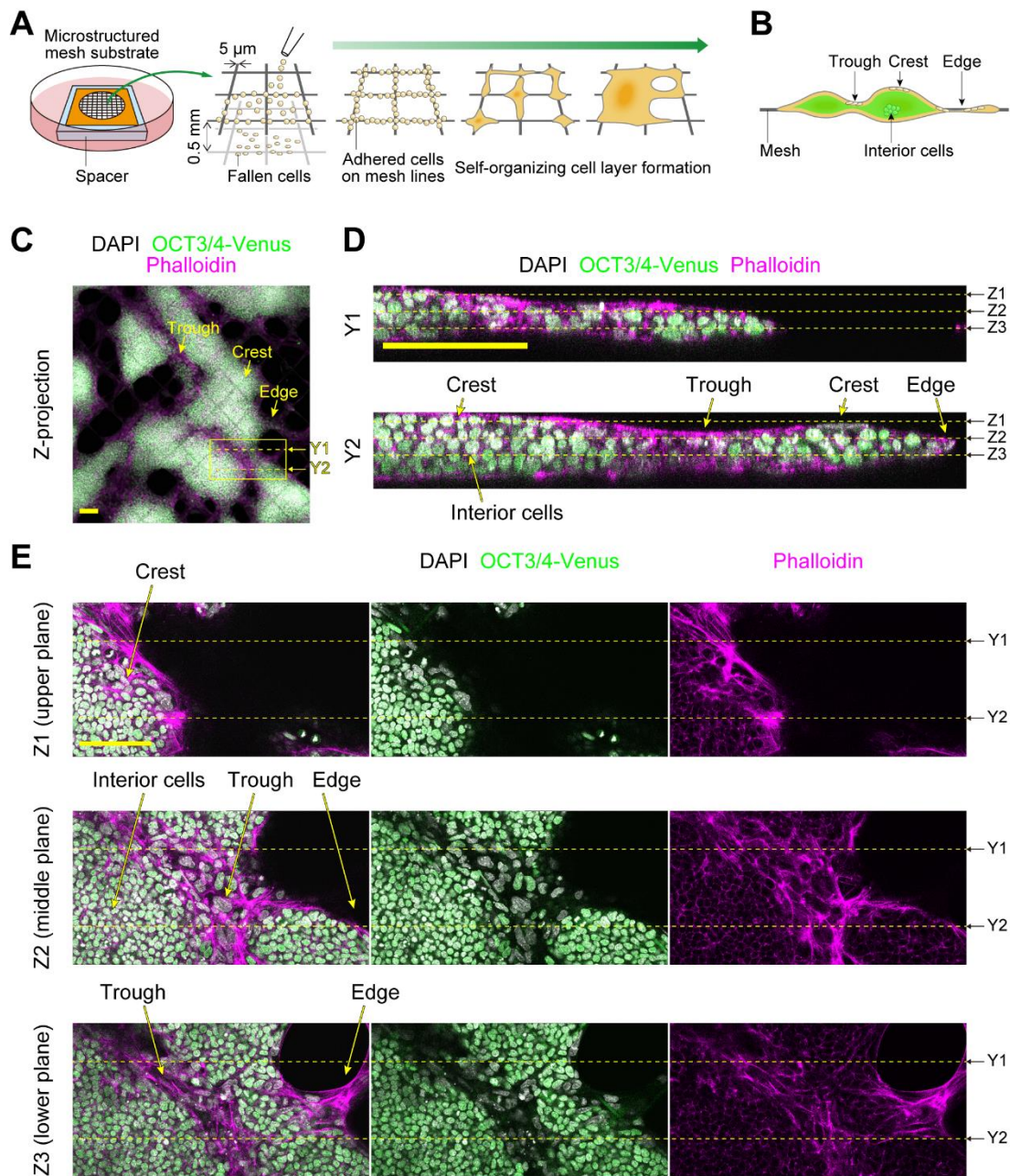


Figure 4-2 | Tissue topography of mESC layers on microstructured mesh substrates. (A) Schematic illustration of mesh substrate setup in a suspended position for cell seeding, and the mesh-filling process leading to cell layer formation. (B) Schematic illustration of tissue topography formed on the mesh substrates. The resulting topographical features are indicated as “edge”, “trough” and “crest”. (C) Wide view of Z-projections of confocal images showing the topography of cell layers on mesh substrates at Day 3. (D) Vertical (Y plane) cross-sections taken at positions (Y1, Y2 in E) of the cell layer region indicated by the yellow broken line in C. (E) Horizontal (Z plane) cross-sections at different heights (Z1, Z2, Z3 in D) of the cell layer region indicated by the yellow box in C. Topographical zones with well-established F-actin bundle was associated with low OCT3/4 expression. Scale bars: 100 μm .

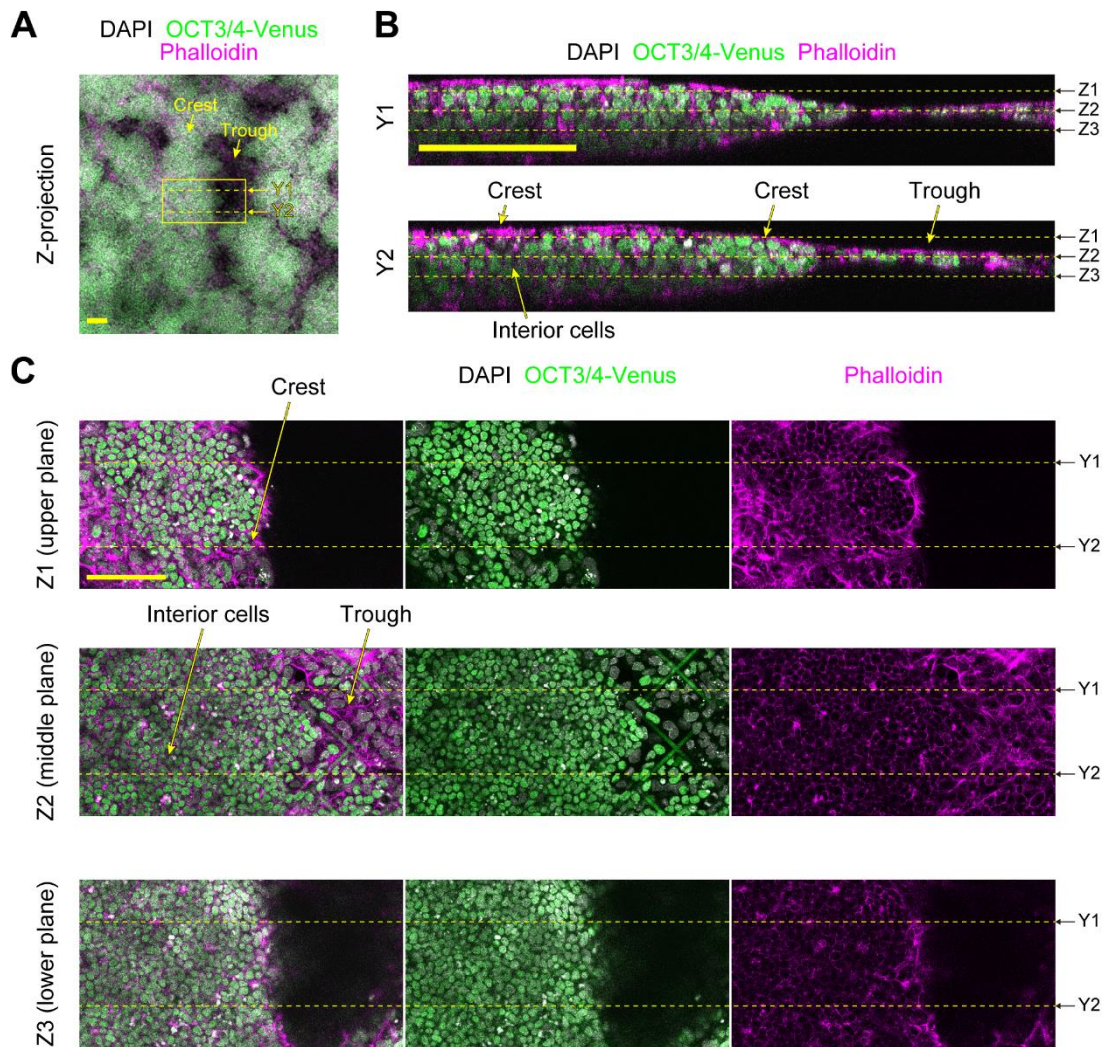


Figure 4-3 | Tissue topography of mESC layers on 100 μm -sized microstructured mesh substrates. (A) Wide view of Z-projections of confocal images showing the topography of cell layers on mesh substrates at Day 3. (B) Vertical (Y plane) cross-sections taken at positions (Y1, Y2 in C) of the cell layer region indicated by the yellow broken line in A. (C) Horizontal (Z plane) cross-sections at different heights (Z1, Z2, Z3 in B) of the cell layer region indicated by the yellow box in A. Topographical zones with well-established F-actin bundle was associated with low OCT3/4 expression. Scale bars: 100 μm .

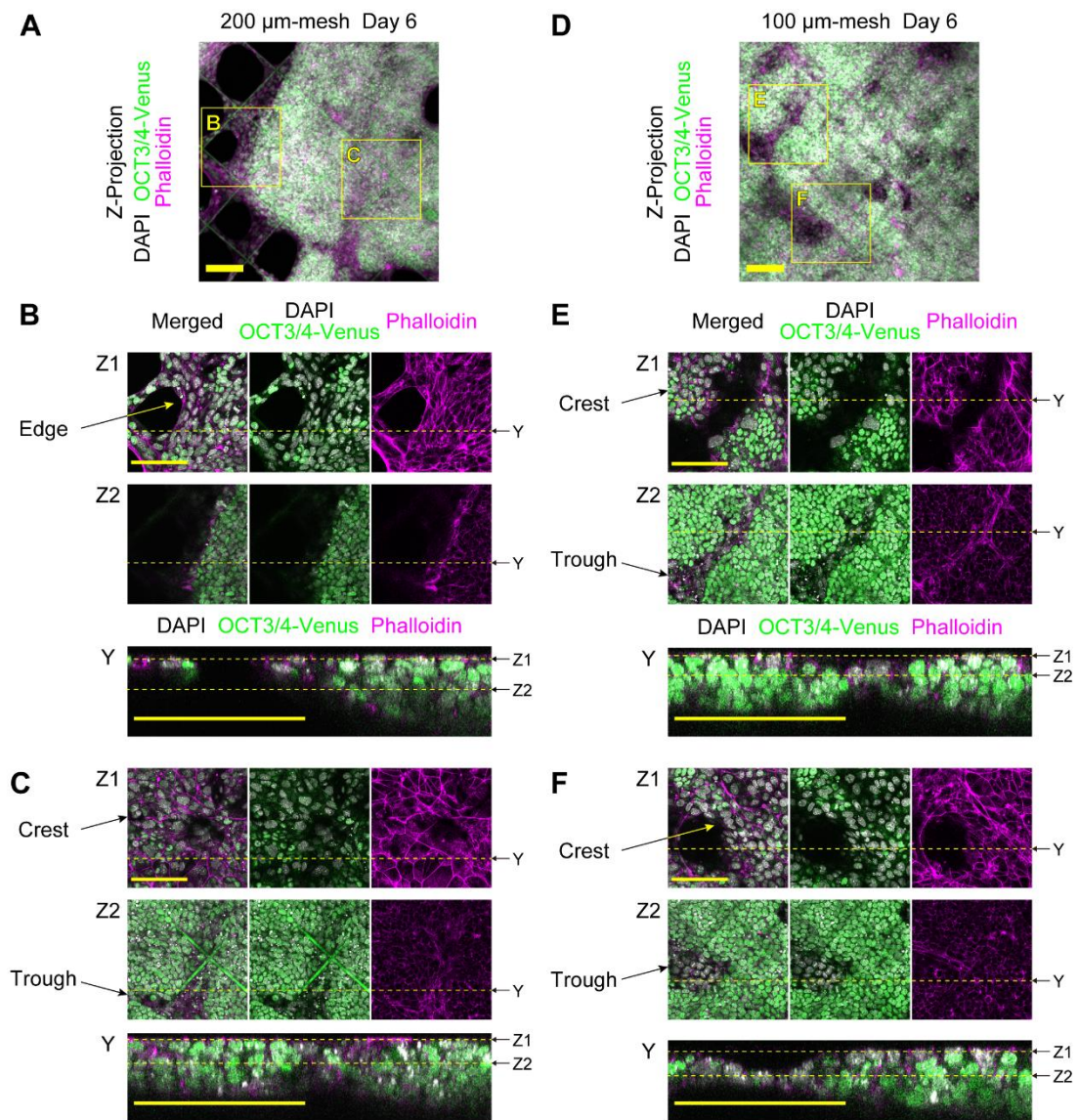


Figure 4-4 | Tissue topography of mESC layers on microstructured mesh substrates at Day 6. (A) Wide view of Z-projections of confocal images showing the topography of cell layers on 200 μm -sized mesh substrates at Day 6. The boxed regions are shown as magnified individual confocal slices in B and C. (B, C) Horizontal (Z plane) and vertical (Y plane) cross-sections of the cell layer indicated by the yellow box in A. (D) Wide view of Z-projections of confocal images showing the topography of cell layers on 100 μm -sized mesh substrates at Day 6. The boxed regions are shown as magnified individual confocal slices in E and F. (E, F) Horizontal (Z plane) and vertical (Y plane) cross-sections of the cell layer indicated by the yellow box in D. Scale bars: 100 μm .

4.3.2 島状メッシュ構造基板が誘導するエッジ領域形成

第 4.3.1 項で観察された、層状組織における領域特異的な組織内力学状態と多能性状態を調べるため、それぞれの層状組織が孤立した状態で、張り出したエッジ領域を有する島状の層状組織を形成するように、島状メッシュ構造基板を新たに設計した (Figure 4-5A)。メッシュ構造基板上で形成される層状組織においては、エッジ領域、谷領域、山領域の分布を制御できないため、領域特異的な組織内力学状態と多能性状態を調べるのが難しかった。そこで、島状メッシュ構造基板を用いることで、水平方向への組織成長を拘束することで、層状組織が互いに孤立して形成されるようにした。これにより、島状の層状組織において、中央の分厚い山領域と、それを取り囲むエッジ領域の形成を誘導し、組織形状を制御した。島状の層状組織同士は、互いに孤立して形成されるため、谷領域は形成されない。以降は、この島状メッシュ構造基板を用いて、エッジ領域特異的な組織内力学状態と多能性状態変化を調べた。

島状メッシュ構造基板は、対角線長 $50\ \mu\text{m}$ の正方形 36 個の網目からなる対角線長 $300\ \mu\text{m}$ の正方形の島状の網目が、互いに $600\ \mu\text{m}$ の距離をもって配置された形状をしている (Figure 4-5A)。この形状の設計には、メッシュ構造基板上におけるマウス ES 細胞の層状組織形成の速度が網目サイズに依存することを利用している。実際に、網目サイズが小さい島部の上では速やかに網目を覆い、島状の層状組織を形成することが確かめられた (Figure 4-5B & 4-5C)。次に、島状メッシュ構造基板上における、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の層状組織形成過程をタイムラプス撮影により観察した (Figure 4-5D)。島状メッシュ構造基板上に播種された細胞は、島部の $50\ \mu\text{m}$ の網目を 1 日間ですべて覆い、島状の層状組織を形成した。Day 3 までには、島状の層状組織は厚みを増し、島部から張り出したエッジ領域が出現した (Figure 4-5D, arrows)。この張り出したエッジ領域は、細胞-基板間接着が可能な領域が存在しない位置でメッシュ線同士を橋渡しするように形成されており、再現性良く形成されることが確認できた。

次に、安定トランスフェクションにより新たに樹立した LifeAct-tdTomato knocked-in E14tg2a 細胞株を用いて、LifeAct-tdTomato の発現を観察することで、島状の層状組織から張り出したエッジ領域におけるアクチンフィラメントの発達を、タイムラプス撮影により確認した (Figure 4-5D)。さらに、張り出したエッジ領域が形成される Day 3 において、先行研究[4-25]に基づいてレーザーアブレーションにより組織の変形を観察し、組織内力学状態を推定することを試みた。ここで、エッジ領域の組織内に、エッジの接線方向の張力が存在すると仮定すれば、レーザーアブレーションにより物理的に破断が

生じると、張力解放による組織の収縮が観察されることに留意した。レーザーアブレーションの前後の組織変形を観察するために、レーザーアブレーション前に 10 分間、レーザーアブレーション後に 20 分間のタイムラプス撮影を行った (Figure 4-5E)。レーザーアブレーションにより刺激する座標は、張り出したエッジ領域においてアクチンフィラメントが発達している部位で、組織の縁のすぐ内側の点を選択した (Figure 4-5D, yellow arrowheads)。レーザーアブレーションによりアクチンフィラメントが破断すると、組織がエッジの接線方向および法線方向に速やかに収縮する様子が観察され、その後、10 分程度で組織が接線方向にさらに収縮することが確認できた (Figure 4-5E, kymograph)。以上のことから、島状の層状組織から張り出したエッジ領域は、接線方向の張力が存在する組織内力学状態にあることが示唆された。

Figure 4-5 | Island mesh substrates designed to induce tissue formation of topography-confined island-like layers with overhanging edges. (A) A schematic of an island mesh substrate showing spatially separated “islands” each consisting of 36 small square meshes with a diagonal length of 50 μm . The separation distance between adjacent islands was 600 μm . (B) A microscopic image showing isolated cell layers formed on an island mesh substrate at Day 3. (C) A schematic illustration of tissue topography formed on an island mesh substrate. (D) Timelapse images showing formation of an island-like cell layer by mESCs expressing LifeAct-tdTomato. Overhanging webbed edges were formed at the periphery of the cell layer by Day 3. (E) Representative timelapse images showing edge retraction following laser ablation. The yellow arrowhead indicates the ablated spot at the outermost edge. A pseudo-colored composite image depicting the position of edge before and after retraction. The image was created by overlaying pseudo-colored images at 10 min pre-ablation and 20 min post ablation. Kymograph representation retraction dynamics following incision of F-actin at the ablated spot. Retraction occurred both in the circumferential and radial directions for a period of 10 min after ablation. Scale bars: 100 μm . [Figure is on next page.]

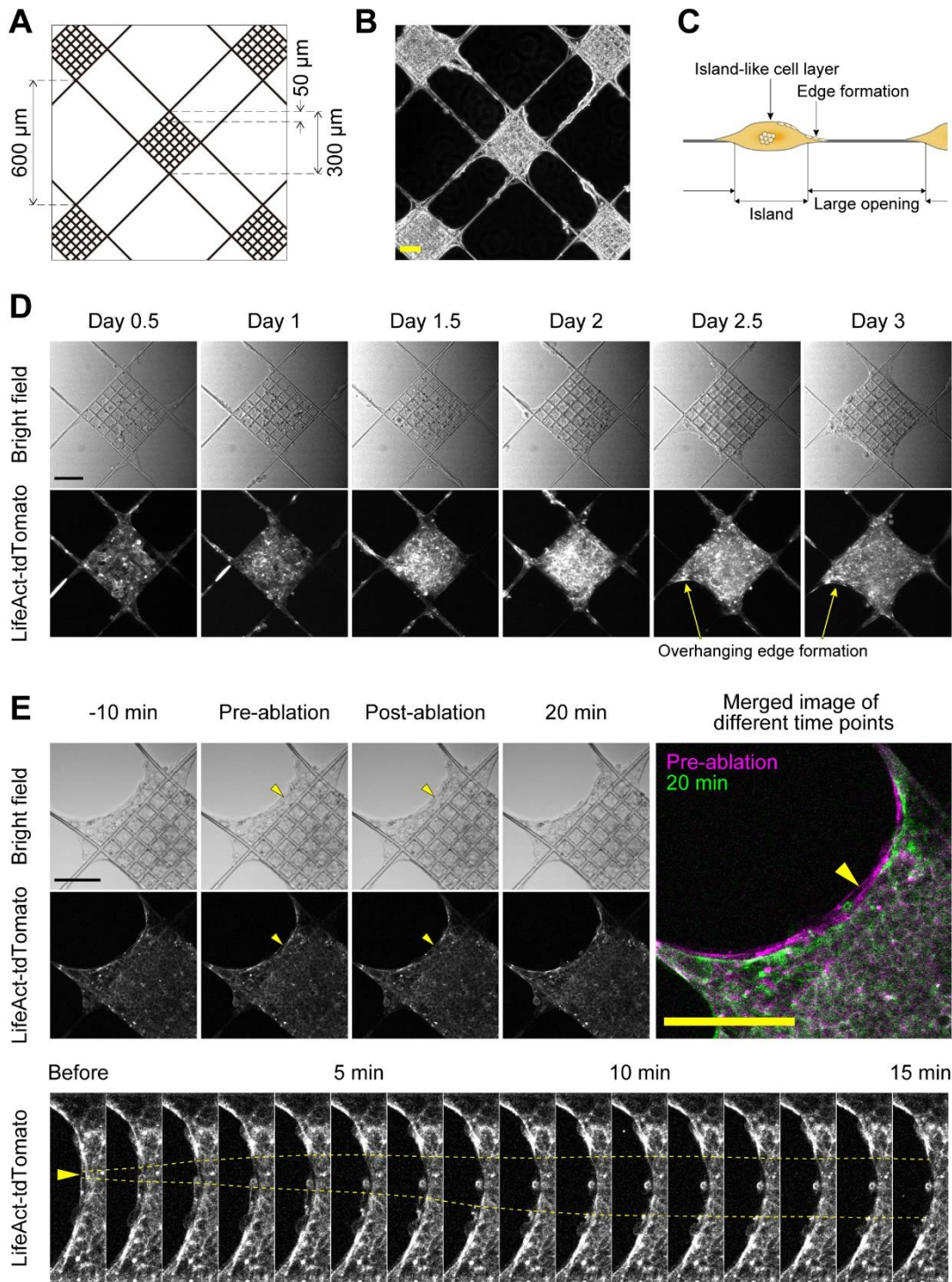


Figure 4-5 [Caption is on previous page.]

4.3.3 エッジ領域特異的な組織内力学状態と多能性状態の関係

マウス ES 細胞が形成する層状組織における領域特異的な組織内力学状態と多能性状態を調べるために、島状メッシュ構造基板上で Day 3 に形成される島状の層状組織における OCT3/4 と AP-2 γ の発現を観察した。AP-2 γ は、始原生殖細胞や栄養外胚葉のマーカ遺伝子として知られており [4-18, 4-26], 第 3 章で示したメッシュ構造基板上での始原生殖細胞様の遺伝子発現変化において発現上昇が確認された遺伝子である。はじめに、確認のため、培養皿上で多能性維持培養したナীব状態のマウス ES 細胞において、AP-2 γ の発現が比較的低いことを観察した (Figure 4-6)。次に、島状の層状組織における OCT3/4 と AP-2 γ の発現を共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。三次元再構築画像から、島状の層状組織には張り出したエッジ領域が存在することが確認できた (Figure 4-7A, upper left)。エッジ領域に位置する細胞では、Figure 4-2 のエッジ領域で観察された細胞と同様に OCT3/4 の発現が低下していた (Figure 4-7A, upper)。また、島状の層状組織のエッジ領域に位置する細胞では、AP-2 γ の発現は比較的高かった (Figure 4-7A, upper)。対照的に、島状の層状組織の組織内部の細胞においては、OCT3/4 の発現が認められ、AP-2 γ の発現が低かった (Figure 4-7A, lower left)。また、組織内部の細胞

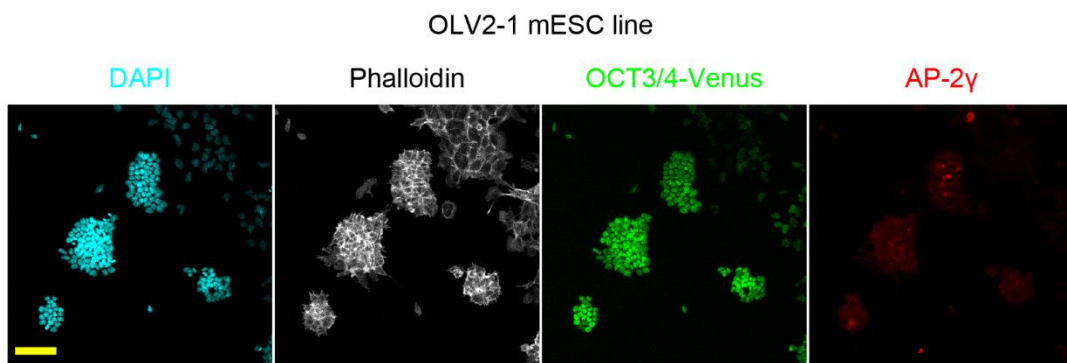


Figure 4-6 | Immunostaining for OCT3/4-Venus and AP-2 γ in OLV2-1 mESC line cultured on gelatin-coated culture dish under pluripotency maintenance condition. AP-2 γ was weakly expressed whereas OCT3/4-Venus was strongly expressed. Scale bars: 100 μ m.

に比べて、エッジ領域に位置する細胞においては、アクチンフィラメントが非常に発達していることが観察された (Figure 4-7A, right). 一方、組織内部の細胞においてもアクチンフィラメントが観察されたが、個々の細胞の細胞膜に沿って存在していたことから、細胞のアクチン皮質が観察されたものと考えられる (Figure 4-7A, right).

層状組織のエッジ領域において AP-2 γ を発現している細胞は、伸展した細胞核を有していることが観察された (Figure 4-7B, upper). 細胞核の形状は細胞が置かれた力学環境に応じて変化すると考えられるため、島状の層状組織の組織内部と組織表面における細胞の細胞核に対して、楕円体フィッティングによる形状解析を行った. その結果、島状の層状組織の組織表面における細胞核は伸展しているものが多いことがわかり、球形状に近い細胞核では OCT3/4 の発現が比較的高いことがわかった (Figure 4-7B, lower). また、伸展した細胞核を持つ細胞では、AP-2 γ の発現が比較的高いことがわかった. 以上の結果から、細胞核の変形と、OCT3/4 と AP-2 γ の発現変化には相関があることが示唆された. さらに、張り出したエッジ領域における組織内力学状態を確認するために、アクチンフィラメントに加えてリン酸化ミオシン軽鎖の免疫蛍光染色を行った. リン酸化ミオシン軽鎖は、アクチンフィラメントと相互作用することで、非筋細胞において収縮力を発生することがよく知られている. 島状の層状組織のエッジ領域においては、アクチンフィラメントの発達と同様に、リン酸化ミオシン軽鎖の発達が観察された (Figure 4-7C) ことから、細胞が収縮力を発生させることが可能な状態にあることが示唆された.

島状の層状組織において観察された OCT3/4, AP-2 γ , アクチンフィラメント, リン酸化ミオシン軽鎖の輝度を用いて、エッジ領域から組織中央部にかけての発現分布を定量的に評価した (Figure 4-7D). そのために、島状の層状組織における周縁部から中央部にかけての、4 つの同心円状の領域における輝度値を測定した (Figure 4-8A). その結果、アクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の輝度は、層状組織の周縁部であるエッジ領域で高かった一方で、組織中央部では低い値を示したことから、エッジ領域における局在が示された (Figure 4-7D). 同様に、AP-2 γ も層状組織の中央部に比べて、エッジ領域を含む周縁部でより高い輝度を示した (Figure 4-7D). 反対に、OCT3/4 は明確な傾向を示さなかった (Figure 4-7D). これは、エッジ領域において OCT3/4 の発現が低下した細胞の数が十分でなく、定量評価の結果に表れなかったことが原因だと考えられる. 以上のことから、エッジ領域特異的な組織内力学状態と多能性状態について、エッジ領域から組織中央部にかけての発現分布が類似した傾向を示すことが示され、相関があることが示唆された.

このことをさらに確かめるために、島状メッシュ構造基板による培養時に非筋ミオシン II 阻害剤である blebbistatin, もしくは、Rho 関連タンパク質キナーゼ阻害剤である Y-

27632 を添加し、活性化ミオシンによる張力を阻害した環境下で培養した島状の層状組織において解析を行った (Figure 4-8B & 4-8C). その結果, blebbistatin を添加した場合は, エッジ領域の張り出しがやや減少したが, 発現分布には明確な差が確認できなかった. また, Y-27632 を添加した場合は, エッジ領域の張り出しに差は認められなかったが, アクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の輝度の組織周縁部への局在がやや減少した. 加えて, 両条件でのエッジ領域における細胞核形状を観察したところ, 阻害剤を添加していない場合と同様に伸展した細胞核が見られた (Figure 4-9). 結果として, 今回添加した阻害剤の濃度では, エッジ領域の形成自体を阻害するには不十分であったことが考えられた.

結果として, 島状の層状組織において, OCT3/4 の発現低下と AP-2 γ の発現上昇が示す多能性状態の変化が生じているエッジ領域において, 領域特異的な組織内力学状態がアクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の発達により示唆された. また, これらの分布には相関があることが示された. 加えて, 同様の観察結果が, 島状メッシュ構造基板上において Day 6 まで継続培養した場合にも観察された (Figure 4-10).

Figure 4-7 | Edge-localized alteration in pluripotency state of mESC layer on an island mesh substrate at Day 3. (A) *Upper left*: A 3D reconstructed image of an island-like mESC layer formed on an island mesh. *Lower left*: Vertical (Y plane) cross-section images along the lines indicated by Y1, Y2, and Y3 in the 3D reconstructed image. *Right*: Horizontal (Z plane) cross-section images along the heights indicated by Z1, Z2, and Z3 in the 3D reconstructed image. The cross-sections show peripheral cells (edge cells) with highly reduced OCT3/4 expression compared with interior cells which exhibit sustained expression. F-actin enrichment and relatively high AP-2 γ expression at the tissue periphery (edges) is also apparent. (B) *Upper left*: Enlarged view of the boxed region in A-Z3 depicting nuclear deformation at the tissue edge. *Upper right*: 3D reconstruction of sliced images taken from the boxed region in A-Z3. *Lower*: Result of quantification of nuclear shape of edge cells by ellipsoid fitting. Cells with highly deformed nuclei (prolate or oblate spherical shapes) at the tissue edge showed relatively higher AP-2 γ expression. In contrast, cells with round-shaped nuclei were mostly in the tissue interior and exhibited relatively higher OCT3/4 expression. (C) Horizontal cross-section images taken at the mesh substrate plane depicting high expression of F-actin and pMLC at the tissue edge. (D) Intensity analysis from the edge toward to the tissue interior for the indicated proteins. Mean intensities of each region of interest were normalized with that of the innermost region. Gray lines indicate the normalized mean values for individual samples quantified, while black diamond marks indicate the mean values of all samples for each region of interest. The number of analyzed samples were $n = 8$ for phalloidin and OCT3/4-Venus, and $n = 4$ for pMLC and AP-2 γ , respectively. Scale bars: 100 μm . [Figure is on next page.]

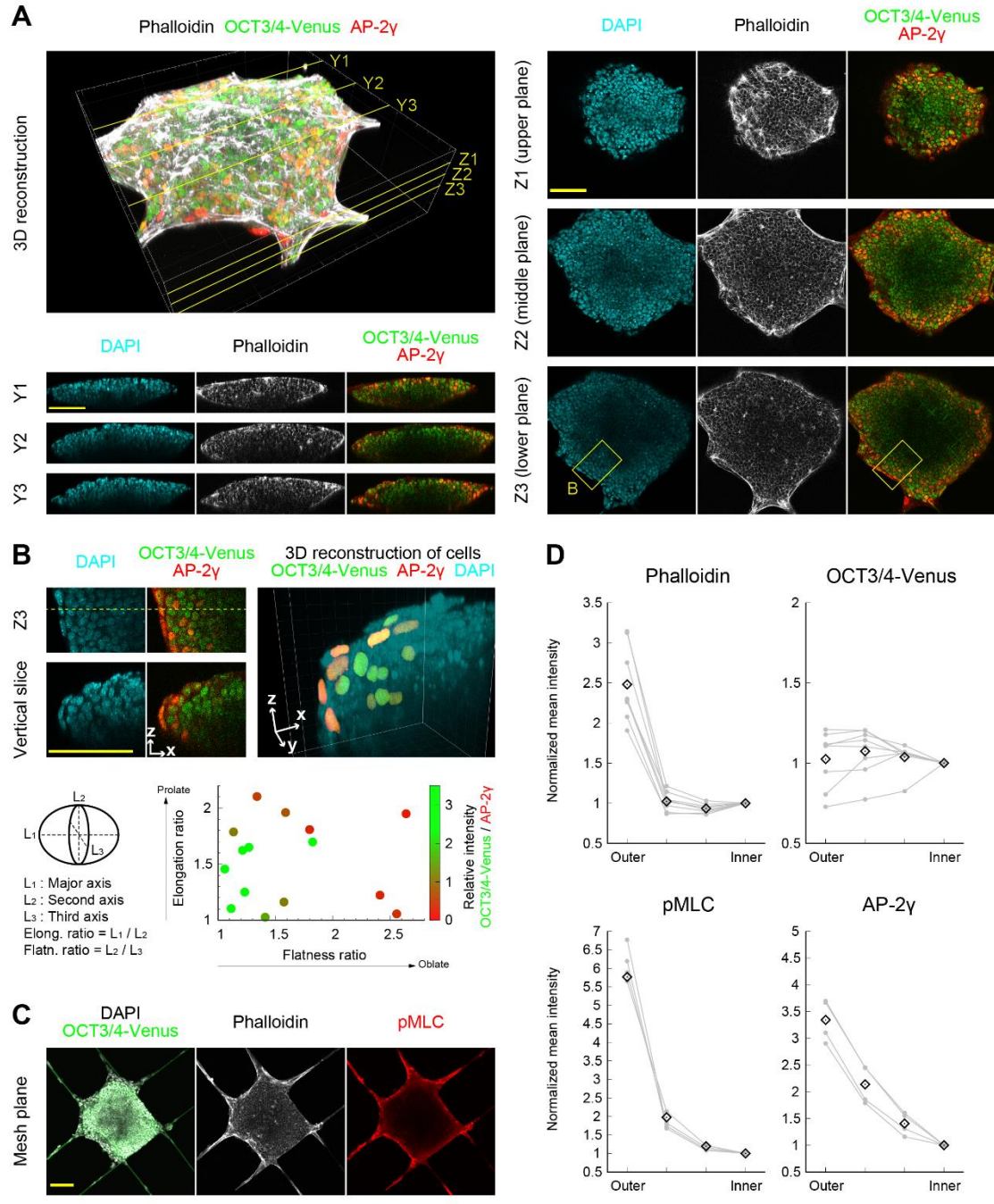


Figure 4-7 [Caption is on previous page.]

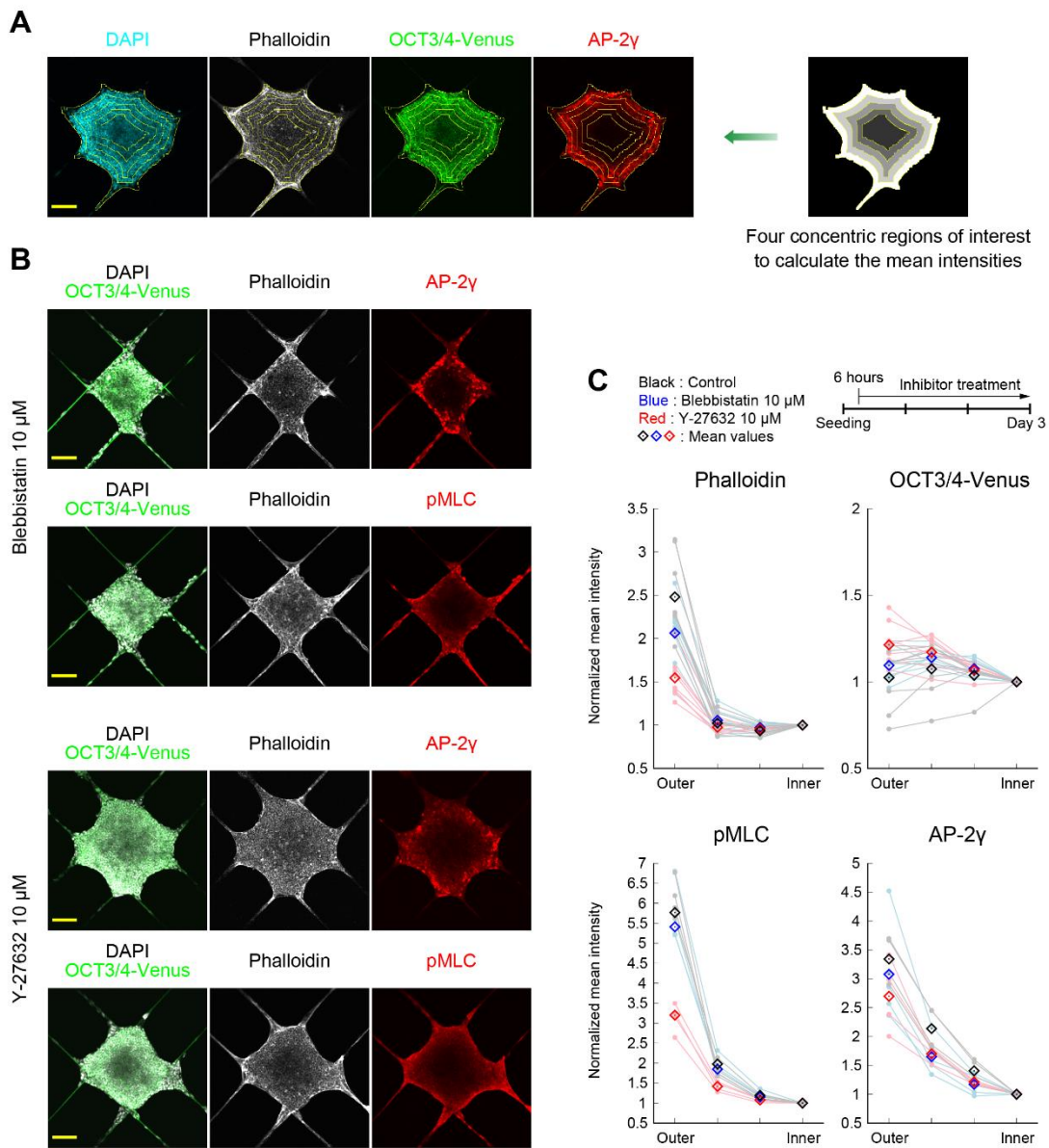


Figure 4-8 | Edge-localized alteration in pluripotency state of mESC layer on island mesh substrates at Day 3. (A) Representative images of regions of interest for which intensity analysis was performed. For the details, see the subsection 4.2.6. (B) Horizontal cross-sections along the mesh substrate plane for blebbistatin and Y-27632 treated samples at Day 3. (C) Intensity analysis from the edge toward to the tissue interior for the indicated proteins. The data for control is the same as the shown in Fig. 3D. Blue and red marks indicate the results under blebbistatin and Y-27632 treatments. For each condition, the numbers of analyzed samples were $n = 8$ for phalloidin and OCT3/4-Venus, and $n = 4$ for pMLC and AP-2 γ , respectively. Scale bars: 100 μ m.

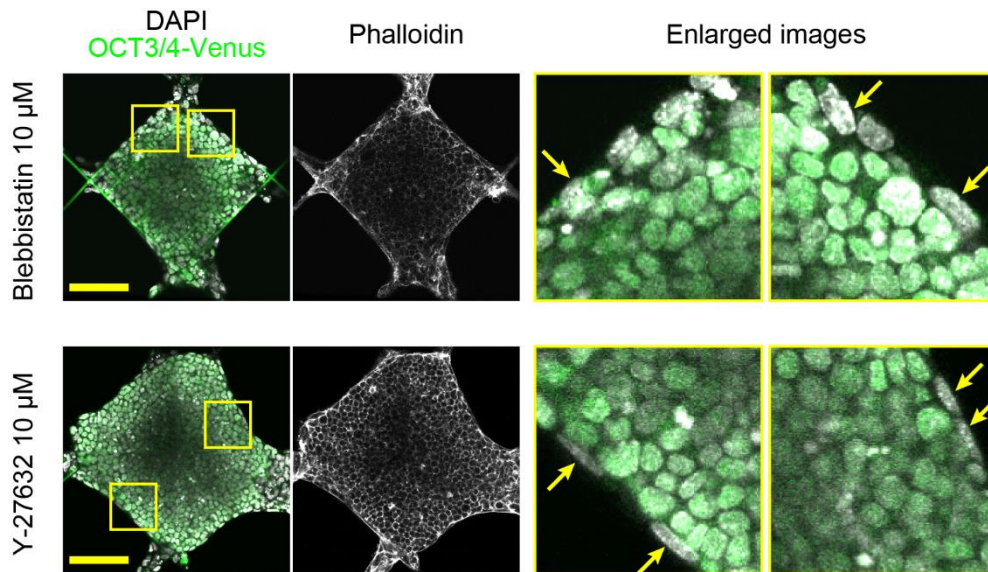


Figure 4-9 | Horizontal cross-sections along the mesh substrate plane for blebbistatin and Y-27632 treated samples at Day 3. Enlarged images of the boxed regions depict nuclear deformation (indicated by the yellow arrows) at the tissue edge. Scale bars: 100 μm .

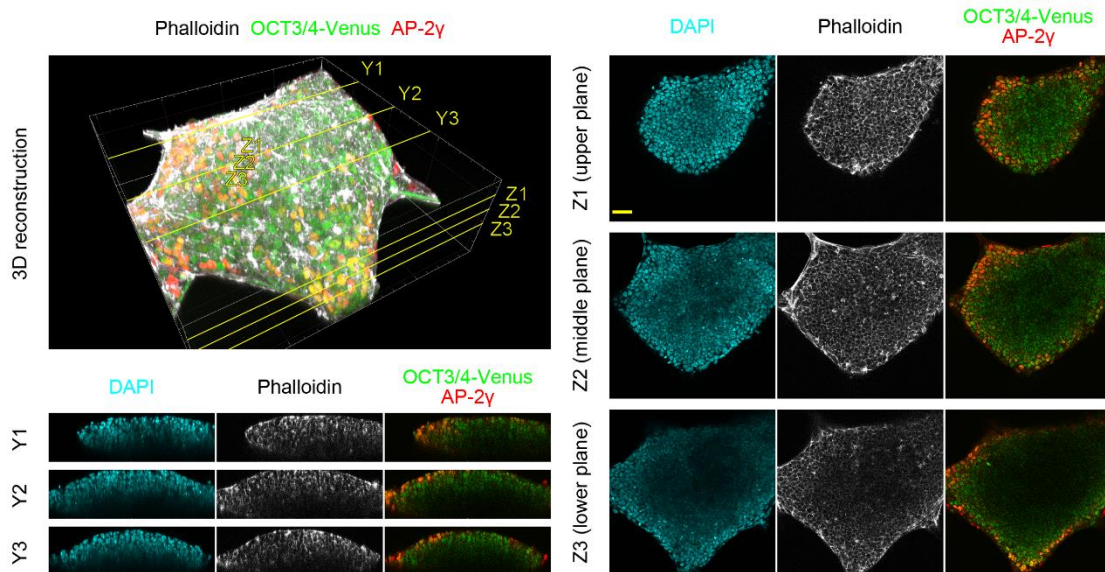


Figure 4-10 | Edge-localized alteration in pluripotency state of mESC layer on an island mesh substrate at Day 6. *Upper left*: A 3D reconstructed image of an island-like mESC layer formed on an island mesh. *Lower left*: Vertical (Y plane) cross-section images along the lines indicated by Y1, Y2, and Y3 in the 3D reconstructed image. *Right*: Horizontal (Z plane) cross-section images along the heights indicated by Z1, Z2, and Z3 in the 3D reconstructed image. The cross-sections show that OCT3/4 expression was still maintained in the interior cells but was highly reduced in peripheral cells at the edge. In contrast, high AP-2 γ expression and F-actin enrichment were observed at the edges. Scale bars: 100 μm .

4.3.4 エッジ領域特異的な多能性消失関連遺伝子の発現

エッジ領域特異的な組織内力学状態が多能性状態を変化させる現象をより詳しく調べるため、さらなる解析を行った。まず、エッジ領域に存在する多能性が消失した細胞をソーティングすることを目指して、Day 3 の島状の層状組織を構成する細胞のうち、OCT3/4 の発現が低い low OCT3/4-Venus 細胞群を、蛍光活性化セルソーターによりソーティングした (Figure 4-11A & 4-12)。次に、セルソーティングにより取得した low OCT3/4-Venus 細胞群に対して、RT-qPCR 解析により mRNA の発現量を調べた (Figure 4-11B)。培養皿において LIF 条件で多能性維持培養したマウス ES 細胞をコントロールとすると、low OCT3/4-Venus 細胞群においては、*Pou5f1* (OCT3/4) の発現は同程度であり、*Nanog* の発現はやや高かった。*Tfap2c* (AP-2 γ) と *Prdm1* (BLIMP1) の発現は、low OCT3/4-Venus 細胞群において上昇していた。特に、*Tfap2c* の発現上昇については、第 4.3.3 項における免疫蛍光染色法による AP-2 γ 発現の観察結果と一致した。

次に、組織内力学状態と多能性状態変化を繋ぐ経路の一つとして知られている ERK (extracellular signal-regulated kinase) シグナル伝達経路に着目し、ERK シグナル伝達経路の活性化に関わる遺伝子である *Myc*, *Map2k1* (MEK1), *Mapk3* (ERK1), *Dusp6* について mRNA 発現の解析を行った (Figure 4-11B)。*Myc* は、マウス ES 細胞において自己複製能と多分化能に関わる遺伝子であることが知られており [4-27]、low OCT3/4-Venus 細胞群においては発現が低下していた。また、*Map2k1* と *Mapk3* の発現は low OCT3/4-Venus 細胞群において上昇していた。これらの結果は、ERK シグナル伝達経路の活性化に伴い *Myc* の発現が抑制されることを示した先行研究 [4-28] と一致している。さらに、pERK1/2 ホスファターゼである *Dusp6* の発現は、low OCT3/4-Venus 細胞群においてやや低下しており、ERK 活性化を示唆していた。

ERK 活性化がエッジ領域特異的なものであることを確かめるため、免疫蛍光染色法を用いて pERK の発現を観察した (Figure 4-11C)。その結果、島状の層状組織のうち、OCT3/4 の発現が低下しているエッジ領域において、pERK の発現が観察された (Figure 4-11C)。Figure 4-7 で示した結果と同様に、AP-2 γ の発現がエッジ領域において確認できた (Figure 4-11C)。これらの観察結果に対して、第 4.2.3 項と同様の定量評価を行ったところ、pERK と AP-2 γ の輝度は組織中央部と比較して、エッジ領域を含む周縁部で高くなっていることが確認できた (Figure 4-11D)。興味深いことに、活性化ミオシンによる張力を抑制するために Y-27632 を添加して培養した島状の層状組織においては、島状の層状組織の周縁部における pERK の輝度が低くなっていることがわかった (Figure

4-13). 以上のことから、島状メッシュ構造基板により形成された島状の層状組織において、エッジ領域特異的に生じる多能性状態の変化は、ERK 活性化により引き起こされたことが示唆された。

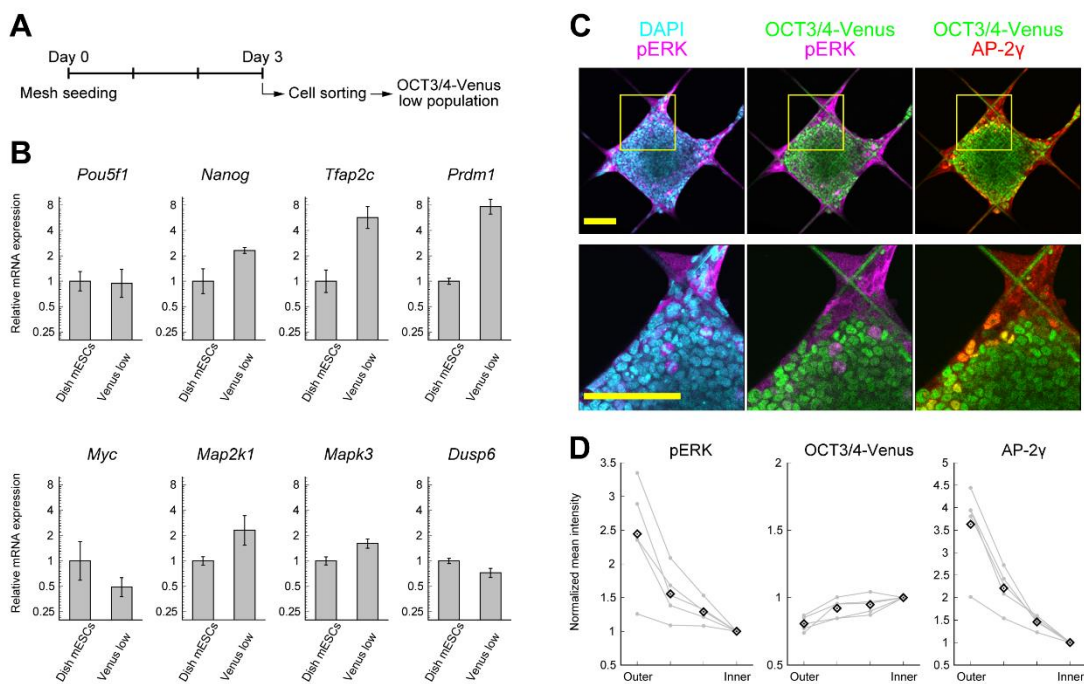


Figure 4-11 | Edge-localized ERK activation associated with pluripotency alteration at the tissue edge. (A) A workflow for RT-qPCR analysis from cell seeding to cell sorting. OCT3/4-Venus low expression cells were obtained by cell sorting at Day 3. (B) RT-qPCR analysis at Day 3 for mRNA expression of pluripotency markers (*Pou5f1* and *Nanog*), germ cell markers (*Tfap2c* and *Prdm1*) and ERK-related genes (*Myc*, *Map2k1*, *Mapk3* and *Dusp6*). Individual mRNA expression was normalized against *Gapdh* and relative values were presented in log₂ scale, with standard deviations. (C) Characterization of pERK expression using immunofluorescence confocal microscopy. *Upper*: Horizontal cross-sections along the mesh substrate plane. *Lower*: High magnification images of the boxed region in the upper images. Pronounced pERK expression was localized at the tissue edge and correlated well with low OCT3/4 expression. Scale bars: 100 μm. (D) Intensity analysis of pERK distribution from the edge toward to the tissue interior in comparison with OCT3/4 and AP-2γ. The number of analyzed samples were $n = 5$. The intensity analysis and notation used are as indicated in Figure 4-7D.

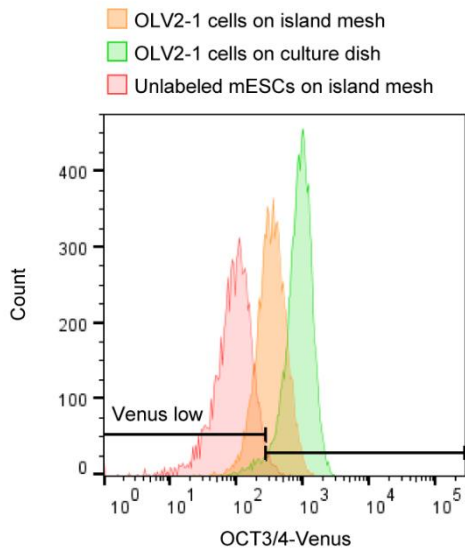


Figure 4-12 | Criteria for sorting OCT3/4-Venus low cell population by manual gating, from the cells cultured on the island mesh substrates. First, Venus high population was determined using mESCs cultured on culture dish under the pluripotency maintenance condition. Then, Venus low population was determined using unlabeled mESCs cultured on the island mesh substrates. The cell population with low OCT3/4-Venus expression was sorted based on the Venus low gate.

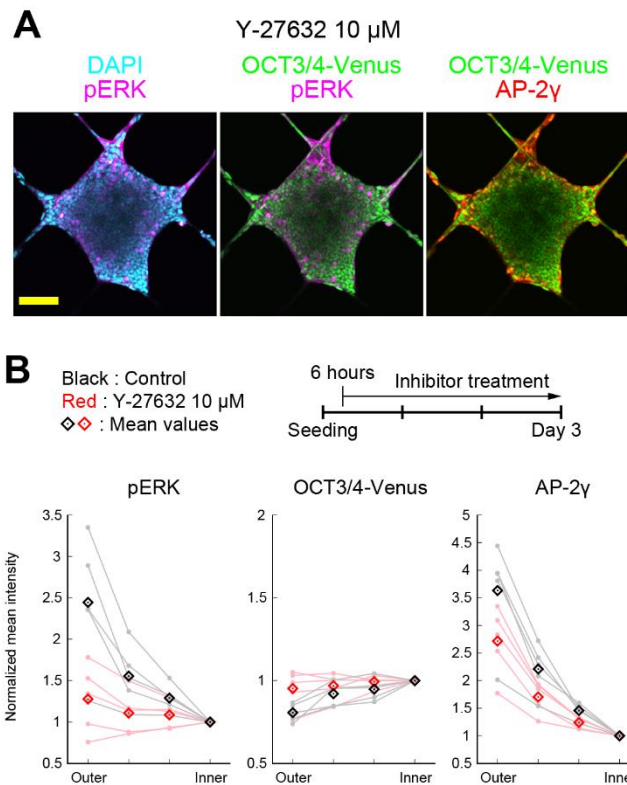


Figure 4-13 | Edge-localized ERK activation associated with pluripotency alteration at the tissue edge. (A) Horizontal cross-sections along the mesh substrate plane for Y-27632 treated samples at Day 3. Scale bar: 100 μ m. (B) Intensity analysis of pERK distribution from the edge toward to the tissue interior in comparison with OCT3/4 and AP-2 γ . The number of analyzed samples were $n = 5$. The intensity analysis and notation used are as indicated in Figure 4-7D. Red marks indicate the results under Y-27632 treatments.

4.4 考察

本研究では、新たに設計した島状メッシュ構造基板を用いて組織形状を制御することにより、基板の島部からエッジ領域が張り出した島状の層状組織の形成を誘導することに成功した。本研究は、この島状の層状組織において、エッジ領域特異的な組織内力学状態と多能性状態を調べたものである。結果として、島状メッシュ構造基板上で形成された島状の層状組織において、エッジ領域に位置する細胞の OCT3/4 の発現低下、および、AP-2 γ の発現上昇が観察され、アクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の発達から示唆されるエッジ領域特異的な組織内力学状態が、この多能性状態の変化に関与することを示唆した。このような領域特異的な多能性状態の変化が、LIF 条件の多能性維持培養液を用いた培養条件で、少なくとも Day 3 において観察されることは興味深い事実である。先行研究により、組織形状に由来する組織内力学状態が多細胞組織の形態形成において重要であることが、物理的な拘束下において確かめられている[4-29,4-30]。また、多細胞組織の組織形状を制御することにより、幹細胞の分化への影響を確かめる実験も行われている[4-31,4-32]。本研究で観察されたアクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖のエッジ領域での発達は、細胞-基板間接着が存在しない領域において認められることから、組織の力学的な安定性に必要な張力により生じていると考えることができる[4-24]。本研究では組織内力学状態を十分に定量化することはできなかったが、レーザーアブレーションの結果 (Figure 4-5) と細胞核の変形の観察結果 (Figure 4-7) から、エッジ領域特異的な張力が存在することを定性的に示唆し、多能性状態の変化に関与することを示唆した。実際に、先行研究により、アクチンフィラメント形成の増加が多能性幹細胞の分化に関わることが報告されている[4-33,4-34]。

ERK シグナル伝達経路は、力学刺激に応じて多能性状態の変化にさまざまな影響を及ぼすものであることが先行研究により報告されている[4-35]。また、ERK シグナル伝達経路は、活性化ミオシンによる細胞張力の発生や、細胞移動におけるアクチンフィラメントの重合による細胞の変形を制御していることが報告されている[4-36,4-37]。したがって、本研究で観察されたエッジ領域特異的な組織内力学状態が、LIF 条件においても、島状の層状組織のエッジ領域における ERK 活性化を引き起こしたと考えることができる。また、AP-2 γ は始原生殖細胞の転写因子ネットワークにおいて重要な遺伝子として知られており[4-18,4-38]、第 3 章で示したメッシュ構造基板における遺伝子発現変化の網羅的解析においても発現上昇が確認されている。さらに、AP-2 γ は、栄養外胚葉への強制的な分化誘導過程において SOX2 と協調的に作用することにより、OCT3/4 と

拮抗的な関係を示すことが報告されている[4-26]. したがって, ERK 活性化を介して, OCT3/4 の発現低下と AP-2 γ の発現上昇がともに生じたと考えることができる. ERK 活性化が多能性の消失に関わることはすでに知られている. マウス ES 細胞においては, MYC/MAX 複合体が ERK シグナル伝達経路を抑制することで, 分化を阻害することが報告されている[4-28, 4-39]. 本研究においては, RT-qPCR 解析の結果により *Myc* の発現低下が認められたこと (Figure 4-11B) から, これらの先行研究を考慮すれば, ERK 活性化が促進され, 多能性の消失を引き起こしたことが示唆される. したがって, 本研究で観察されたエッジ領域特異的な組織内力学状態が, LIF 条件においても, ERK 活性化を介して, 島状の層状組織のエッジ領域における OCT3/4 の発現低下と AP-2 γ の発現上昇を引き起こしたと考えることができる (Figure 4-14).

本研究は, 島状メッシュ構造基板を用いた組織形状の制御により, 多能性幹細胞の組織形成過程において, 組織内力学状態が領域特異的な多能性状態の変化に関与すること

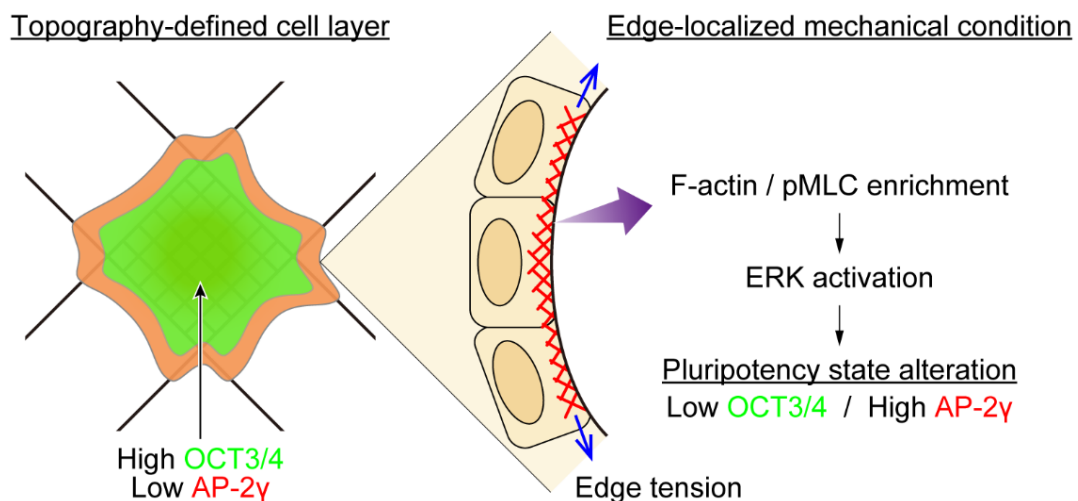


Figure 4-14 | A schematic showing association between tissue topography and pluripotency state transition in cell layer formation on island mesh substrates. Edge formation without substrate support on the suspended island mesh substrates is expected to require enhanced F-actin and pMLC development at the edge, as observed. In turn, the resulting actomyosin contractility (edge tension) might activate ERK-associated signaling pathway, leading to the observed pluripotency state alteration at the tissue edge.

を示唆したものである。しかしながら、blebbistatin と Y-27632 を用いた活性化ミオシンの張力阻害実験においては、アクチンフィラメント、リン酸化ミオシン軽鎖、pERK のいずれの発現もわずかに低下したのみに留まり (Figure 4-8B, 4-8C & 4-13)、阻害剤を添加していない場合と同様に伸展した細胞核が観察された (Figure 4-9)。また、より高い濃度で阻害剤を添加した場合は細胞の生存率が低くなってしまったため、完全に張力を阻害することは難しく、本研究で用いた阻害剤の濃度では部分的な阻害しか達成できなかった。しかし、阻害剤を添加した場合においても、エッジ領域における張力の存在が示唆される結果が得られたことから、エッジ領域の形成において張力が必要であることが考えられた。この一因として、エッジ領域は、島状の層状組織の内部の細胞が凝集する力に晒されるため、エッジ領域の形成過程において組織形状を保つためには、張力が存在する組織内力学状態となる必要があることが考えられる。

本研究では、エッジ領域特異的な組織内力学状態と ERK 活性化を示すことができたが、ERK 活性化に対する組織内力学状態の寄与を、具体的なメカノトランスダクション経路として明らかにできなかったことは課題として残る。マウス ES 細胞における具体的なメカノトランスダクション経路の例として、細胞膜張力の低下が FGF (fibroblast growth factor) のエンドサイトーシスを介して ERK 活性化を誘導し、多能性状態の消失に繋がるのが先行研究により示されている [4-40]。領域特異的な多能性状態の変化のメカニズムを明らかにするためには、今後、このような経路を明らかにすることが必要である。したがって、本研究の結果は、マウス ES 細胞の層状組織の周縁部と中央部で異なる多能性状態が認められ、この多能性状態の変化が組織内力学状態により生じていることを示唆したものであり、多能性幹細胞の組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化の理解を目指したものであると言える。

4.5 結論

本章では、マウス ES 細胞の層状組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が、組織内力学状態により生じることを示すため、層状組織の組織形状を制御することで、領域特異的な組織内力学状態と多能性状態の関係を調べた。まず、メッシュ構造基板上でナイーブ状態のマウス ES 細胞が形成する層状組織においては、厚さの異なる領域が連なる組織形状をなしており、領域によって異なる多能性状態が観察されたこと

に着目した。そこで、層状組織が互いに孤立して形成されるように工夫した島状メッシュ構造基板を新たに設計し、組織形状を制御することで、領域特異的な多能性状態の変化に及ぼす影響を調べた。島状メッシュ構造基板を用いることにより島状の層状組織が形成され、組織のエッジ領域は基板が存在しない領域に張り出した形状をなした。このエッジ領域に対してレーザーアブレーションを行った結果、張力解放による組織の収縮が観察できた。また、エッジ領域においては、張力の発生に関わるアクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の顕著な発現が観察されたことから、エッジ領域は特異的な組織内力学状態にあることが示された。さらに、免疫蛍光染色法による観察および RT-qPCR 解析の結果、エッジ領域の細胞は、多能性マーカーである OCT3/4 の発現が低く、始原生殖細胞マーカーである AP-2 γ を発現していることを明らかにした。この結果を受け、組織内力学状態と多能性状態変化を繋ぐ経路の一つとして知られている ERK シグナル伝達経路に着目したところ、エッジ領域特異的に ERK 活性化が観察されたことから、エッジ領域特異的な組織内力学状態が、ERK 活性化を介してマウス ES 細胞の多能性状態変化を引き起こしている可能性が示唆された。結果として、微細構造培養基板により組織形状を制御する本研究の独創的なアプローチにより、多能性幹細胞の組織形成過程において、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態の変化に関与することを明らかにした。

参考文献

- 4-1. G. B. Blanchard, A. J. Kabla, N. L. Schultz, L. C. Butler, B. Sanson, N. Gorfinkiel, L. Mahadevan, R. J. Adams, Tissue tectonics: morphogenetic strain rates, cell shape change and intercalation, *Nat. Methods*, 6, 458-464 (2009).
- 4-2. E. Latorre, S. Kale, L. Casares, M. Gómez-González, M. Uroz, L. Valon, R. V. Nair, E. Garreta, N. Montserrat, A. Del Campo, B. Ladoux, M. Arroyo, X. Trepast, Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape, *Nature*, 563, 203-208 (2018).
- 4-3. S. E. Harrison, B. Sozen, N. Christodoulou, C. Kyprianou, M. Zernicka-Goetz, Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro, *Science*, 356, eaal1810 (2017).
- 4-4. N. Takata, E. Sakakura, M. Eiraku, T. Kasukawa, Y. Sasai, Self-patterning of rostral-caudal neuroectoderm requires dual role of Fgf signaling for localized Wnt antagonism, *Nat. Commun.*, 8, 1339 (2017).

- 4-5. M. N. Shahbazi, E. D. Siggia, M. Zernicka-Goetz, Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development, *Science*, 364, 948-951 (2019).
- 4-6. T. Takebe, J. M. Wells, Organoids by design, *Science*, 364, 956-959 (2019).
- 4-7. A. Warmflash, B. Sorre, F. Etoc, E. D. Siggia, A. H. Brivanlou, A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells, *Nat. Methods*, 11, 847-854 (2014).
- 4-8. Y. Shao, K. Taniguchi, K. Gurdziel, R. F. Townshend, X. Xue, K. M. A. Yong, J. Sang, J. R. Spence, D. L. Gumucio, J. Fu, Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche, *Nat. Mater.*, 16, 419-425 (2017).
- 4-9. J. Du, Y. Fan, Z. Guo, Y. Wang, X. Zheng, C. Huang, B. Liang, L. Gao, Y. Cao, Y. Chen, X. Zhang, L. Li, L. Xu, C. Wu, D. A. Weitz, X. Feng, Compression generated by a 3D supracellular actomyosin cortex promotes embryonic stem cell colony growth and expression of Nanog and Oct4, *Cell Systems*, 9, 214-220 (2019).
- 4-10. K. Rosowski, A. F. Mertz, S. Norcross, E. R. Dufresne, V. Horsley, Edges of human embryonic stem cell colonies display distinct mechanical properties and differentiation potential, *Sci. Rep.*, 5, 14218 (2015).
- 4-11. A. W. Xie, B. Y. K. Binder, A. S. Khalil, S. K. Schmitt, H. J. Johnson, N. A. Zacharias, W. L. Murphy, Controlled self-assembly of stem cell aggregates instructs pluripotency and lineage bias, *Sci. Rep.*, 7, 14070 (2017).
- 4-12. N. Sagy, S. Slovin, M. Allalouf, M. Pour, G. Savyon, J. Boxman, I. Nachman, Prediction and control of symmetry breaking in embryoid bodies by environment and signal integration, *Development*, 146, dev181917 (2019).
- 4-13. M. Hooper, K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter, M. Monk, HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells, *Nature*, 326, 292-295 (1987).
- 4-14. Y. Toyooka, D. Shimosato, K. Murakami, K. Takahashi, H. Niwa, Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture, *Development*, 135, 909-918 (2008).
- 4-15. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods*, 9, 676-682 (2012).
- 4-16. J. Riedl, A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, R. Wedlich-Soldner, Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin, *Nat. Methods*, 5, 605-607 (2008).
- 4-17. J. Ollion, J. Cochenec, F. Loll, C. Escudé, T. Boudier, TANGO: A generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization, *Bioinformatics*, 29, 1840-1841 (2013).
- 4-18. K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki, M. Saitou, Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells, *Cell*, 146, 519-532 (2011).
- 4-19. S-H. Yang, T. Kalkan, C. Morrisroe, A. Smith, A. D. Sharrocks, A genome-wide RNAi

- screen reveals MAP kinase phosphatases as key ERK pathway regulators during embryonic stem cell differentiation, *PLoS Genet.*, 8, e1003112 (2012).
- 4-20. H. Miyoshi, T. Adachi, Topography design concept of a tissue engineering scaffold for controlling cell function and fate through actin cytoskeletal modulation, *Tissue Eng. Part B Reviews*, 20, 609-627 (2014).
 - 4-21. A. Kumar, J. K. Placone, A. J. Engler, Understanding the extracellular forces that determine cell fate and maintenance, *Development*, 144, 4261-4270 (2017).
 - 4-22. F. Guilak, D. M. Cohen, B. T. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke, C. S. Chen, Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix, *Cell Stem Cell*, 5, 17-26 (2009).
 - 4-23. Kshitiz, J. Park, P. Kim, W. Helen, A. J. Engler, A. Levchenko, D-H. Kim, Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironment, *Integr. Biol.*, 4, 1008-1018 (2012).
 - 4-24. N. C. Heer, A. C. Martin, Tension, contraction and tissue morphogenesis, *Development*, 144, 4249-4260 (2017).
 - 4-25. M. Eiraku, N. Takata, H. Ishibashi, M. Kawada, E. Sakakura, S. Okuda, K. Sekiguchi, T. Adachi, Y. Sasai, Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture, *Nature*, 472, 51-56 (2011).
 - 4-26. K. Adachi, I. Nikaïdo, H. Ohta, S. Ohtsuka, H. Ura, M. Kadota, T. Wakayama, H. R. Ueda, H. Niwa, Context-dependent wiring of Sox2 regulatory networks for self-renewal of embryonic and trophoblast stem cells, *Molecular Cell*, 52, 380-392 (2013).
 - 4-27. K. N. Smith, A. N. Singh, S. Dalton, Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 7, 343-354 (2010).
 - 4-28. T. Hishida, Y. Nozaki, Y. Nakachi, Y. Mizuno, Y. Okazaki, M. Ema, S. Takahashi, M. Nishimoto, A. Okuda, Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms, *Cell Stem Cell*, 9, 37-49 (2011).
 - 4-29. E. Karzbrun, A. Kshirsagar, S. R. Cohen, J. H. Hanna, O. Reiner, Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding, *Nat. Phys.*, 14, 515-522 (2018).
 - 4-30. A. Desmaison, L. Guillaume, S. Triclin, P. Weiss, B. Ducommun, V. Lobjois, Impact of physical confinement on nuclei geometry and cell division dynamics in 3D spheroids, *Sci. Rep.*, 8, 8785 (2018).
 - 4-31. R. Hiramatsu, T. Matsuoka, C. Kimura-Yoshida, S. Han, K. Mochida, T. Adachi, S. Takayama, I. Matsuo, External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos, *Dev. Cell*, 27, 131-144 (2013).
 - 4-32. Y. Matsushiro, M. Kato-Negeshi, H. Onoe, Differentiation of 3D-shape-controlled mouse neural stem cell to neural tissues in closed agarose microchambers, *Biotech. Bioeng.*, 115, 1614-1623 (2018).
 - 4-33. L. Yu, J. Li, J. Hong, Y. Takashima, N. Fujimoto, M. Nakajima, A. Yamamoto, X. Dong, Y. Dang, Y. Hou, W. Yang, I. Minami, K. Okita, M. Tanaka, C. Luo, F. Tang, Y. Chen, C. Tang, H. Kotera, L. Liu, Low cell-matrix adhesion reveals two subtypes of human pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, 11, 142-156 (2018).

- 4-34. B. G. David, H. Fujita, K. Yasuda, K. Okamoto, Y. Panina, J. Ichinose, O. Sato, M. Horie, T. Ichimura, Y. Okada, T. M. Watanabe, Linking substrate and nucleus via actin cytoskeleton in pluripotency maintenance of mouse embryonic stem cells, *Stem Cell Res.*, 41, 101614 (2019).
- 4-35. C. M. Verstreken, C. Labouesse, C. C. Agle, C. C. Chalut, Embryonic stem cells become mechanoresponsive upon exit from ground state of pluripotency, *Open Biol.*, 9, 180203 (2019).
- 4-36. H. Hirata, M. Sokabe, A novel role of actomyosin in ERK signaling, *Commun. & Integr. Biol.*, 8, e1017176 (2015).
- 4-37. M. C. Mendoza, M. Vilela, J. E. Juarez, J. Blenis, G. Danuser, ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility, *Sci. Signaling*, 8, ra47 (2015).
- 4-38. T. Kimura, Y. Kaga, H. Ohta, M. Odamoto, Y. Sekita, K. Li, N. Yamano, K. Fujikawa, A. Isotani, N. Sasaki, M. Toyoda, K. Hayashi, M. Okabe, T. Shinohara, M. Saitou, T. Nakano, Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition, *Stem Cells*, 32, 2668-2678 (2014).
- 4-39. I. Maeda, D. Okamura, Y. Tokitake, M. Ikeda, H. Kawaguchi, N. Mise, K. Abe, T. Noce, A. Okuda, Y. Matsui, Max is a repressor of germ cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells, *Nat. Commun.*, 4, 1754 (2013).
- 4-40. H. D. Belly, A. Stubb, A. Yanagida, C. Labouesse, P. H. Jones, E. K. Paluch, K. J. Chalut, Membrane tension gates ERK-mediated regulation of pluripotent cell fate, *Cell Stem Cell*, 28, 273-284 (2021).

第 5 章

結論

5.1 本論文のまとめ

多能性幹細胞の集団に対して培養環境を調節することにより，組織形成を誘導し *in vitro* で多細胞組織を構築する手法が注目されている．多能性幹細胞の組織形成能力を引き出すためには，生化学的因子による培養液の組成の調節だけではなく，工学技術を用いた細胞接着場の調節が重要である．このような工学的アプローチによる細胞接着場の調節により，細胞接着を介して組織内力学状態が変化し，多能性幹細胞が形成する組織において領域特異的な多能性状態の変化が引き起こされると考えられる．しかし，細胞接着場の調節により作り出される組織内力学状態が多能性状態変化の領域特異性に及ぼす影響については，十分に理解が進んでいない．そこで，多能性幹細胞の組織形成過程において，微細構造培養基板を用いて組織形状を制御することにより，組織内力学状態と多能性状態の領域特異性を理解することを目指して研究を行った．

本論文では，マウス ES 細胞の組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が組織内力学状態により生じることを明らかにすることを目的とした．この目的のために，微細加工メッシュ構造基板を用いた組織形成誘導手法をより発展させ，細胞接着領域の制限によりマウス ES 細胞の集団に対して層状組織形成を誘導した．まず，第 2 章において，マウス ES 細胞の多能性維持培養条件に応じて，メッシュ構造基板における層状組織形成能力が変化することを明らかにした．次に，第 3 章において，この層状組織形成に伴い，マウス ES 細胞の多能性状態が変化することを明らかにした．さらに，第 4 章において，新たに設計した島状メッシュ構造基板を用いて層状組織の組織形状を制御することにより，領域特異的な多能性状態の変化に組織内力学状態が関与することを明らかにした．

以下に，本論文の各章の主な結論をまとめる．

第 1 章では，多能性幹細胞を用いた多細胞組織形成の現状を概説し，細胞接着場の調節により誘導した組織形成過程における多能性状態変化の領域特異性の重要性を述べた．また，この領域特異的な多能性状態変化には組織内力学状態が重要であることから，

分化誘導によらず、細胞接着場の調節のみにより多能性幹細胞の組織形成を誘導することで、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態変化に及ぼす影響を解析することの必要性を論じた。さらに、細胞接着が可能な領域を制限することで組織形状を制御する手法に着目し、微細加工メッシュ構造基板を用いることで、細胞接着場の調節のみにより多能性幹細胞に対して層状組織形成を誘導すると同時に、領域特異的な状態変化を観察可能であることを述べた。

第2章では、マウス ES 細胞の維持培養条件により定まる多能性状態に応じて、組織形成能力が異なることを検証するため、メッシュ構造基板を用いて平面的な組織成長を促すことで層状組織の形成を誘導し、多能性状態の影響を調べた。マウス ES 細胞のナイーブ状態と基底状態の2つの多能性状態に応じた層状組織形成の差異を調べるため、メッシュ構造基板により層状組織形成を誘導し、形成された層状組織の形状を観察した。3日間培養した結果、基底状態の細胞は不連続な層状組織を形成した一方で、ナイーブ状態の細胞は網目をすべて覆い連続した層状組織を形成した。また、ナイーブ状態の細胞の層状組織形成過程においては、網目を覆う際に生じる孔を囲むように、KRT8 発現細胞がケラチン繊維を発達させている様子が、免疫蛍光染色法により観察できた。このことから、KRT8 発現細胞が層状組織形成における網目を埋める過程に寄与している可能性が示唆された。以上のことから、基底状態のマウス ES 細胞と比較し、KRT8 発現細胞群を含むナイーブ状態のマウス ES 細胞の方が、メッシュ構造基板上における層状組織形成能力が高いことを示した。このことは、組織形成の誘導において多能性状態の選択が必要であることを示しており、多細胞組織を構築する上で重要な知見が得られた。

第3章では、細胞接着場の調節により誘導される層状組織形成過程において、マウス ES 細胞に生じる多能性状態の変化を明らかにするため、メッシュ構造基板上における層状組織形成に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、多能性状態変化を示すタンパク質の発現を調べた。まず、ナイーブ状態のマウス ES 細胞をメッシュ構造基板上で3日間培養して層状組織を形成させ、その後さらに3日間培養を継続した。その結果、層状組織の一部が突出してドーム状の立体組織が形成されることが観察された。また、この一連の組織形成過程において、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的解析を行った結果、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化が生じることが確認された。さらに、免疫蛍光染色法により、この結果に対応した多能性状態変化を示すタンパク質の発現が確認された。したがって、多能性維持培養液を用いた条件にも関わらず、細胞接着が可能な領域を制限したメッシュ構造基板上でマウス ES 細胞を培養すると、組織形成に伴い、多能性状態の変化が自発的に進行することが明らかとなった。この結果は、多能性幹細胞に対して細胞接着場を調節することにより、自発的な組織形成と分化を誘

導できる可能性を示唆したものである。

第4章では、マウス ES 細胞の層状組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が、組織内力学状態により生じることを示すため、層状組織の組織形状を制御することで、領域特異的な組織内力学状態と多能性状態の関係を調べた。まず、メッシュ構造基板上でナイーブ状態のマウス ES 細胞が形成する層状組織においては、厚さの異なる領域が連なる組織形状をなしており、領域によって異なる多能性状態が観察されたことに着目した。そこで、層状組織が互いに孤立して形成されるように工夫した島状メッシュ構造基板を新たに設計し、組織形状を制御することで、領域特異的な多能性状態の変化に及ぼす影響を調べた。島状メッシュ構造基板を用いることにより島状の層状組織が形成され、組織のエッジ領域は基板が存在しない領域に張り出した形状をなした。このエッジ領域に対してレーザーアブレーションを行った結果、張力解放による組織の収縮が観察できた。また、エッジ領域においては、張力の発生に関わるアクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の顕著な発現が観察されたことから、エッジ領域は特異的な組織内力学状態にあることが示された。さらに、免疫蛍光染色法による観察および RT-qPCR 解析の結果、エッジ領域の細胞は、多能性マーカーである OCT3/4 の発現が低く、始原生殖細胞マーカーである AP-2 γ を発現していることを明らかにした。この結果を受け、組織内力学状態と多能性状態変化を繋ぐ経路の一つとして知られている ERK シグナル伝達経路に着目したところ、エッジ領域特異的に ERK 活性化が観察されたことから、エッジ領域特異的な組織内力学状態が、ERK 活性化を介してマウス ES 細胞の多能性状態変化を引き起こしている可能性が示唆された。結果として、微細構造培養基板により組織形状を制御する本研究の独創的なアプローチにより、多能性幹細胞の組織形成過程において、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態の変化に関与することを明らかにした。

以上のことから、本論文は、マウス ES 細胞がメッシュ構造基板上で形成する層状組織において、その組織形状を制御することにより、組織内力学状態に応じて生じる多能性状態の領域特異性を明らかにした。これにより、細胞接着場の調節により作り出される組織内力学状態が、組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化に及ぼす影響を明らかにした。本論文のように、多能性幹細胞の自律的な組織形成を細胞接着場の調節のみにより誘導すると同時に、組織形状を制御することで多能性状態の領域特異性を調べた研究は他に例がなく、工学的アプローチによる多細胞組織構築手法の発展において重要な知見を提供するものである。また、多能性幹細胞はその多分化能の高さゆえに不安定な準安定状態で維持される細胞であることから、組織形成過程における組織内力学状態と多能性状態の関係を理解することは、多能性幹細胞特有の細胞運命決定に関

わる性質の理解に繋がるものである。多能性幹細胞を用いて胚発生過程を模倣し組織形成を誘導する研究は、生化学的因子を用いた分化誘導によるものが多い。したがって、細胞接着場の調節のみにより組織形成と多能性状態変化を誘導し、多能性幹細胞に内在する自己組織化能力を理解しようとすることは、生化学的・工学的アプローチを組み合わせた多細胞組織構築における多能性幹細胞のさらなる活用に貢献するための試みと言える。

5.2 今後の展望

本論文は、多能性幹細胞の組織形成過程において、微細構造培養基板を用いることで組織形状を制御し、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態の変化に関与することを示したものである。特に、多能性幹細胞を用いた多細胞組織構築手法における工学的アプローチによる培養環境の調節に着目し、多能性状態や組織内力学状態が組織形成に及ぼす影響を調べ、将来的には培養環境の調節手法の発展に資する知見を得ることを目指したものである。2000年代以降、究極的には生体組織や臓器を実験室で作製することを目指し、多能性幹細胞を用いて多細胞組織を構築する手法の研究開発や、多能性幹細胞の集団が培養環境から受ける影響を調べる研究が日進月歩で進められている。昨今では、再生医療・創薬に活用可能な多細胞組織が構築可能になり、さらには、脳神経ネットワークが形成された脳オルガノイドや、生命の萌芽に迫る初期胚オルガノイドなどの多細胞組織も構築可能になりつつある。このような多細胞組織の構築過程においては、より精緻な培養環境の調節が必要とされるため、工学的アプローチの重要性がますます高まると考えられる。また、このような組織構築過程においては、組織内力学状態に応じて生じる領域特異的な状態変化を予測し、この状態変化を抑制もしくは促進するために、組織内力学状態を変化させる細胞集団の挙動を制御することが必要となるであろう。したがって、多能性幹細胞の組織形成過程において、細胞挙動や組織変形を力学的な観点から理解するメカノバイオロジー・バイオメカニクス研究が、工学的アプローチによる制御手法を発展させるための重要な知見をもたらすと考えられる。

微細構造培養基板などの工学的アプローチを用いた組織形成誘導手法は、多能性幹細胞だけではなく、さまざまな種類の細胞に対して適用可能であり、生体外で多様な多細胞組織を構築しうる。生体外で培養した細胞集団から自在に多細胞組織を構築すること

は、人類にとって待望の技術の一つである。そもそも細胞培養技術は、およそ 100 年前に生体外での動物細胞の培養が初めて行われて以来、生体組織から胚由来の細胞やがん細胞などの増殖性の高い細胞を取り出し人工的な環境で培養する中で発展してきた。近年になり、ヒト iPS 細胞の樹立や、オルガノイドなどの多細胞組織構築技術の進展により、培養細胞の再生医療・創薬への活用が可能となると同時に、培養細胞から構築する培養肉や培養皮革などの生産技術の開発が進められ、細胞培養技術が実用の域に達しつつある。特に、培養肉については、既に基礎的な技術はほぼ確立されており、主に環境影響の低減や動物福祉の観点から普及が待たれている。このような培養組織においては、組織内に複数種類の細胞を配置し、細胞増殖と細胞外基質の分泌を促すことで目的の培養組織を得る。このために必要な技術的要素として、細胞集団の空間的な配置や配向性を制御する工学技術の開発が、培養組織生産の実用化に向けて進められている。したがって、次世代の組織工学においては、このような培養組織を構成する細胞集団を空間的に制御する工学技術が必須となるであろう。

培養細胞から構築した培養組織のさらなる活用のためには、将来的に、培養組織全体の形状を制御することが必要となると予想する。具体的には、微細構造培養基板を用いた組織成長の物理的な拘束下において細胞集団に培養組織を構築させ、形成される組織の形状を自在に操る手法の開発により、培養組織の成型が可能になるだろう。そのためには、培養組織を構築させる細胞種ごとに、形成する組織形状を把握することが、第一歩として必要である。培養組織の形状については、細胞集団が自己組織的に形成する形状についての研究は行われているにも関わらず、形状制御の観点からはこれまでに研究がほとんどなされていない。したがって、組織成長の物理的な拘束下において、細胞集団が *in vitro* で取りうる組織形状を調べる研究は、基礎的でありながら未着手であり、今後の方向性として興味深い。現代社会ではプラスチックの台頭により複雑な形状を成型することが可能になっている一方で、資源制約や廃棄物制約による諸問題が問われて久しい。地球社会の持続可能な発展のためには、環境負荷が比較的低い生物由来材料の活用が必要であることは明白であり、培養骨や培養木材などの培養組織の活用も必要となるであろう。微細構造培養基板を用いて組織形状を制御する手法が、再生医療・創薬のみならず、培養組織を構築するものづくりにおいても貢献するものとなることを願う。

関連業績

査読付き論文

- 1 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Pluripotency state of mouse ES cells determines their contribution to self-organized layer formation by mesh closure on microstructured adhesion-limiting substrates, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 590, 97-102 (2022).
DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.12.066
- 2 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Junko Sunaga, Taiji Adachi, Edge-localized alteration in pluripotency state of mouse ES cells forming topography-confined layers on designed mesh substrates, *Stem Cell Research*, 53, 102352 (2021).
DOI: 10.1016/j.scr.2021.102352
- 3 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Modulation of adhesion microenvironment using mesh substrates triggers self-organization and primordial germ cell-like differentiation in mouse ES cells, *APL Bioengineering*, 3, 016102 (2019).
DOI: 10.1063/1.5072761

国際学会

- 1 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Junko Sunaga, Taiji Adachi, Pluripotency state alteration at the tissue edge of morphologically confined ES layers self-organized on adhesion limiting substrate, *Materials, Mimics and Microfluidics: Engineering Tools for Mechanobiology (3M MBI) 2021*, Poster presentation, Japan Satellite Session (Online), 2021.7.20.
- 2 | Kennedy Omondi Okeyo, Yuta Ando, Taiji Adachi, Directing self-organization and differentiation of stem cells using a micromesh suspension culture, *The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2020)*, Poster presentation, Online, 2020.10.4-9.
- 3 | Kennedy Omondi Okeyo, Yuta Ando, Taiji Adachi, Self-organization and differentiation of stem cells triggered mechanically by adhesion restriction using suspended microstructured mesh substrates, *AP Biomech 2019*, Oral presentation, Taipei, Taiwan, 2019.11.1-3.
- 4 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Probing the self-organization and differentiation of stem cells by modulating the cell culture microenvironment, *4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2019)*, Poster presentation (D2P23), Mombasa, Kenya, 2019.8.28-30.
- 5 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Spontaneous differentiation to primordial germ cell-like cells and cyst formation from mES cells with microstructured mesh culture,

5th TERMIS World Congress 2018, Poster presentation (02-P081), Kyoto, Japan, 2018.9.4-7.

- 6 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Adhesion-restricted microstructured mesh sheets induce spontaneous differentiation and cyst formation by mESCs, 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Poster presentation (P4028), Dublin, Ireland, 2018.7.8-12.
- 7 | Yuta Ando, Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Self-organized morphological changes in ES cells on adhesion-restricted substrates, Fifth Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2017 (SJB2017), Poster presentation (#1), Zermatt, Switzerland, 2017.9.14-17.

国内学会

- 1 | オケヨ ケネディ, 安藤 悠太, 安達 泰治, Island 型メッシュ基板上でのマウス胚性幹細胞の自己組織化に伴う組織形態が局所的な未分化状態変化に及ぼす影響, 日本機械学会 第 33 回バイオエンジニアリング講演会, 口頭発表 (2C1-01), オンライン, 2021.6.25-26.
- 2 | Kennedy Omondi Okeyo, Yuta Ando, Taiji Adachi, Edge tension involvement in pluripotency state transition determined using mouse ES cell layers, 第 60 回日本生体医工学会大会, 口頭発表 (O1-8-1-4), オンライン, 2021.6.15-17.
- 3 | Kennedy Omondi Okeyo, Yuta Ando, Yoshikiyo Kibe, Taiji Adachi, Self-organization and differentiation of stem cells by modulating the adhesion microspace, 京都大学メディカルイノベーション卓越大学院プログラム医薬系研究交流サロン, ポスター発表, 京都, 2020.1.29.
- 4 | 安藤 悠太, オケヨ ケネディ, 安達 泰治, 多能性幹細胞のシート状組織形成における細胞状態の不均一性評価, 日本機械学会 第 32 回バイオエンジニアリング講演会, 口頭発表 (1A13), 金沢, 2019.12.20-21.
- 5 | 安藤 悠太, オケヨ ケネディ, 安達 泰治, 微細加工基板を用いた細胞接着場調節による多能性幹細胞の分化と形態変化の誘起, 第 1 回日本メカノバイオロジー研究会, ポスター発表 (19), 直島, 2019.9.3-4.
- 6 | 安藤 悠太, オケヨ ケネディ, 安達 泰治, メッシュ構造基板を用いて培養したマウス ES 細胞の始原生殖細胞様分化, 日本機械学会 第 31 回バイオエンジニアリング講演会, 口頭発表 (2F15), 郡山, 2018.12.14-15.
- 7 | 安藤 悠太, オケヨ ケネディ, 安達 泰治, 細胞接着を制限したメッシュ構造基板による mES 細胞の自己組織化誘導, 日本機械学会 第 30 回バイオエンジニアリン

グ講演会, ポスター発表 (1G14) , 京都, 2017.12.14-15.

- 8 | 安藤 悠太, オケヨ ケネディ, 安達 泰治, メッシュ構造基板を用いた接着領域制限下における mES 細胞の未分化性評価, 日本機械学会 2017 年度年次大会, 口頭発表 (J0270101) , さいたま, 2017.9.3-6.
- 9 | 安藤 悠太, オケヨ ケネディ, 安達 泰治, 細胞接着制限環境下における mES 細胞の培養, 第 40 回日本バイオレオロジー学会年会, 口頭発表 (OS5-04) , 倉敷, 2017.5.27-28.
- 10 | Yuta Ando, Junko Sunaga, Taiji Adachi, Cell shapes within self-organized optic cup from embryoid body, 日本機械学会 第27回バイオフィロントニア講演会, 口頭発表(A202), 札幌, 2016.10.22-23.

MISC

- 1 | 熊澤 峰夫, 上野 ふき, 久木田 水生, 井出 和希, 渡辺 彩加, 村上 祐子, 吉岡 (小林) 徹, 安藤 悠太, 中村 秀規, 杉谷 和哉, 鈴木 秀憲, 東原 紘道, 宮野 公樹, 学問の在り方—真理探求、学会、評価をめぐる省察—, 株式会社 union.a, ISBN978-4-908679-08-7 C0037
- 2 | 安藤 悠太, 「木津川探究ワークショップ」から考えた子ども向けワークショップのデザイン, デザイン学論考, 15, 99-109 (2019). <http://hdl.handle.net/2433/237381>

受賞等

- 1 | “Japan Satellite Session Poster Award”, Materials, Mimics and Microfluidics: Engineering Tools for Mechanobiology 2021 (MBI 3M 2021), 2021.7.20.
- 2 | 「特に優れた業績による返還免除 (大学院第一種奨学金・全額免除)」, 独立行政法人 日本学生支援機構, 2021.6.

謝辞

本研究を進めるにあたり、私の指導教員である京都大学ウイルス・再生医科学研究所教授の安達泰治先生には、教育的で熱心なご指導を幾度となく賜りました。ここに心よりの感謝を申し上げます。ならびに、京都大学ウイルス・再生医科学研究所講師の Kennedy Omondi Okeyo 先生には、本研究にあたって手取り足取りの多大なるご指導をいただきました。誠にありがとうございました。また、本論文の執筆にあたり、京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻教授の井上康博先生と横川隆司先生には、多数のご助言をいただきました。ここに深く感謝を申し上げます。

京都大学ウイルス・再生医科学研究所バイオメカニクス分野での研究活動では、研究室のみなさまに大変お世話になりました。特に、助教の亀尾佳貴先生と牧功一郎先生、研究員の須長純子先生と金英寛先生、以前在籍していた Jeonghyun Kim 先生には、親身なアドバイスを数多く賜りました。ここに深く感謝を申し上げます。また、博士後期課程での同期である竹田宏典氏と仲尾信彦氏、以前在籍していた友人である Yann Guyot 氏は、博士研究における支えとなってくれました。ここに格別なる感謝を表します。ならびに、本研究で用いた「メッシュ」に共に携わった研究室メンバーである森山友紀恵氏、寒川裕之氏、木部善清氏、河野沙紀氏、玉井龍太郎氏、下平剛司氏、河崎貴哉氏、小藺井佑弥氏、Vivian Wang 氏、Benjamin Vuong 氏、Marie Keith 氏、また、マウス ES 細胞実験に携わった山口大輝氏は、度重なる実験と議論の時間を過ごした盟友です。ここに厚く感謝を申し上げます。さらに、ここに謝意を表しきれなかった研究室のみなさまと故 大塚莉緒氏に、深くお礼を申し上げます。

最後に、10年に渡る京都大学での学生生活において、全面的に支援してくれた両親と、辛抱強く待っていてくれた妻の詩織に謝意を表すことで、本論文の結びとします。

2022年4月 安藤悠太