

(続紙 1)

京都大学	博士（工学）	氏名	Wang Zhe（王 哲）
論文題目	Recapitulating Human Development in Spatially and Temporally Controlled Artificial Microenvironments （人工微小環境の時間空間制御とそれを利用したヒト発生の再現）		
（論文内容の要旨） Understanding human development requires comprehending the intricate interplay between cells and their microenvironment. Human pluripotent stem cells (hPSCs) are vital in this research due to their ability to differentiate into any cell type, thereby mimicking early human developmental stages. Traditional in vitro culture systems often fail to replicate the complexity of the in vivo environment, compromising the accuracy of these models. hPSCs are highly sensitive to chemical and physical cues in their surroundings. Conventional in vitro systems, typically using plastic substrates, do not replicate the nuanced microenvironment that influences hPSC behavior in vivo. This limitation poses significant challenges in accurately studying cell differentiation and tissue formation. Emerging evidence highlights the crucial role of mechanical and topological factors in hPSC differentiation and maintenance. Therefore, developing culture systems that better mimic the in vivo environment is essential to enhance the relevance and applicability of in vitro research. Recent advancements have focused on creating sophisticated substrates to support hPSC culture. hPSCs are typically cultured under either 2D or 3D conditions. In 2D cultures, cells grow on rigid surfaces, limiting tissue deformation and constraining differentiation. In contrast, 3D cultures are more flexible for tissue formation but lack stability and reproducibility. Tissues develop under gentle mechanical constraints influenced by chemical and mechanical signals. It's important to mimic these conditions in the lab to induce proper cell fates and create complex tissue structures. Recent research emphasizes the significance of mechanical cues like substrate stiffness and geometry in affecting cell behavior and fate. This study aimed to develop a hydrogel substrate with adjustable stiffness to replicate the natural developmental environment of stem cells. In Chapter 1, we introduced a photocurable polyethylene glycol–polyvinyl alcohol (PVA-PEG) hydrogel, allowing precise spatial control over surface stiffness and structure at a micrometer scale. This hydrogel can be functionalized with extracellular matrix (ECM) proteins, such as Laminin 511, to promote hPSC growth and differentiation. Cells cultured on these hydrogels showed similar proliferation rates to those cultured on conventional glass-bottom dishes. Immunofluorescence analysis confirmed that the hPSCs maintained their pluripotency, as indicated by the expression of pluripotency markers SOX2, OCT4,			

and NANOG, for at least six days. The differentiation potential of hPSCs into the three germ layers—ectoderm, mesoderm, and endoderm—was also evaluated. Neural ectoderm differentiation was induced using a dual SMAD inhibition protocol, with cells on both hydrogels and glass-bottom dishes expressing neural ectoderm markers PAX6 and OTX2. qPCR analysis confirmed similar differentiation efficiency across all substrates, and mesoderm and endoderm differentiation were also achieved. By spatially controlling the stiffness of the patterned gel, we can guide the differentiation of hPSCs into complex, patterned structures, better mimicking the in vivo environment.

Building on the insights from Chapter 1, which emphasizes the importance of the mechanical microenvironment, we focus on enhancing spatial and temporal cues within culture systems to generate 3D structures in Chapter 2. Organoids have emerged as powerful tools for modeling tissue development and diseases, but their application is limited by the inability to replicate the full complexity of developmental processes. This limitation is primarily due to the lack of spatial and temporal cues in traditional culture systems. Chapter 2 addresses this challenge by introducing a photocurable hydrogel with enhanced adhesivity for human embryonic stem cells. This hydrogel allows flexible adjustments in geometry, mechanical properties, and degradability. Using this platform, we have successfully generated notochord and neural tube organoids, enhanced the fidelity of in vitro organoid models, and bridged the gap between simplified culture conditions and the intricate dynamics of in vivo development.

In Chapter 3, we delve into replicating one of the most fundamental processes in early development: gastrulation. Gastrulation is a critical phase in early development, where a single-layered epiblast transforms into a multi-layered structure, forming the basis for all body tissues. Our understanding of this process remains incomplete despite advances in genetic and cellular studies. Utilizing the methodologies from Chapters 1 and 2, we aimed to replicate gastrulation and its morphogenesis in vitro. Using the hydrogel, I generated hPSC epithelia like the epiblast, and upon engineered spatial-temporal stimulation, a simple homogeneous hPSC sheet spontaneously breaks symmetry, generating germ layers and gastrulation-like morphogenesis.

This study aims to propel the fields of developmental biology and regenerative medicine forward by enhancing the precision of in vitro models. By creating advanced hydrogel substrates and implementing precise spatiotemporal controls, we can more accurately replicate the in vivo microenvironment and developmental processes. These innovations offer deeper insights into human development and pave the way for more accurate tissue engineering and medical applications.

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の培養に適した周辺環境を提供する新たなハイドロゲル材料を報告し、その物理的特性を利用することで、複雑なヒト初期発生過程の一部を *in vitro* で再現できることを示した。主な結果は以下の通りである。

1. メタクリル酸で修飾した PVA (PVA-MA) をベースとする光硬化性ハイドロゲルを hPSC 培養のために最適化した。4-アーム PEG をゲル製剤に組み込み、光重合時の UV 照射量を変えることでゲルの硬さに可変性を付与した。このハイドロゲルは 700Pa から 6kPa の範囲の剛性を示し、様々な組織環境を模倣するのに適していた。
2. このハイドロゲル上で培養した hPSC は、従来のガラス底ディッシュ上で培養した細胞と同様の細胞増殖率を示した。多能性マーカーである SOX2、OCT4、NANOG の発現によって多能性を維持していることを確認した。また、三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) へ効率よく分化することを確認し、本ハイドロゲルが hPSC の維持・分化培養に適していることを示した。
3. 硬さの異なるハイドロゲルに対する hPSC の応答を調べるために、軟質ゲル、硬質ゲル、ガラス底の基質上で培養した hPSC について RNA-seq 解析を行い、中胚葉関連遺伝子がより柔らかい環境で発現上昇すること示した。さらに、ゲルの硬さを空間的に制御することで、局所的な分化誘導を実現した。一連の摂動実験により、この現象は、より柔らかい基質上で増強される Wnt/ β -カテニンシグナル伝達によって媒介されていることが明らかになった。
4. パターン化された PVA-NB-COOH をベースとしたハイドロゲルを用いて hPSC のシート構造を作成し適切な培養条件で培養することで、新たなヒト神経管発生モデルおよびヒト脊索発生モデルを効率よく作成できることを示した。
5. 局所的な BMP4 タンパク質の添加とハイドロゲルのパターンニングを組み合わせることで、hPSC の分化状態の空間制御を実現し、試験管内においてヒト初期発生過程で見られる大規模な細胞移動現象を再現することに成功した。

本論文では、hPSC に適したハイドロゲル材料の探索を行い、従来の基質と同様に維持・分化培養に供することができる材料を同定した。さらに、ゲルの物理的性質を空間的に変化させることによる細胞分化の空間制御という幹細胞生物学分野における新規の方法論を提示した。これらの一連の研究は、発生生物学上の基礎的な発見に寄与するだけでなく、再生医療のためのより複雑なオルガノイドを誘導するための重要なツールを提供するものと認められる。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、2024 年 10 月 25 日、論文内容とそれに関連した事項について試問をおこなって、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。