

**伸展刺激によるヒト ES 細胞由来
肝芽細胞の血管形成因子の生成促進**

吉本 昂希

目次

要旨.....	4
略語表.....	6
第1章 序論	9
1.1. ヒト多能性幹細胞を用いた分化機構の解明	10
1.2. ヒト多能性幹細胞由来肝実質細胞の成熟していない肝機能.....	10
1.3. 肝実質細胞の機能成熟への細胞外環境としての類洞の寄与.....	11
1.4. 肝実質細胞の機能成熟機構の解明を目指したアプローチ	12
1.5. 肝芽における血管発達過程	12
1.6. 伸展刺激が血管形成因子の生成を促進する可能性	13
1.7. 伸展刺激を付与するマイクロデバイス.....	14
1.8. 本研究の目的	14
第2章 材料と方法	21
2.1. 培養細胞への伸展刺激の付与方法	22
2.1.1. 伸展刺激を付与するマイクロデバイスの設計.....	22
2.1.2. マイクロデバイスの作製.....	26
2.1.3. 伸展刺激付与のためのマイクロデバイス制御.....	28
2.2. 伸展刺激の評価法.....	29
2.2.1. マイクロデバイスの PDMD 膜の厚さと膜中心の変位測定	29
2.2.2. 伸展刺激付与時に変形した培養細胞の観察	29
2.2.3. PDMS 膜の面内ひずみの解析	30
2.3. 細胞培養と分化誘導法	31
2.3.1. ヒト ES 細胞の多分化能の維持培養	31
2.3.2. 細胞培養ディッシュ上での胚性内胚葉細胞への分化誘導	31
2.3.3. マイクロデバイス上での肝芽細胞への分化誘導と伸展刺激付与	33
2.3.4. Caco-2 細胞の培養.....	35
2.3.5. ヒト間葉系幹細胞の維持培養	35

2.3.6. 間葉系幹細胞を用いた血管内皮細胞への分化誘導	35
2.3.7. ゲル上における血管内皮細胞への分化誘導	36
2.3.8. 肝実質細胞への分化誘導	36
2.4. 培養細胞における分化マーカーや血管形成因子の解析	37
2.4.1. フローサイトメトリーによる解析	37
2.4.2. 免疫細胞染色によるタンパク質の発現確認	37
2.4.3. 顕微鏡画像に基づく単一細胞プロファイリング	38
2.4.4. CYP3A 活性の測定	38
2.4.5. 細胞のタンパク質の回収と定量	39
2.4.6. マイクロデバイスで培養した細胞の total RNA の精製と定量	39
2.4.7. RNA-seq	40
2.4.8. RT-qPCR	40
2.4.9. ELISA	41
2.5. 統計解析	41
第3章 結果	43
3.1. マイクロデバイスとヒト ES 細胞の解析	44
3.1.1. マイクロデバイスの PDMS 膜は円蓋状に変形した	44
3.1.2. 変形した PDMS 膜では位置依存的なひずみが生じた	49
3.1.3. 維持培養したヒト ES 細胞は多能性維持していた	52
3.2. マイクロデバイスにおける肝芽細胞への分化誘導	55
3.2.1. 細胞外マトリックス Matrigel と ROCK 阻害剤は接着分化誘導を可能とした	55
3.2.2. 分化誘導 6 日目の細胞は胚性内胚葉細胞マーカーを発現していた	58
3.2.3. KDR 陽性・陰性の肝芽細胞を分化誘導した	60
3.3. 伸展刺激が肝芽細胞に与える効果	70
3.3.1. 伸展刺激は肝実質様細胞への分化を阻害しなかった	70
3.3.2. 伸展刺激は肝芽細胞関連遺伝子の発現を阻害しなかった	74

3.3.3. 伸展刺激は血管形成関連遺伝子の発現を促進した	79
3.4. 伸展刺激による血管形成因子の生成と分泌の促進	85
3.4.1. 伸展刺激は血管形成因子の分泌を促進した	85
3.4.2. KDR 陽性・陰性細胞の双方で血管形成関連遺伝子の発現量が上昇した	88
3.4.3. 血管形成因子の生成・分泌促進には KDR 陽性・陰性細胞の共培養が必要だった	92
第4章 考察	97
4.1. 本研究で用いた分化誘導法	98
4.2. カルシウムシグナリング増幅による血管形成因子生成・分泌促進の可能性	99
4.3. 血管形成因子生成・分泌促進への KDR 陽性・陰性細胞の共培養の寄与	100
4.4. 本研究で用いた手法の改良点	101
4.5. 発生生物学分野と組織工学分野への貢献	103
第5章 結論	105
表	107
引用文献	110
謝辞	118

要旨

ヒト多能性幹細胞を用いた肝臓の発生機構の研究は、新たな分化誘導法の探索を通して、創薬や再生医療の発展に貢献する。これまで、薬物代謝やタンパク質合成などの肝機能の中心を担う肝実質細胞への分化機構が解明されてきた。しかし、肝発生において、分化した肝実質細胞の機能発現に重要とされる血管の形成機構については未だ不明な点が多い。

生体内では、肝臓原基（肝芽）において血管が形成し、その際、肝芽は心臓原基に隣接する。心臓原基由来の化学的因子（線維芽細胞増殖因子）は肝芽を構成する肝芽細胞への分化を促進するが、血管形成を促進しない。一方、肝再生時には、伸展刺激による血管形成因子の増強を通して、血管形成が促進される。そこで、肝発生時の血管形成を促進する因子として、心臓原基の拍動による物理的因子に着目した。拍動は、肝芽に伸展や圧縮などの機械的刺激を与える可能性がある。本研究では、ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞において、周期的伸展刺激が血管形成因子の生成に与える影響とその機構を明らかにすることを目指した。

まず、空圧により、直径 3 mm の円形の平面膜が円蓋状に変形することで、膜上の細胞へ伸展刺激を付与するマイクロデバイスを設計・開発した。続いて、本デバイス上で、先行研究の分化誘導法を改善し、ヒト ES 細胞から肝芽細胞へ分化誘導した。分化誘導した細胞が Keratin19、Forkhead box A2、Hepatocyte nuclear factor 4 などの肝芽細胞マーカーを発現していることを確認した。また、分化誘導した細胞は、KDR（Kinase-insert Domain Receptor）陽性細胞を含有しており、生体内の肝芽細胞と同様の分化能も有していたことから、肝芽細胞であることを確認した。

次に、肝芽細胞に伸展刺激を付与した後、肝実質細胞へ分化誘導した。分化誘導した細胞において、肝実質細胞マーカーの Albumin 分泌量と Cytochrome P450 3A 活性が、伸展刺激の影響を受けないことを確認した。その後、RNA-seq によ

り周期的伸展刺激が肝芽細胞の遺伝子発現へ与える影響を解析した。伸展刺激により有意に発現量が上昇した遺伝子を Gene Ontology 解析したところ、形態・血管形成に関連する遺伝子が高く発現していた。KDR 陽性細胞および KDR 陰性細胞をそれぞれ分取、培養した時、肝芽の血管形成に関わる Hepatocyte growth factor (HGF) と Matrix metalloproteinase9 (MMP9) の生成量と分泌量は、いずれの場合も伸展刺激により増加しなかった。一方、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞を共培養した時、HGF と MMP9 の生成量と分泌量はともに増加した。

本研究では、肝芽細胞の分化能について、周期的伸展刺激付与による変化がないことを明らかにした。その後、ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞において、周期的伸展刺激が血管形成に関わる遺伝子の発現、タンパク質の生成・分泌を促進することを明らかにした。この促進には伸展刺激だけではなく、肝芽細胞の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の共培養が必要であった。本研究成果は、肝臓の発生機構の解明や新たな分化誘導法の開発に繋がると期待できる。

略語表

AAT	Alpha-1-antitrypsin
AFP	Alpha fetoprotein
ALB	Albumin
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CYP ファミリー	Cytochrome P450 ファミリー
CYP3A	Cytochrome P450 3A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEGs	Differential gene expression
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium : nutrient mixture F-12
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered-saline (no calcium, no magnesium)
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ES 細胞	Embryonic stem 細胞
FBS	Fetal bovine serum
FGF2	Fibroblast growth factor 2
GO 解析	Gene ontology 解析
HGF	Hepatocyte growth factor
HHEX	Haematopoietically expressed homeobox protein
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
iPS 細胞	Induced pluripotent stem 細胞
KDR	Kinase-insert domain receptor
KRT19	Keratin 19

MMP2	Matrix metalloproteinase 2
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
mTeSR™1	modified Tenneille serum replacer 1
NEAA	Eagle's minimum essential medium non-essential amino acid solution without L-glutamine, liquid, sterile-filtered bioreagent suitable for cell-culture
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PDMS	Polydimethylsiloxane
RLU	Relative light units
RNA-seq	RNA sequence
ROCK	Rho-associated kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
SEM	Scanning electron microscope
SOX17	Sex determining region Y box 17
SSEA1	Stage-specific embryonic antigen 1
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen 4
TRA-1-60	Tumor-related antigen 1-60
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2

第 1 章 序論

1.1. ヒト多能性幹細胞を用いた分化機構の解明

ヒト多能性幹細胞である ES 細胞(1)が初めて確立されて以降、ヒト多能性幹細胞を効率的に維持培養する技術が開発されてきた。特に、ROCK 阻害剤 (Y27632) の添加による多能性幹細胞のシングルセル継代法の確立は、ヒト多能性幹細胞が有する高い自己増殖能と多分化能を最大限に活用し、大量培養を容易にしたと言える(2, 3)。そのような維持培養技術の発展を背景として、ES 細胞と iPS 細胞(4)などのヒト多能性幹細胞は、その高い自己増殖能と多分化能により、発生生物学、再生医学、臨床薬学など多岐にわたる研究領域の発展に寄与することが期待されてきた。例えば、発生生物学の分野においては、ヒト多能性幹細胞を用いることで、生体内での研究が困難な細胞の分化機構が解明されてきた(5-7)。

1.2. ヒト多能性幹細胞由来肝実質細胞の成熟していない肝機能

ヒト多能性幹細胞を用いた細胞の分化機構の研究の中でも、肝臓の主要細胞である肝実質細胞への分化が着目されてきた(8-12)。その理由として、内分泌系のホルモン分泌や外分泌系の胆汁分泌の他、グリコーゲンの貯蔵、CYP ファミリーなどによる薬物解毒、代謝の制御、コレステロールの合成と輸送、尿素代謝、ALB やアポリポタンパク質を含む広範な血漿タンパク質の分泌を肝実質細胞が担っていることが挙げられる(13)。また、肝線維症、肝炎、肝臓癌などの肝疾患は罹患率・死亡率ともに高く、米国の成人の死亡原因の第4位となっており(13)、ヒト多能性幹細胞から肝実質細胞への分化誘導に関する研究は、新規分化誘導法の探索を通して、肝疾患に対する創薬の開発や肝移植に寄与すると期待されている(14)。特に、重度の肝疾患の患者に対して肝移植が効果的な治療であるが、ドナー不足や拒絶反応などの問題により、肝移植に必要な灌流可能な血管を有した、ヒト多能性幹細胞由来の肝実質細胞を含む肝臓作製が急務である(14)。

これまでの研究によって、ヒト多能性幹細胞から胚性内胚葉細胞と肝芽細胞を経て、さらに肝実質細胞へと分化誘導する過程で必要な化学的因子や転写因子が一部明らかになっている。例えば、胚性内胚葉細胞から肝芽細胞への分化に必要な化学的因子として BMP4 と FGF2 が必要であること(9, 11)、肝芽細胞への運命決定に関わる転写因子は FOXA2 が重要な転写因子であること(12)などが挙げられる。しかし、従来の分化誘導法によって得られたヒト多能性幹細胞由来の肝実質細胞は、成人生体由来の肝実質細胞と比較すると、CYP3A4 の代謝能などの肝機能が十分成熟していないことが課題として残されている(12, 15, 16)。これは、現在の肝実質細胞の分化誘導法が、生体内の肝実質細胞の細胞外環境を十分に再現できていないことが主な要因だと考えられる。

1.3. 肝実質細胞の機能成熟への細胞外環境としての類洞の寄与

成体肝臓において、肝実質細胞の細胞外環境に着目すると、肝実質細胞は類洞と呼ばれる毛細血管網に囲まれている。これは、肝臓特有の構造である肝小葉に基づくものであり、肝小葉はヒトの場合、出生前後で形成される(17)。肝小葉は六角柱をなしており、その角に門脈と肝動脈が存在し、これらの血管と中心静脈を結ぶ類洞が肝実質細胞板の間に存在する (図 1-1) (13)。肝小葉では類洞から肝実質細胞への物質の吸収や排出が類洞内皮細胞の類洞窓を介して行われ、門脈と肝動脈から中心静脈にかけて肝実質細胞の遺伝子発現やタンパク質生成、酵素活性などが位置特異的に異なる「Liver zonation」が形成される (図 1-1) (13, 18)。さらに、類洞に囲まれた肝実質細胞は、従来の手法で分化誘導した ES 細胞由来の肝実質細胞には見られない細胞極性や突起を生じる(19)。また、細胞極性に応じた細胞膜上における輸送タンパク質の発現や細胞小胞による化合物の運搬も観察される(19)。このように、肝実質細胞の機能成熟には、類洞内皮細胞を介した物質交換や類洞に囲まれた細胞外環境が影響している可能性が高い。

1.4. 肝実質細胞の機能成熟機構の解明を目指したアプローチ

本研究では、ヒト ES 細胞由来の肝臓モデルを用いた類洞形成に伴う肝実質細胞への分化・成熟機構の解明を目指す。しかし、類洞形成機構に加えて、肝発生時の血管形成機構に関して未だ不明な点が多い。また、ヒト生体内において、これらの形成機構を解明する手段が存在せず、生体内と同様の肝臓特有の血管構造も再現できていない。そこで、肝実質細胞の機能成熟機構の解明を目指したアプローチとして、マイクロデバイスを利用した肝臓血管発達過程の模倣を行う。

1.5. 肝芽における血管発達過程

受精後 3~4 週のヒト胚において、静脈洞由来の卵黄静脈が肝臓原基（肝芽）に侵入することで、肝臓の血管構造は発達する（**図 1-2**）（20, 21）。このとき、肝芽において、血管芽細胞や内皮細胞前駆体細胞、内皮細胞の細胞表面に発現する血管内皮増殖因子受容体 KDR(22, 23)を発現している細胞が肝臓の血管発達に重要であることが示唆されている(24)。この KDR 陽性細胞は、内胚葉細胞から分化した肝芽細胞マーカーFOXA2 陽性である肝芽細胞である(25)。肝芽特異的に KDR をノックアウトしたマウス由来肝芽を *ex vivo* で培養した時、血管網や肝芽自体の発達が阻害された(24)。さらに、血管形成因子 HGF のアンタゴニストである NK4 を添加し、マウス由来肝芽を *ex vivo* で培養した時、KDR をノックアウトした時と同様に血管網や肝芽自体の発達が阻害されることから、KDR 陽性肝芽細胞は血管形成因子 HGF などの生成・分泌に関連していることが示唆されている(24)。このように、生体外において肝芽の血管発達過程を模倣するためには、KDR 陽性肝芽細胞を利用する必要がある。

一方、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肝芽細胞にも、KDR 陽性肝芽細胞が含まれていることが確認されている(26, 27)。しかし、KDR 陽性肝芽細胞を含む肝芽細胞を血管内皮細胞あるいは間葉系幹細胞と組み合わせる培養法で

は、ヒト多能性幹細胞由来の肝芽において灌流可能な血管網の誘導には至っていない(28, 29)。これは KDR 陽性肝芽細胞に加えて、肝芽への血管誘導において血管形成因子の生成の促進に必要な、さらなる要因の存在を示唆している。

1.6. 伸展刺激が血管形成因子の生成を促進する可能性

肝芽における血管形成因子生成の促進機構についての手がかりを得るために、生体内の血管形成時における肝芽周囲の環境に着目した。生体内の肝芽は受精後 4 週に形成され、受精後 3~4 週頃から拍動する心臓原基に隣接している (図 1-2) (13, 30, 31)。心臓原基から放出される FGF が肝芽細胞への分化を促進することは報告されているが(13)、それだけでは肝芽細胞が生成する血管形成因子を十分に促進するには至らないと考えられる。また、分化誘導時に肝芽細胞の 3 次元培養(32)や細胞接着基盤の剛性を変化させる培養(33)により、血管形成因子 HGF の生成・分泌が促進することや HGF 受容体の下流シグナルの活性化することは報告されていない。

一方、肝臓における血管形成因子 HGF の生成・分泌促進機構は肝再生過程において報告されている。生体内の血圧や生体外の接着基盤の伸展による伸展刺激が類洞内皮細胞の血管形成因子を増強し、肝実質細胞の増殖や血管形成を促進する(34)。これらを踏まえると、肝芽においても伸展刺激などの機械的刺激が血管形成因子の生成促進に寄与する可能性が考えられる。再度、肝芽周囲の環境に着目すると、隣接した心臓原基の拍動に伴う変位は、肝芽へ伸展・圧縮などの機械的刺激を周期的に与えていると推測される。そのため、本研究では、周期的伸展刺激が、肝芽細胞においても、血管形成因子の生成・分泌を促進していると仮説を立てた。

1.7. 伸展刺激を付与するマイクロデバイス

ヒト多能性幹細胞由来の肝芽細胞に周期的伸展刺激を付与し、その影響を解析するためには、従来の培養ディッシュではなく、刺激の周期や、細胞に生じるひずみを制御可能な培養方法が必要である。近年、力学刺激や化学勾配を制御した環境で細胞を培養可能な organ-on-a-chip など、マイクロデバイスを用いた培養手法が注目を集めている(35-37)。特に、PDMS 製の高い伸縮性を持つ膜を変形させ、膜上で接着培養している細胞へ伸展刺激を与える技術が報告されている(38)。この方法では、複数条件の伸展刺激による効果を同時に比較することができるだけでなく、PDMS が高い生体適合性を有するため細胞毒性も低いことが利点である。従来の培養方法と比較して、このようなマイクロデバイスを用いることで、より体内に近い環境での細胞培養が実現し、生体内や一般的な培養法では困難であった研究を展開できると期待される。

本研究では、空圧により円形の PDMS 平面膜が円蓋状に変形し、その膜上で培養している細胞へ伸展刺激を付与するマイクロデバイスを設計・作製した。これを用いて、ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞に周期的伸展刺激を与える。

1.8. 本研究の目的

肝実質細胞の機能成熟機構の解明を目指すにあたって、以下の 3 つのステップを達成する必要がある(図 1-3)。(i) 肝芽細胞において伸展刺激が血管形成因子の生成・分泌を促進することを証明する。(ii) 伸展刺激が肝芽内部への血管誘導を促進することを証明する。(iii) 血管が誘導された肝芽において、類洞形成に伴い、肝実質細胞が機能成熟化することを証明する。3 つのステップの達成により、機能成熟機構の解明に加えて、灌流可能な血管を有し、ヒト多能性幹細胞由来の機能成熟化した肝実質細胞により構成された肝臓を作製することが可能となる。

本研究ではこれらの中でも最初のステップとして重要な (i) について取り組む。本研究の目的は、マイクロデバイスを用いてヒト ES 細胞由来の肝芽細胞に周期的伸展刺激を与え (図 1-4)、その刺激が血管形成因子の生成に及ぼす影響と、その機構を明らかにすることである。あわせて、周期的伸展刺激付与による血管形成因子生成の促進において、KDR 陽性肝芽細胞と KDR 陰性肝芽細胞の共培養の必要性を検証する。本研究の成果を通じて、血管構造を模倣し、肝機能のさらなる成熟化を目指す新しい培養方法の確立に貢献する。

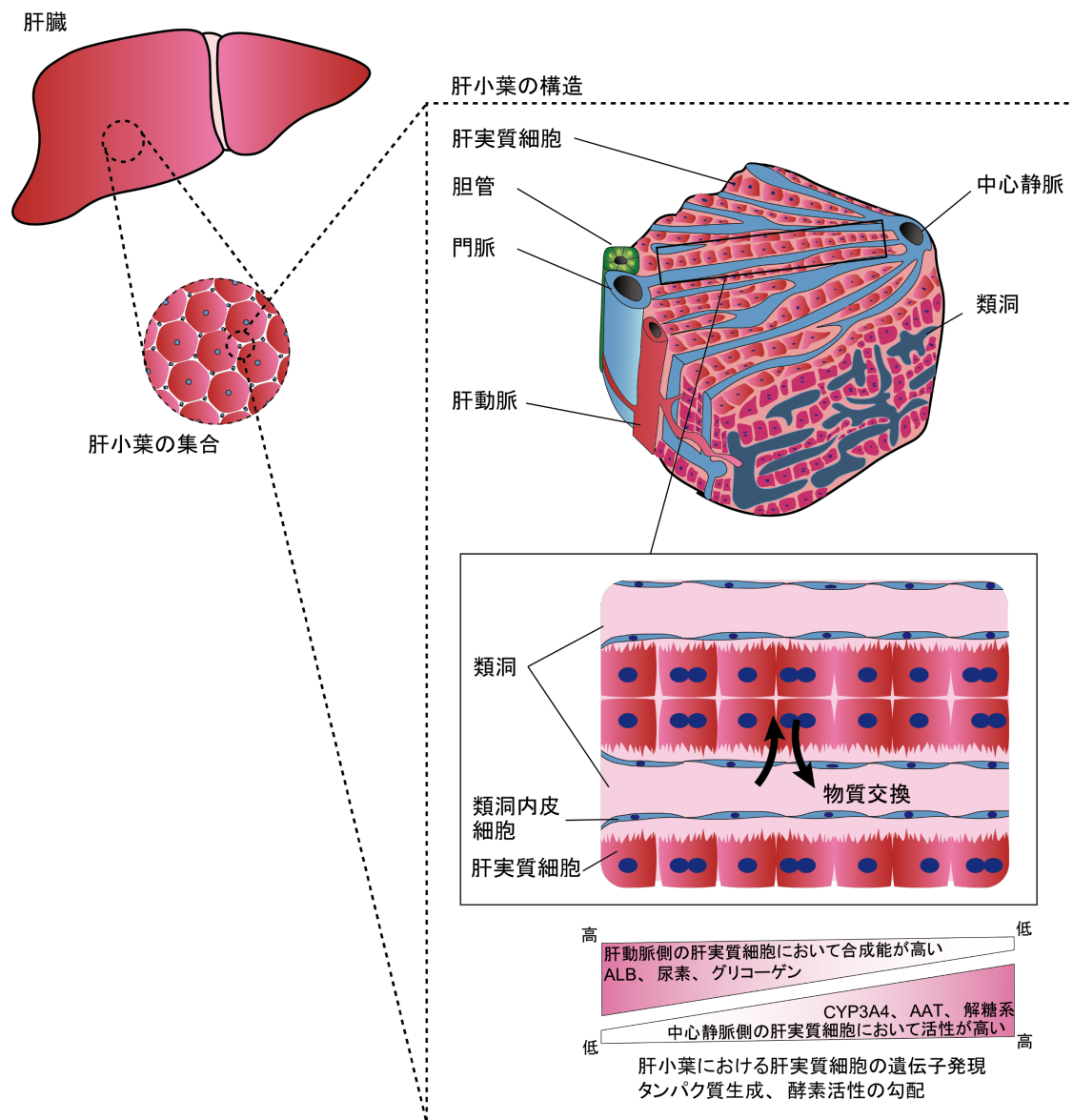


図 1-1 肝小葉における肝臓特有の血管構造。門脈と肝動脈は肝実質細胞板間を
通って中心静脈へ伸びている。肝実質細胞は類洞内皮細胞に囲まれており、
肝実質細胞の機能は血管に対する位置により異なる。細胞外環境としての類洞
は、肝実質細胞の機能化に寄与している可能性が高い。

(参考文献 (20) の図を改変した。)

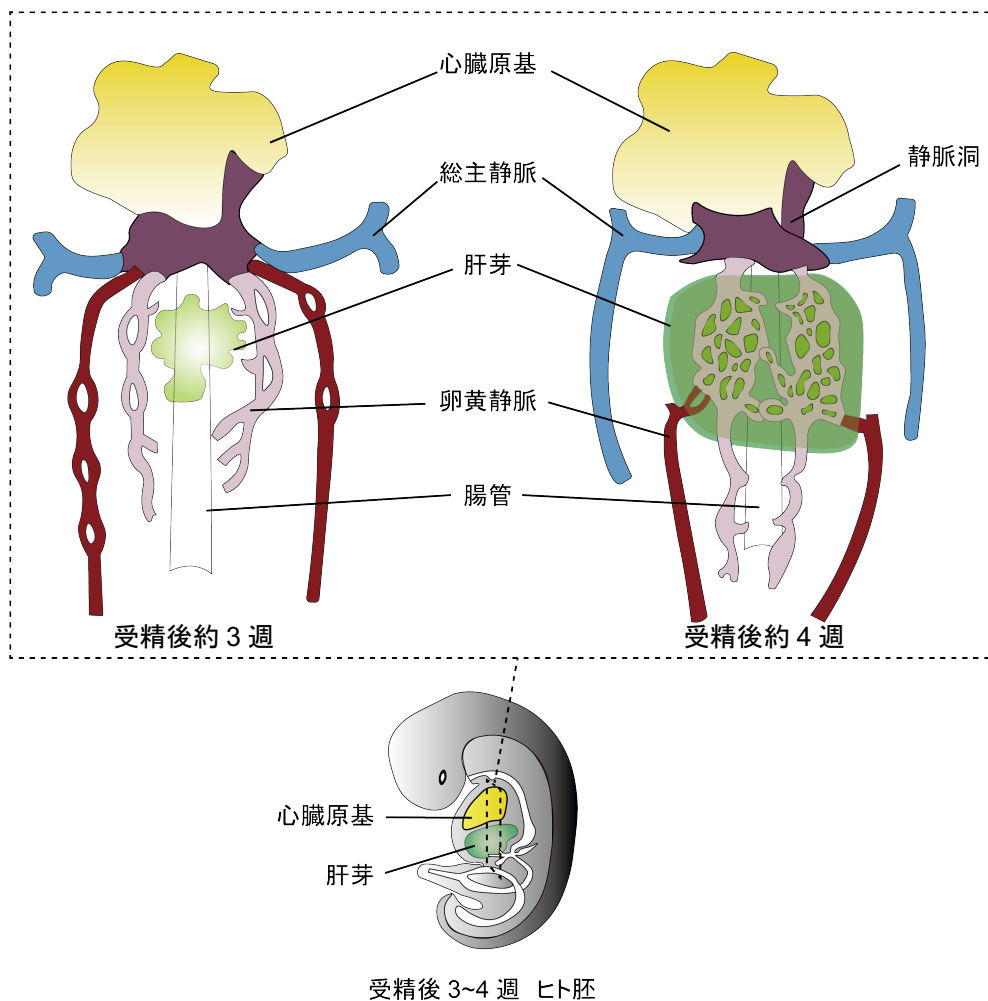


図 1-2 受精後 3~4 週のヒト胚において肝芽は形成する。この段階で、肝芽は拍動している心臓原基に隣接しており、卵黄静脈が肝芽に侵入することで、肝臓において血管形成が生じる。

(参考文献 (22) と (33) の図を改変した。)

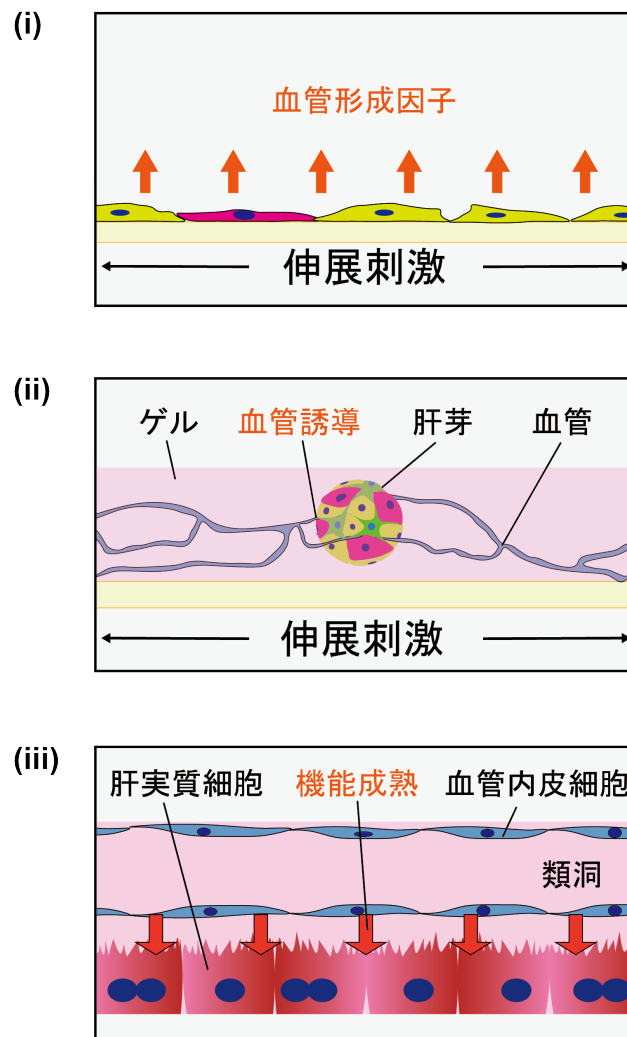


図 1-3 肝実質細胞の機能成熟機構の解明を目指すために達成すべき3つのステップ。(i) 肝芽細胞において伸展刺激が血管形成因子の生成・分泌を促進することを証明する。(ii) 伸展刺激が肝芽内部への血管誘導を促進することを証明する。(iii) 血管誘導された肝芽において、類洞形成に伴い、肝実質細胞が機能成熟化することを証明する。

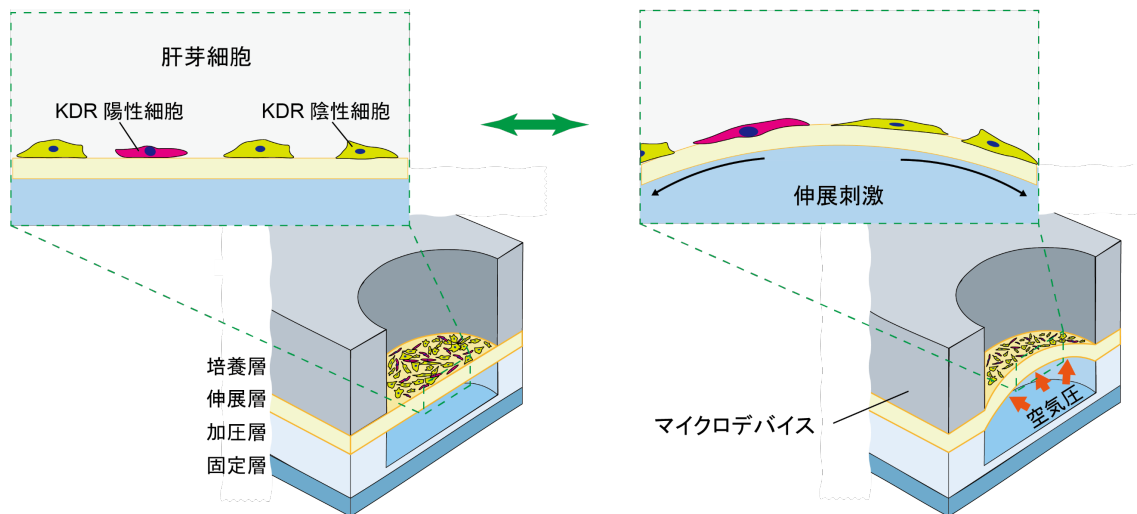


図 1-4 本研究の概略図。培養層、伸展層、加圧層、固定層の4層からなるマイクロデバイスを用いて、ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞へ周期的伸展刺激を与えた。

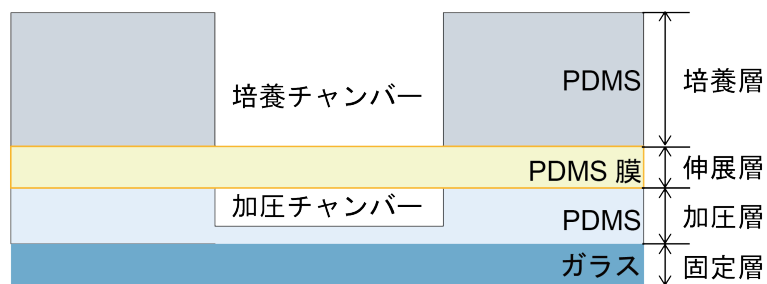
第 2 章 材料と方法

2.1. 培養細胞への伸展刺激の付与方法

2.1.1. 伸展刺激を付与するマイクロデバイスの設計

ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞に、細胞の接着基盤の伸展による伸展刺激を付与可能なマイクロデバイスを開発した(39)。本デバイスには、高い生体適合性、ガス透過性、光透過性、伸縮性を有し、細胞培養に広く使用されている PDMS を材料として用いた(40-45)。伸展刺激を実現するため、培養層、伸展層、加圧層、固定層の 4 層からなる構造を採用した (図 2-1A)。加圧層の加圧チャンバーに圧力を加えることにより、伸展層の PDMS 膜が円蓋状に変形し、PDMS 膜上で細胞を接着培養することで、細胞へ伸展刺激を与えることが可能となる(図 2-1B)。培養層の培養チャンバーを約 40 μ L の細胞培養液で充填可能である。固定層は、スライドガラスで構成され、伸縮性に富む PDMS で構成されたマイクロデバイスの湾曲を抑制する。

A



B

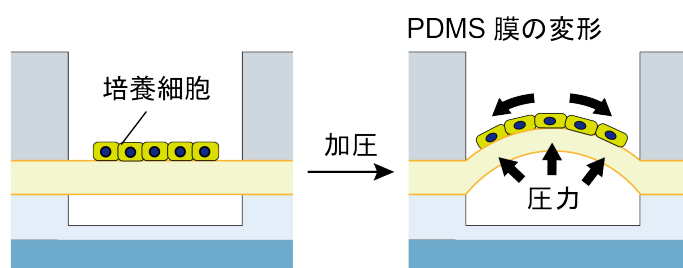


図 2-1 伸展刺激を付与するための4層構造のマイクロデバイス。(A) 培養層、伸展層、加圧層: PDMS、固定層: スライドガラスで構成される。(B) 加圧チャンバーへの加圧によって、PDMS 膜が伸展し、伸展刺激を培養細胞に付与可能である。

ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞における血管形成因子の生成と伸展刺激の関係を明らかにするため、15 通りの伸展刺激を実現可能なデバイスを設計した。設計時、空気などの流体が管を通過する際に、流体と通過した管壁との摩擦や渦流などにより、インレットからの距離に応じて圧力が減少する現象、圧力降下を利用した。マイクロデバイス内の流路に対して 15 個の圧力チャンバーを設置した。また、顕微鏡のステージ上での操作の容易さを考慮して、全ての流路や圧力チャンバーが、スライドガラス (25 mm×75 mm) に収まるように、下記の計算式を用いてマイクロデバイスを設計した。

先行研究(38)で示されている PDMS 製のマイクロ流路とそこでの圧力降下の関係式

$$\Delta P = 4f \left(\frac{L}{D} \right) \left(\frac{\rho v^2}{2} \right) \quad (4-1)$$

$$D = \left(\frac{2wh}{w+h} \right) \quad (4-2)$$

を参考にし、チャンバーを配置する間隔を計算した。ここで、 L は流路の長さ、 ρ は流体密度、 v は流体の速度、 w は流路の幅、 h は流路の高さ、 D は w と h で定まる変数である。設計上、マイクロデバイスは 15 通りの伸展条件のチャンバーを 2 組ずつ搭載している (図 2-2)。

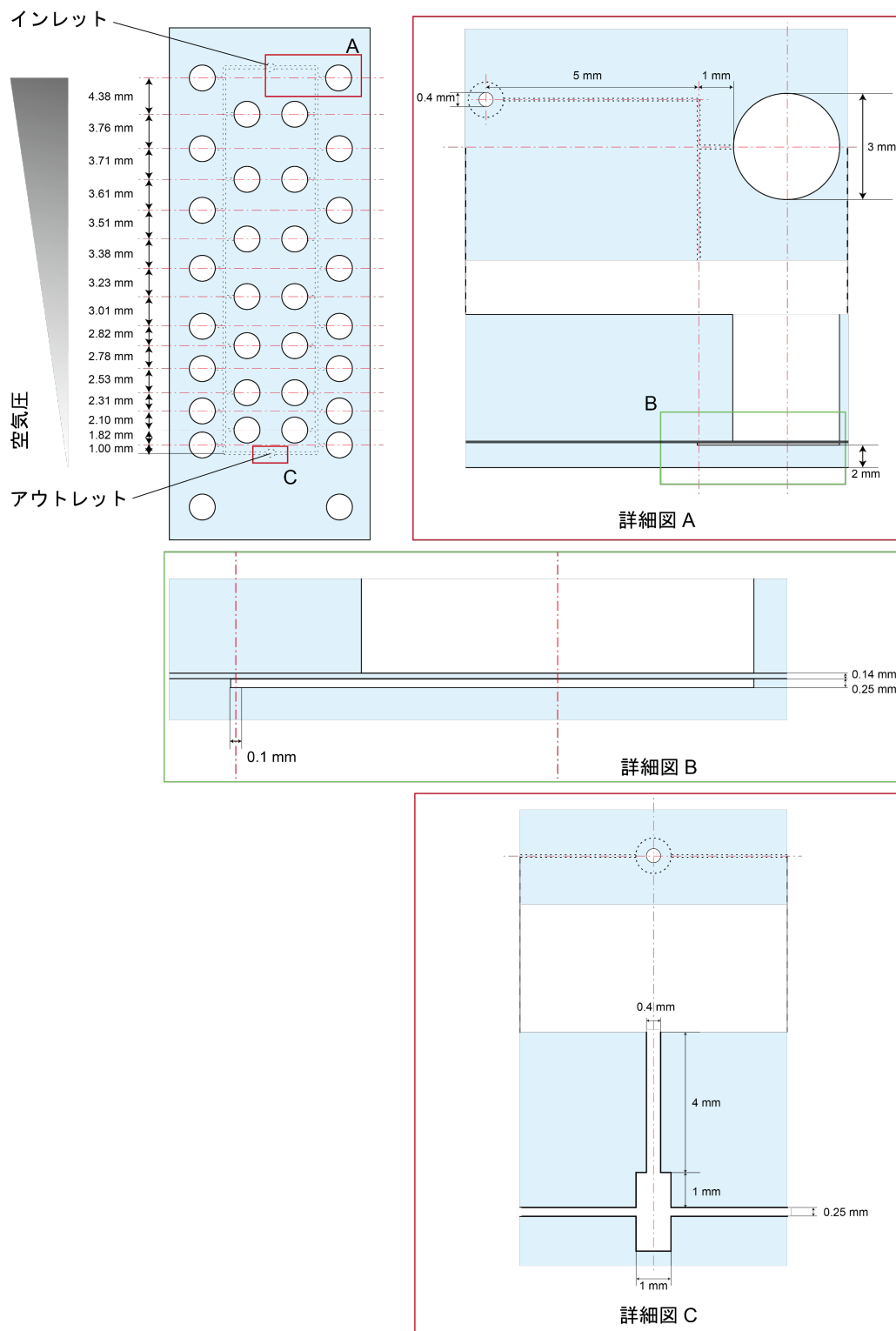


図 2-2 マイクロデバイスの設計図。圧力降下を利用することで、マイクロデバイスは複数の伸展条件のチャンバーを搭載している。

2.1.2. マイクロデバイスの作製

本研究では、鋳型の作製に、フォトリソグラフィより短時間（2日間）かつ低コストで作製可能な、高精細度の光造形 3D プリンターによる鋳型作製法(46, 47)を用いて、以下の手順でマイクロデバイスを作製した（図 2-3）。

まず、3D CAD ソフト（OpenSCAD）を用いて、マイクロデバイス作製に使用する鋳型を設計した。鋳型作製には、3D プリンター（AGILISTA-3200; KEYENCE CORPORATION）を用いた（図 2-3 1a）。作製した鋳型を 99.5%エタノールで 12 時間洗浄し、80℃で 30 分間乾燥した。その後、SYLGARD™ 184 PDMS Elastomer Base と Curing Agent（Dow Corning Toray）を重量比 10:1 の割合で混合した上で、加圧層と培養層用の鋳型に流し込み、30 分間デシケーターで脱気した。鋳型に流し込んだ PDMS を 80℃のオーブンで 16 時間固化した（図 2-3 1b と 1c）。鋳型から取り外し、スコッチ®メンディングテープ（3M Company）により PDMS 表面の汚れを除去した。

次に、PDMS 膜を作製するため、再び SYLGARD™ 184 PDMS Elastomer Base と Curing Agent を重量比 10:1 で混合した。Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl) silane（Sigma-Aldrich）により表面を撥水性コーティングした片鏡面シリコンウェハの鏡面側に混合した PDMS を注いだ。シリコンウェハと PDMS を 500 rpm、30 秒間スピンのコーター（MIKASA）で回転した後、10 分間 80℃のオーブンに入れ、PDMS を固化した（図 2-3 2a）。

伸展層となる PDMS 膜と加圧層の表面をプラズマ処理し、接着した。伸展層-加圧層を 80℃のオーブンに 6 時間静置した（図 2-3 2b）。接着後、伸展層-加圧層をシリコンウェハから剥離し、出入口を穿孔した。（図 2-3 2c）。その後、伸展層-加圧層、細胞培養層、固定層（スライドガラス；松浪硝子工業）の表面をそれぞれプラズマ処理し、全ての層を接着した（図 2-3 d）。培養層-伸展層-加圧層-固定層を 80℃のオーブンに 16 時間静置し、マイクロデバイスを完成させた。

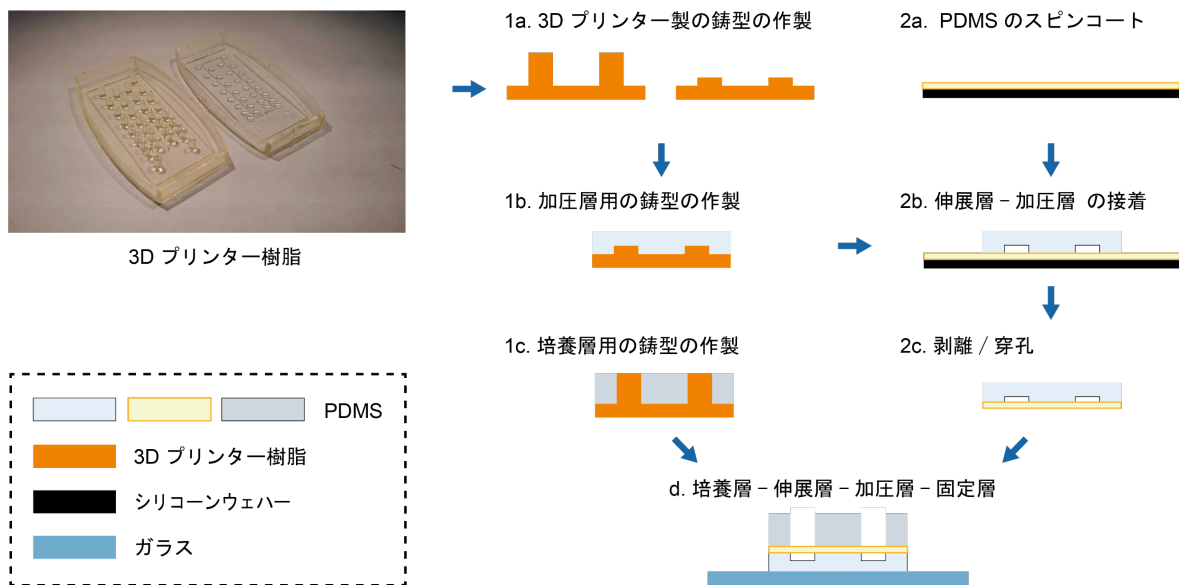


図 2-3 マイクロデバイス作製法。(1a) 3D プリンターを用いて加圧層と培養層用の鋳型を作製した。(1b、c) 鋳型に PDMS を流し込み、80 °C で固化した。(2a) シリコンウェハー上に PDMS を注ぎ、500 rpm、30 秒間スピンのコートし、80 °C で固化した。(2b) 培養層と伸展層を接着し、80 °C で固化した。(2c) 加圧層-伸展層を剥離し、穿孔した。(d) 加圧層-伸展層を培養層と接着し、さらにガラスと接着した。

2.1.3. 伸展刺激付与のためのマイクロデバイス制御

マイクロデバイスに加える空気の圧力を調整するため、コンプレッサーを接続した controller board (VC3 8 controller [ALA Scientific Instruments]と NI USB-6501 [National Instruments]) と圧力制御電磁弁 (Microfluidic System Works Inc.と THE LEE Company) (図 2-4A) を、ソフトウェア: LabVIEW (Version 11.0, National Instruments) (図 2-4B) により制御した。

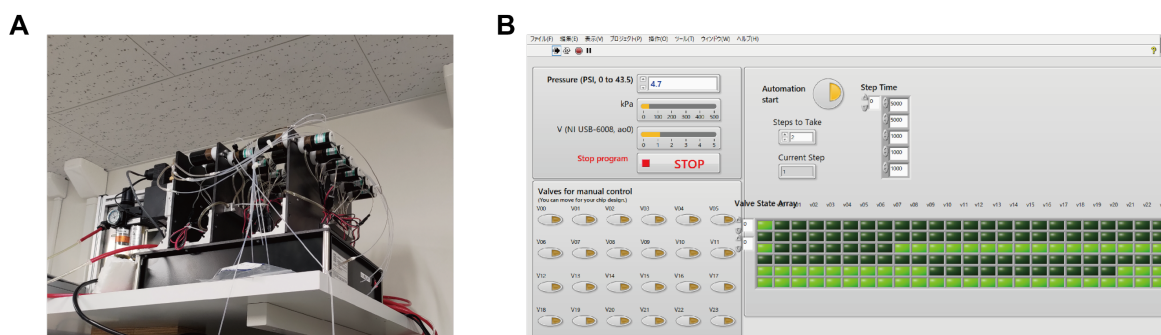


図 2-4 (A) コンプレッサーに接続した controller board と圧力制御電磁弁。(B) 圧力制御電磁弁を制御する LabVIEW。

2.2. 伸展刺激の評価法

2.2.1. マイクロデバイスの PDMS 膜の厚さと膜中心の変位測定

変形していない状態のマイクロデバイスの構造断面を SEM で観察し、PDMS 膜の厚さを測定するため、スパッタリング (MSP 30T; Shinku Device) により、表面をプラチナで膜コーティングした。SEM (JCM-5000; JEOL Ltd) により、マイクロデバイス構造断面の画像を撮影した。

さらに、インレット近くに接続した高精度デジタル圧力スイッチ (ZS-46-5F; SMC) を用いて、マイクロデバイスに加えた空気のゲージ圧を測定した。また、膜変形時の PDMS 膜中心の厚さ方向の変位を測定するため、CCD レーザ変位計 (LK-G5000; KEYENCE CORPORATION) を用いて、加圧時に円蓋状に変形した PDMS 膜中心の高さを測定した。

2.2.2. 伸展刺激付与時に変形した培養細胞の観察

伸展刺激付与時の細胞の変形を観察するため、**2 章 3.4 項**の方法に従ってマイクロデバイス上で Caco-2 細胞を培養した。顕微鏡による観察ため、**2 章 3.2 項**の方法に従った。立体的な観察には、Nikon ECLIPSE Ti2-E 倒立蛍光顕微鏡 (Nikon) 上に構築された Andor Dragonfly 502 システム (Andor) の共焦点顕微鏡を用いた。このシステムは、Fusion2 (Andor) による Zyla 4.2 と相補型金属-酸化膜-半導体(sCMOS)カメラ(Andor)、CFI Plan apochromat lambda 10× dry/0.45 NA (Nikon)、CFI Super Fluor 20× dry/0.75 NA (Nikon)、電動 XY ステージとステージピエゾ (Applied Scientific Instrumentation,)、および 3 つのレーザ(405, 488, 561, 637 nm)を搭載していた。マイクロデバイス上の細胞の観察は固定層側から行った。

2.2.3. PDMS 膜の面内ひずみの解析

マイクロデバイスに加圧した際に生じる PDMS 膜の面内ひずみを解析するため、有限要素解析を行った。PDMS の材料特性は等方弾性体とした。また Elastomer Agent と Curing Agent を 10:1 で混合した PDMS のヤング率は先行研究より 1800 kPa、ポアソン比は 0.48 とした(48, 49)。メッシュパラメーターを Ratio:0.65、Slices:20、Segments:27、Stacks:10、Z-bias:1、R-bias:1、Mesh Type: Butterfly center と設定し、59,200 個の六面体要素に離散化した。有限要素解析の計算と計算結果の可視化は Finite Elements for Biomechanics (Febio) を用いて行った(50)。

2.3. 細胞培養と分化誘導法

2.3.1. ヒト ES 細胞の多分化能の維持培養

本研究で用いた WA09 (H9) ヒト ES 細胞は、WiCell Research Institute より購入し、京都大学の倫理委員会のガイドラインに従って使用した（使用計画【ES3-9】、【ES3-10】として承認された）。

維持培養では、細胞培養用ディッシュに DMEM/F12 (Merck KGaA) で 75:1 に希釈した Matrigel® hESC-Qualified Matrix (Matrigel; Corning, Inc.) を加え、35°C で 1 時間インキュベートした。Matrigel を除去した後、2 mL DMEM/F12 で洗浄した。ヒト ES 細胞の培養には mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) を使用した。なお、本研究で用いた全ての培地に 1% penicillin/streptomycin (Fujifilm Wako) を添加した。

ヒト ES 細胞の継代時、D-PBS (no calcium, no magnesium; Thermo Fisher Scientific) で細胞を洗浄後、TrypLE™ Express Enzyme (1X)、phenol red (TrypLE™; Thermo Fisher Scientific) を加え、37°C で 3 分間インキュベートした。その後、遠沈管に剥離した細胞を回収した。遠沈管内の細胞を 200 × g で 3 分間遠心した後に再懸濁し、 1.5×10^5 cells を細胞培養用ディッシュに播種した。培養 1 日目まで、10 μM の ROCK inhibitor、Y27632 (Fujifilm Wako) を含む mTeSR™1 で培地交換した。継代まで毎日 1 回、培地交換を続け、3-4 日ごとに継代した。

2.3.2. 細胞培養ディッシュ上での胚性内胚葉細胞への分化誘導

D-PBS に溶解した 2 mL 0.1% 豚皮ゼラチン (A タイプ) (Merck KGaA) 溶液を φ35 mm の細胞培養ディッシュに入れて 25°C で 30 分間インキュベートした。ゼラチン溶液を除去した後、10% fetal bovine serum (JRH Biosciences)、1% L-glutamine、100 μM 2-mercaptoethanol (Fujifilm Wako) を添加した DMEM/F12 を

細胞培養ディッシュに満たし、37°C で 24 時間インキュベートした。ヒト多能性幹細胞から胚性内胚葉への分化培養を始める前に、DMEM/F12 で洗浄してから使用した。

細胞培養ディッシュで培養していた H9 細胞を D-PBS で洗浄後、TrypLE™ を加え、37°C で 3 分間インキュベートした。その後、mTeSR™1 と共に、細胞懸濁液を遠沈管に回収した。遠沈管内の細胞を 200 × g で 3 分間遠心した後、上清を除去し、10 μM Y27632、100 ng/mL activin A (human recombinant; Fujifilm Wako) を加えた mTeSR™1 で再懸濁した。その後、細胞培養ディッシュに 5.00×10^4 cells/cm² で播種し、37°C で培養した。以下の手順で分化 6 日目 (D6) まで分化誘導した (図 2-4)。

D1: 100 ng/mL activin A を添加した mTeSR™1 で培地交換した。

D2: 10 μM Y27632、100 ng/mL activin A、10 ng/mL BMP-4 (human recombinant; R&D Systems)、10 μM LY294002 (Cayman Chemical)、3 μM CHIR99021 (REPROCELL) を添加した mTeSR™1 で培地交換した。

D3: 10 μM Y27632、100 ng/mL activin A、10 ng/mL BMP-4、10 μM LY294002、を添加した mTeSR™1 で培地交換した。

D4: 2% B-27® Supplements (Thermo Fisher Scientific)、1% NEAA (Merck KGaA)、100 ng/mL activin A、100 ng/mL bFGF (human recombinant; Fujifilm Wako)、GlutaMax™ Supplement (Thermo Fisher) を添加した RPMI1640 (Thermo Fisher) で培地交換した。

D5-6: 2% B-27® Supplements、1% NEAA、50 ng/mL activin A、GlutaMax™ Supplement を添加した RPMI1640 で培地交換した。

2.3.3. マイクロデバイス上での肝芽細胞への分化誘導と伸展刺激付与

本研究では、先行研究(51)の手法を改変し、マイクロデバイス上でヒト ES 細胞から肝芽細胞へ分化誘導した (図 2-5)。マイクロデバイスでの接着培養のため、培養前にマイクロデバイスのウェルの不純物をエアースローにより除去した後、DMEM/F12 で 75:1 に希釈した Matrigel を 30 μ L ずつマイクロデバイスのウェルに加え、35°C で 1 時間インキュベートした。ディッシュで培養していたヒト ES 細胞を D-PBS で洗浄後、TrypLE™ を加え、37°C で 3 分間インキュベートした。その後、mTeSR™1 と共に、細胞懸濁液を遠沈管に回収した。遠沈管内の細胞を 200 $\times$ g で 3 分間遠心し、上清を除去した後、10 μ M Y27632、100 ng/mL activin A を加えた mTeSR™1 で 7.0×10^5 cells/mL に再懸濁した。マイクロデバイスの各ウェルに 30 μ L ずつ加えていった。その後、600 $\times$ g で 10 秒間遠心し、細胞を接着させた。以下の手順で D12 まで分化誘導した。

D1: 100 ng/mL activin A を添加した mTeSR™1 で培地交換した。

D2: 10 μ M Y27632、100 ng/mL activin A、10 ng/mL BMP-4、10 μ M LY294002、3 μ M CHIR99021 を添加した mTeSR™1 で培地交換した。

D3: 10 μ M Y27632、100 ng/mL activin A、10 ng/mL BMP-4、10 μ M LY294002、を添加した mTeSR™1 で培地交換した。

D4: 2% B-27® Supplements、1% NEAA、10 μ M Y27632、100 ng/mL activin A、100 ng/mL bFGF (human recombinant)、GlutaMax™ Supplement を添加した RPMI1640 で培地交換した。

D5-7: 2% B-27® Supplements、1% NEAA、10 μ M Y27632、50 ng/mL activin A、GlutaMax™ Supplement を添加した RPMI1640 で毎日培地交換した。

D8: 2% B-27® Supplements、1% NEAA、10 μ M Y27632、20 ng/mL BMP-4、10 ng/mL FGF-10 (human recombinant; R&D Systems)、GlutaMax™ Supplement を添加した RPMI1640 で培地交換した。

D9-D12: 2% B-27[®] Supplements、1% NEAA、10 μ M Y27632、20 ng/mL BMP-4、10 ng/mL FGF-10、25 mM HEPES (Fujifilm Wako)、GlutaMax[™] Supplement を添加した RPMI1640 で毎日培地交換した。周期的伸展刺激を培養細胞に与える場合、D9 から D12 の間、継続的に刺激を与え続けた。

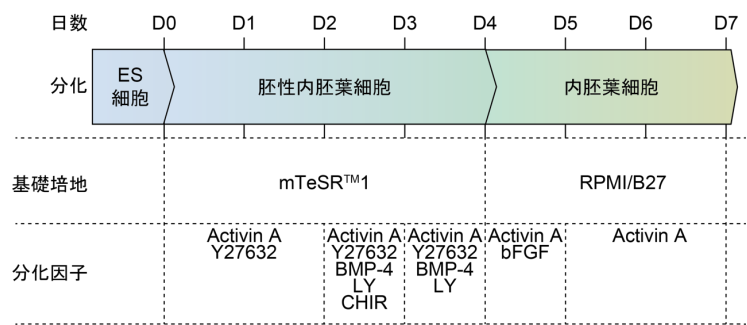


図 2-4 細胞培養ディッシュ上でのヒト ES 細胞から内胚葉細胞への分化誘導過程。

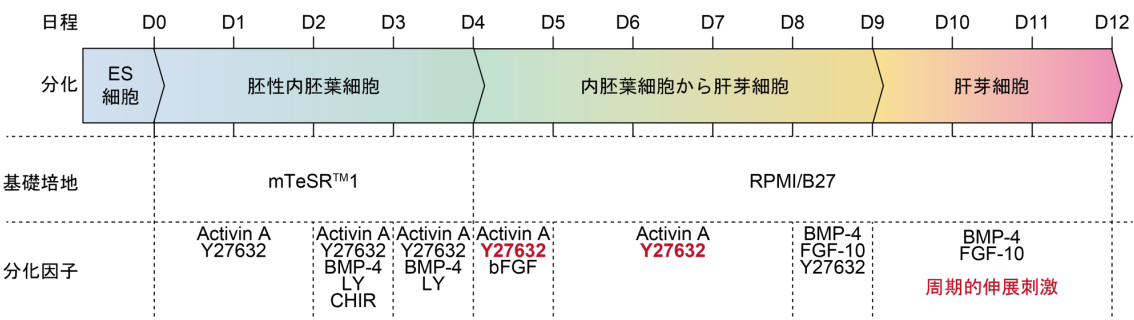


図 2-5 マイクロデバイス上でのヒト ES 細胞から肝芽細胞への分化誘導過程。
D9 以降に肝芽細胞に周期的伸展刺激を加えた。

2.3.4. Caco-2 細胞の培養

本実験では、10% FBS (Cell Culture Bioscience)、1% NEAA を添加した DMEM (low glucose; Thermo Fisher Scientific) により、ヒト間葉系幹細胞を維持培養し、3 から 4 日ごとに継代した。D-PBS で細胞を洗浄後、trypsin/EDTA (0.04%/0.03% [v/v]) を加え、37°C で 3 分間インキュベートした。その後、遠沈管に剥離した細胞を回収した。遠沈管内の細胞を $200 \times g$ で 3 分間遠心し、再懸濁後、 $\phi 35$ mm の細胞培養ディッシュに 1.5×10^5 cells を播種した。マイクロデバイス上で培養する際は、接着培養のため、培養前にデバイスのウェルの不純物をエアブローにより除去した後、DMEM/F12 で 75:1 に希釈した Matrigel を 30 μ L ずつマイクロデバイスのウェルに加え、35°C で 1 時間インキュベートした。1 ウェルあたり、 2.0×10^4 cells をマイクロデバイスのウェルに播種した。

2.3.5. ヒト間葉系幹細胞の維持培養

本実験では、10% FBS (Cell Culture Bioscience)、1% NEAA を添加した DMEM (low glucose) により、ヒト間葉系幹細胞を維持培養し、3 から 4 日ごとに継代した。D-PBS で細胞を洗浄後、TrypLE™ を加え、37°C で 3 分間インキュベートした。その後、遠沈管に剥離した細胞を回収した。遠沈管内の細胞を $200 \times g$ で 3 分間遠心し、再懸濁後、 $\phi 35$ mm の細胞培養ディッシュに 1.5×10^5 cells を播種した。

2.3.6. 間葉系幹細胞を用いた血管内皮細胞への分化誘導

デバイス上で分化培養した D9、D12 の肝芽細胞を 0.1% trypsin /EDTA を用いて剥離し、等量の 1 mg/mL トリプシンインヒビター (Fujifilm Wako) を混合して回収した。抗体による染色を行うため、BD Pharmingen™ Stain Buffer (BD

Biosciences) により肝芽細胞を 1.0×10^7 cells/mL に希釈した。**表 1** に示す通り、25 μ L の細胞懸濁液あたり 1 μ L の Alexa Fluor[®] 647 Mouse Anti-Human CD309 (KDR; BD Biosciences) 抗体を加え、細胞懸濁液を 25°C で 1 時間静置した。FACS Aria[™] II SORP (BD Biosciences) を用いて分取した 1.0×10^4 cells の KDR 陽性細胞もしくは KDR 陰性細胞を 1.0×10^3 cells の間葉系細胞と、ゲル化させた Geltrex[™] hESC-Qualified, Ready-To-Use, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Geltrex; Thermo Fisher Scientific) 内で、100 ng/ mL VEGF-165 (human recombinant; Fujifilm Wako) を添加した EGM[™] Endothelial Cell Growth Medium BulletKit[™] (Lonza) を用いて 7 日間培養した。

2.3.7. ゲル上における血管内皮細胞への分化誘導

Geltrex を細胞培養ディッシュ上に 100 μ L 滴下し、37°C で 30 分間保温してゲル化した。その後、**第 2 章 3.5 項** で述べた手法と同様に、KDR 抗体を用いて分取した KDR 陽性細胞、KDR 陰性細胞をそれぞれ、ゲル上に播種した。血管内皮細胞へ分化誘導するために、100 ng/ mL VEGF-165 (human recombinant) を添加した EGM[™] Endothelial Cell Growth Medium BulletKit[™] を用いて 48 時間培養した。

2.3.8. 肝実質細胞への分化誘導

30 ng/mL oncostatin M (R&D Systems)、50 ng/mL HGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ) を添加した HCM[™] Hepatocyte Culture Medium BulletKit[™] (Lonza) で D12 の細胞、もしくは分取した D9 の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞をそれぞれ培養した。最大で 16 日間、2 日に 1 回、培地交換した。

2.4. 培養細胞における分化マーカーや血管形成因子の解析

2.4.1. フローサイトメトリーによる解析

培養した細胞を回収した後、抗体による染色を行うため、BD Pharmingen™ Stain Buffer (fetal bovine serum) を用いて細胞を 1.0×10^7 cells/mL に希釈した。その後、2 μ L の蛍光ラベルされた抗体 (**表 1**) を 50 μ L の細胞懸濁液に加え、25°C で 1 時間静置した。300 $\times$ g で 5 分間遠心した後、上清を除去し、Stain Buffer で洗浄した。その後、FACSCanto™ II (BD Biosciences) により、細胞懸濁液を解析した。データ解析には、FlowJo™ software (v9; FlowJo) を用いた。

2.4.2. 免疫細胞染色によるタンパク質の発現確認

D-PBS で洗浄した細胞に 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Fujifilm Wako) を加え、25°C で 20 分間固定処理した。核内染色時には、細胞膜の透化処理のため、0.1 % Triton X-100 を添加した D-PBS により、25°C で 5 分間細胞を処理した。ブロッキング処理のため、5% normal goat serum blocking solution (Maravai Life Sciences)、5% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch)、3% albumin、essentially globulin-free (Merck KGaA)、0.1% Tween-20 (Nacalai Tesque) を添加した D-PBS (ブロッキングバッファー) を固定した細胞に加え、4°C で 16 時間静置した。**表 2** に示す希釈倍率通り、1 次抗体をブロッキングバッファーで希釈した。これを細胞に加え、4°C で 16 時間静置した。その後、0.1% Tween-20 溶解した D-PBS により細胞を 3 回洗浄した。さらに、**表 3** に示す希釈倍率通り、2 次抗体をブロッキングバッファーで希釈した。これを 1 次抗体で染色した細胞に加え、25°C で 1 時間静置した。必要に応じて核を染色するため、DAPI (Fujifilm Wako) を加えた D-PBS と細胞を 25°C で 1 時間静置した。

免疫細胞染色したサンプルの画像の撮影には、CFI plan fluor 10 $\times$ /0.30 N.A. 対

物レンズ (Nikon)、CCD カメラ (ORCA-R2; Hamamatsu Photonics)、水銀ランプ (Intensilight; Nikon)、XYZ automated stage (Ti-S-ER motorized stage with encoders; Nikon)、蛍光フィルターキューブ (DAPI, GFP HYQ, TRITC; Nikon) を搭載した Nikon ECLIPSE Ti 倒立型蛍光顕微鏡を用いた。もしくは、FLUOVIEW FV3000 共焦点レーザ顕微鏡 (Olympus) を用いた。

2.4.3. 顕微鏡画像に基づく単一細胞プロファイリング

第 2 章 4.2 項において撮影した画像を解析するため、CellProfiler™ (ver. 3.1.9) (52)を用いた。抗体で染色した各タンパク質の画像と DAPI で染色した核の画像をそれぞれ入力した。大津の二値化法(53)により、ピクセル数が 75 以上 400 以下の核を自動で認識した。核のデータを基に、CellProfiler™ の Propagation method により染色したタンパク質と細胞質を自動で認識した。認識した核、細胞質のデータを基に、個々の細胞における蛍光強度を自動で定量した。

2.4.4. CYP3A 活性の測定

CYP 3A の活性を測定するため、P450-Glo™ CYP3A4 assay and Screening System (Promega)を使用した。マイクロデバイスのウェルから培地を 20 μ L 回収した。次に、pro-luciferin IPA を RPMI 培地に希釈した (1.5:1000)。マイクロデバイスの駆動を停止した後、作製した pro-luciferin IPA を含む培地を各ウェルに加えた。その後、マイクロデバイスを 37°C で 1 時間インキュベートした。Luciferin IPA を含む培地を 2 つのウェルから 25 μ L ずつ回収し、白色 96 ウェルプレート (White Microwell SI; Thermo Fisher Scientific) に計 50 μ L 加えた。そこに 50 μ L P450-Glo Reagent を加え、28°C で 20 分間インキュベートした。Synergy™ HTX Microplate Reader (Biotek) を用いて、RLU を計測した。ウェル中の細胞の総タ

ンパク質量により、RLU の値を標準化した。

2.4.5. 細胞のタンパク質の回収と定量

マイクロデバイスの各ウェルで培養した細胞のタンパク質を回収した。ウェルから細胞を 1.5 mL チューブに回収した。細胞を回収した 1.5 mL チューブを $3,000 \times g$ で 3 分間遠心し、上清を除去した。細胞を氷冷した D-PBS で洗浄し、氷冷した $1 \times$ RIPA buffer (Cell Signaling Technology) を加えた。氷上で 30 分間処理した後、US-1R cleaner (AS ONE) を用いて、氷水中で 1 分間ソニケーションした。ソニケーション後のチューブを $10,000 \times g$ 、 4°C で 20 分間遠心した。上清を新しい 1.5 mL チューブに回収し、 -20°C で保存した。

タンパク質の定量のため、BCA protein kit (TaKaRa) を用いた。回収したタンパク質溶液と working solution (BCA reagent A:B = 100 :1) を混合した。その後、 37°C で 60 分間インキュベートした後、SynergyTM HTX Microplate Reader を用いて 562 nm の波長で吸光度を測定し、溶液中のタンパク質濃度を計算した。

2.4.6. マイクロデバイスで培養した細胞の total RNA の精製と定量

マイクロデバイスで培養している細胞もしくは第 2 章 4.1 項の手法により分取した細胞の total RNA を RNeasy micro Kit (Qiagen) を使用して精製した。D-PBS で洗浄した細胞を 2-mercaptoethanol を加えた buffer RLT Plus で細胞を溶解した。そこに 70% エタノール溶液を等量加え、スピнкаラムに加え、 $8,000 \times g$ で 15 秒間遠心した。さらに、RW.1 solution をスピнкаラムに加え、 $8,000 \times g$ で 15 秒間遠心した。Buffer RDD に溶解した DNase をスピнкаラムに加え、 25°C で 15 分間静置した。再度、RW.1 solution をスピнкаラムに加え、 $8,000 \times g$ で 15 秒間遠心した。RPE solution をスピнкаラムに加え、 $8,000 \times g$ で 15 秒間遠心し

た。さらに、80 % エタノール溶液を加え、 $8,000 \times g$ で 2 分間遠心した。 $15,000 \times g$ で 5 分間遠心した後、RNase free water を加えて、 $8,000 \times g$ で 2 分間遠心することで total RNA を溶出した。RNA-seq のライブラリー調整には、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) と RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies) を用いて解析した時に、RNA Integrity Number が 8 以上の total RNA のみを使用した。

2.4.7. RNA-seq

京都大学大学院 生命科学研究科の生命動態共用研究施設において、RNA-seq を行った。NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina と NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module を用いて、total RNA から poly A 配列を有する RNA を分離した上で、ライブラリーを調整した。さらに Qubit Fluorometer (Thermo Fisher) と Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて、調整したライブラリーの定量と定性を行った。その後、NextSeq 500 を用いてライブラリーのシーケンスを取得した。取得したシーケンス解析に当たって、Cutadapt (ver. 3.1) を用いて、poly G 配列を有するリードを消去した。HISAT2 (ver. 2.2.1) (54) を用いて、処理済みのシーケンスデータをヒトゲノム (GRCh38) に、マッピングした。SAMtools (ver. 1.13) により、リードカウントデータを出力し、iDEP (ver. 94) (55) により解析した。Metascape(56)を用いて GO 解析をした。

2.4.8. RT-qPCR

2 章 4.6 項の手法で total RNA を精製した。cDNA を作製するため、total RNA 12 ng を PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time; TaKaRa)、滅菌蒸留水と混合し、37 °C で 15 分間逆転写し、85 °C で 5 秒間静置した。2.5 ng の作成した

cDNA に対して 12.5 μ L の SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)、0.5 μ L の ROX Reference Dye (TaKaRa)、4 μ L の 10 μ M フォワード/リバープライマー(表 3)、7.5 μ L の滅菌蒸留水を混合し、qPCR 用プレートに分注した。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて qPCR を行った。

2.4.9. ELISA

交換してから 24 時間後の培地を回収し、-25 °C で保存した。回収した培地中の ALB、HGF、MMP9 の量を計測するため Human ALB EIA Kit (MK132; TaKaRa)、Human HGF Quantikine enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA; DHG00B; R&D systems)、Human MMP-9 Sandwich ELISA Kit (KE00164; Proteintech) を使用した。抗体がコートされたマイクロプレートに回収した培地を入れ、37 °C で 2 時間インキュベートした。培地を除去し、wash buffer で洗浄した後、Detection Antibody solution を入れ、37 °C で 1 時間インキュベートした。Wash buffer による洗浄後、Streptavidin-HRP 溶液を入れ、37 °C で 40 分間インキュベートした。Wash buffer による洗浄後、TMB substrate solution を入れ、20 分間インキュベートした。さらに、Stop Solution を加えた後に、Synergy™ HTX Microplate Reader を用いて、450 nm の波長で吸光度を測定し、培地中の ALB、HGF、MMP9 濃度をそれぞれ算出した。

2.5. 統計解析

R software (ver. 4.0.2) を用いて、一元配置分散分析として Tukey's test と二元配置分散分析として Welch's test を行った。Microsoft Excel を用いて、Two-tailed, unpaired Student's *t*-test を行った。

第 3 章 結果

3.1. マイクロデバイスとヒト ES 細胞の解析

3.1.1. マイクロデバイスの PDMS 膜は円蓋状に変形した

開発したマイクロデバイス（**図 3-1A**）の断面を SEM により観察した（**図 3-1B**）。3D プリンターを用いて、マイクロデバイスの鋳型を作製したため、設計図と比較すると流路やチャンバーの断面は長方形ではなく、角が丸みを帯びていた（**図 3-1B**）。画像（**図 3-1B**）を基に PDMS 膜の厚さを測定した結果、 $140.0 \pm 2.6 \mu\text{m}$ ($n=3$) であった。PDMS 膜の変形の観察のため、加圧層を一部切除し、スパッタリング処理により白金で表面を被覆した。マイクロデバイスのインレットから加圧すると、PDMS 膜は円蓋状に変形した（**図 3-1C**）。この時、接合部から空気の漏れはなかった。

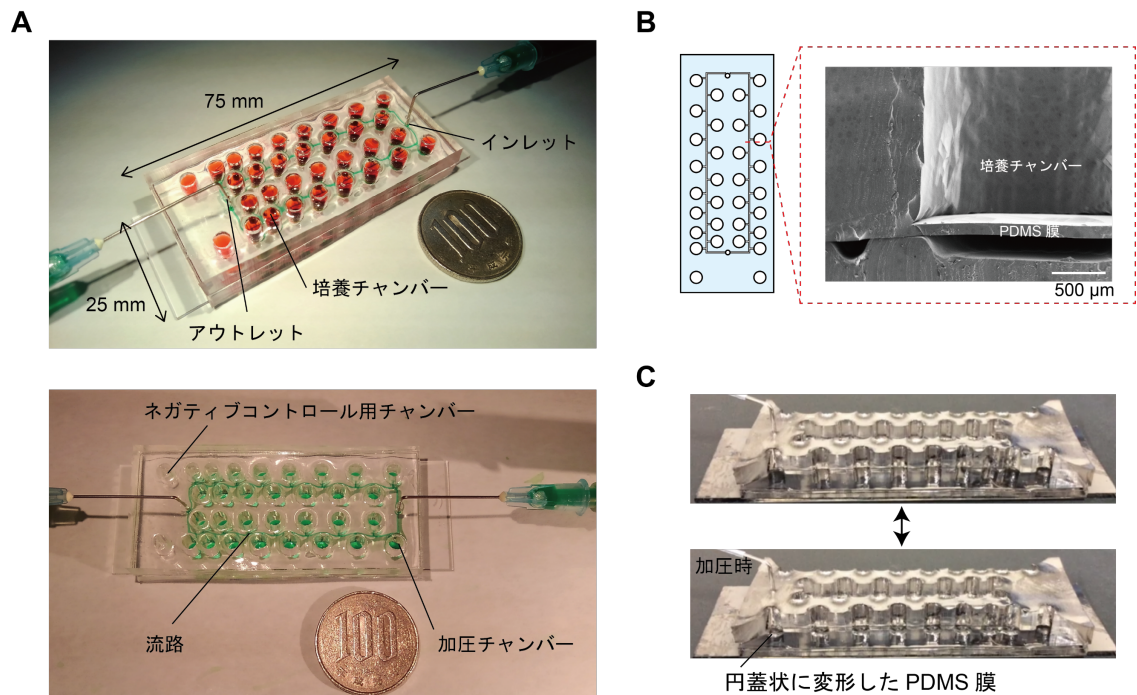


図 3-1 作製したマイクロデバイス。(A) 上段の写真では培養チャンバーを赤のインク、流路を緑のインクで満たしている。下段の写真では流路のみを緑のインクで満たしている。(B) SEM により、観察したマイクロデバイスの断面。(C) インレットへの加圧により円蓋状に変形する PDMS 膜。

次に、マイクロデバイスのインレットに加圧可能な圧力を測定した。コンプレッサーを接続した controller board、NI USB-6501、圧力制御電磁弁からマイクロデバイスのインレットに加圧可能な最小の圧力は 18 kPa だった。一方、45 kPa 以下では設計通りにマイクロデバイスは作動した。この圧力範囲で加圧した時の各チャンバー上の PDMS 膜の中心の厚さ方向への変位を CCD レーザ変位計で測定した。測定結果のうち、加えた圧力が 18 kPa、32 kPa、45 kPa の時の変位を図示した (図 3-2A)。各加圧条件において、インレットからの距離に負の相関を示して、PDMS 膜中心の厚さ方向への変位は小さくなった。このことから、マイクロデバイス内の流路を空気が通過する際に、圧力降下が生じていると考えられる。また、異なる加圧条件で、同じチャンバーにおける PDMS 膜中心の厚さ方向への変位は小さくなった。これは PDMS が非線形弾性体であるためだと考えられる。一元配置分散分析として Tukey's test を行い、変位に有意差 ($P < 0.05$) が確認されたチャンバーについて、マイクロデバイス上で可能な限り多くの条件を含む組み合わせを選定し (図 3-2A: 赤色で示す条件のチャンバー)、ヒト ES 細胞から肝芽細胞への分化誘導に使用した。

さらに、マイクロデバイスへ 45 kPa 加圧した際、PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が 0.58 mm であるウェルの膜上で培養した Caco-2 細胞を観察した (図 3-2B と C)。PDMS の変形時も Caco-2 細胞は接着しており、細胞にひずみが生じた。

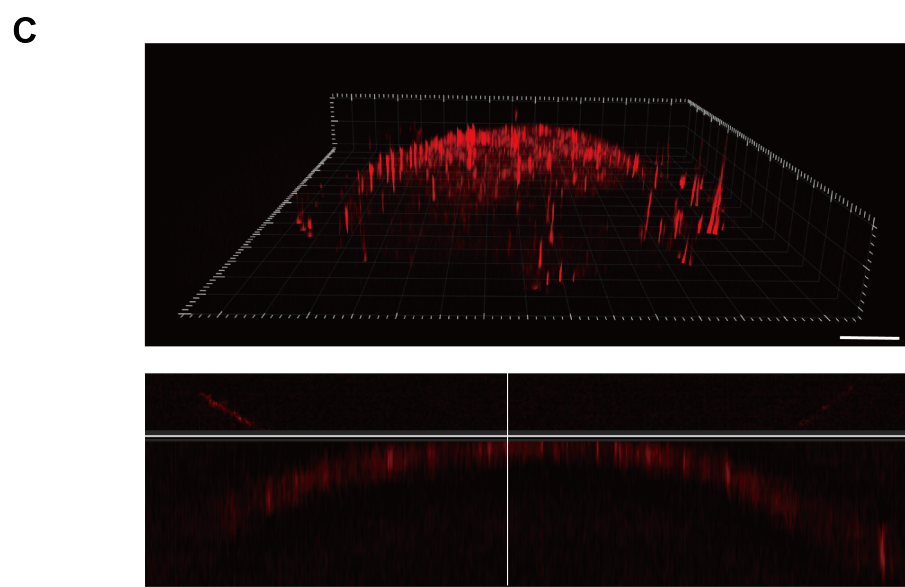
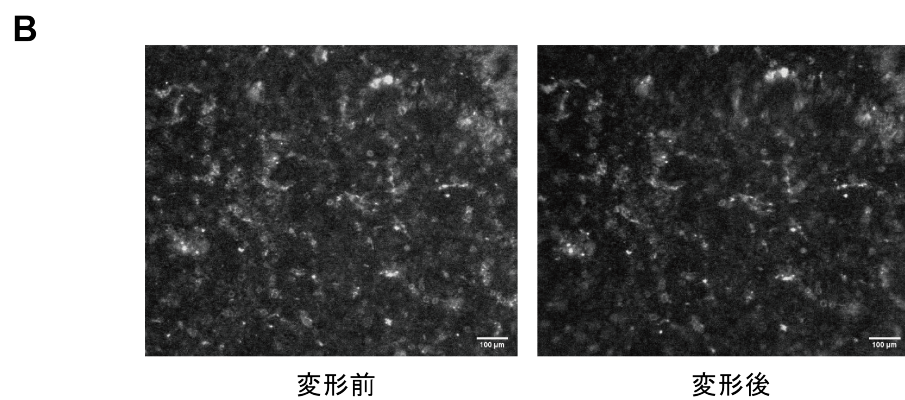
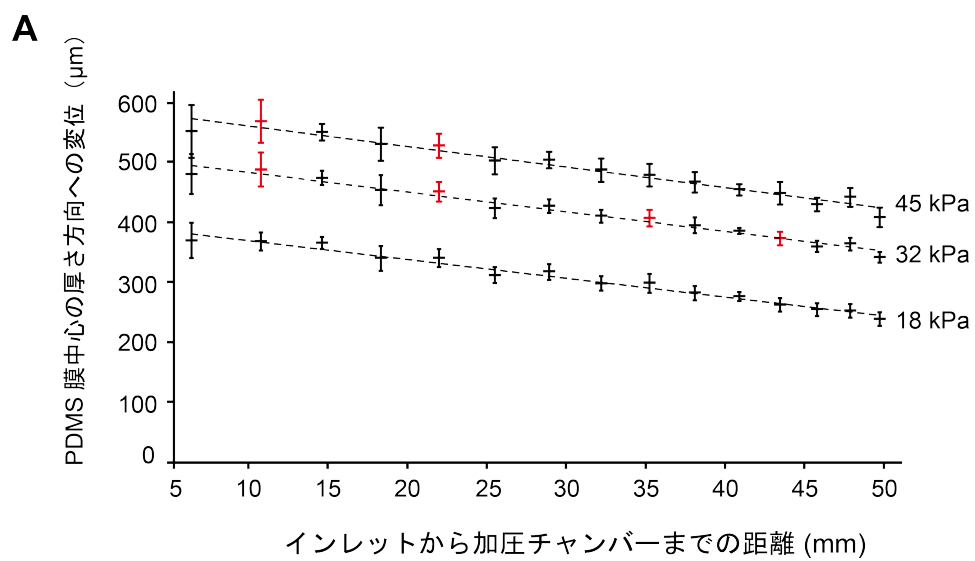


図 3-2 マイクロデバイスにおける PDMS 膜の解析 **(A)** 加圧時 (18、32、45 kPa) の各加圧チャンバー上の PDMS 膜の中心の厚さ方向への変位を CCD レーザ変位計により測定した。一元配置分散分析として Tukey's test を行い、18、32、45 kPa における全ての変位を比較した。赤色で示す条件のチャンバーを細胞培養に用いた。各プロットは、1 つのデバイスで 2 つのチャンバーにおける PDMS 膜中心の厚さ方向への変位を測定し、独立した 4 回の実験の平均値とその標準偏差 (SD) を示している。**(B)** PDMS 膜変形に伴って変形する Caco-2 細胞。スケールバー: 100 μm 。**(C)** PDMS 膜変形時の Caco-2 細胞を共焦点顕微鏡で観察した。スケールバー: 400 μm 。

3.1.2. 変形した PDMS 膜では位置依存的なひずみが生じた

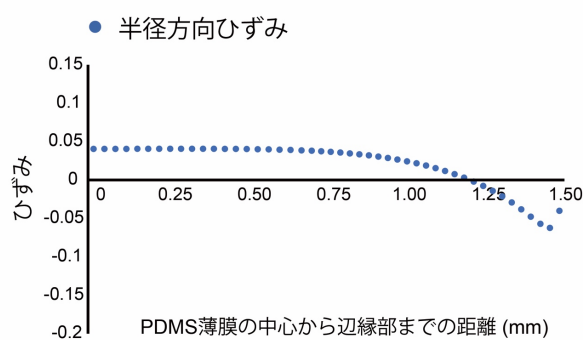
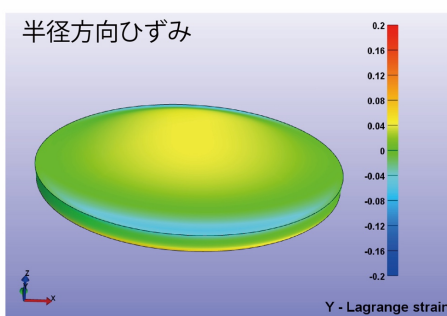
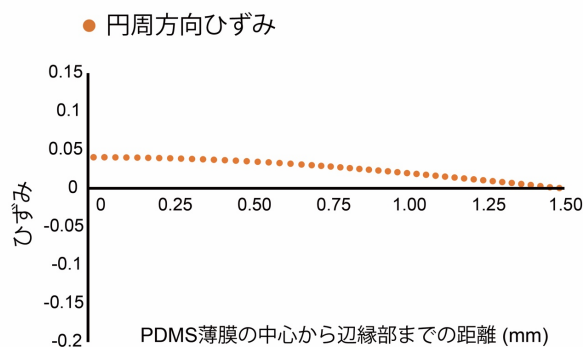
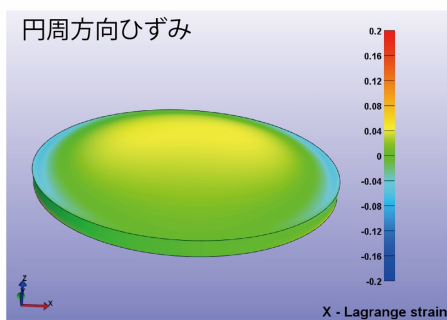
加圧時に PDMS 膜上の細胞に生じるひずみを予測するため、3 章 1.1 項で測定して得られた値を用いて、円蓋状に変形した PDMS 膜の面内ひずみを有限要素解析した。

マイクロデバイスへの加圧時、PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が最も小さい 0.28 mm の時の円周方向へのひずみ、半径方向ひずみを求めた (図 3-3A)。その結果、PDMS 膜中心から辺縁部にかけて、円周方向ひずみは 0.045 から 0 まで単調に減少した。PDMS 膜中心から 0.80 mm 付近まで、半径方向ひずみは 0.045 からほとんど変化しなかった。膜中心から 0.80 mm 付近から 1.20 mm 付近まで、半径方向ひずみは 0.045 から 0 まで単調に減少した。PDMS 膜中心から 1.20 mm 付近から辺縁部まで、半径方向ひずみは 0 から -0.075 まで減少し、負のひずみを生じていた。

同様に、PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が最も大きい 0.58 mm の時のひずみを求めた (図 3-3B)。PDMS 膜中心から辺縁部にかけて、円周方向ひずみは 0.11 から 0 に単調に減少した。PDMS 膜中心から 1 mm 付近にかけて、半径方向ひずみは、0.12 からほとんど変化しなかった。膜中心から 1.0 mm 付近から 1.3 mm にかけて、半径方向ひずみは 0.12 から 0 まで単調減少した。さらに、膜中心から 1.3 mm より外側では、半径方向ひずみは 0 から -0.15 まで減少し、負のひずみが生じていた。PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が 0.28 mm から 0.58 mm に変化すると、膜中心から 1.25 mm 付近で、円周方向ひずみと半径方向ひずみの大きさが等しくなる地点が、膜中心から辺縁部へ移動した。これは、PDMS 膜が非線形弾性体であることが原因だと考えられる。

このように、変形した PDMS 膜上において、生じるひずみは膜中心からの距離に依存して変化し、位置依存的である。

A



B

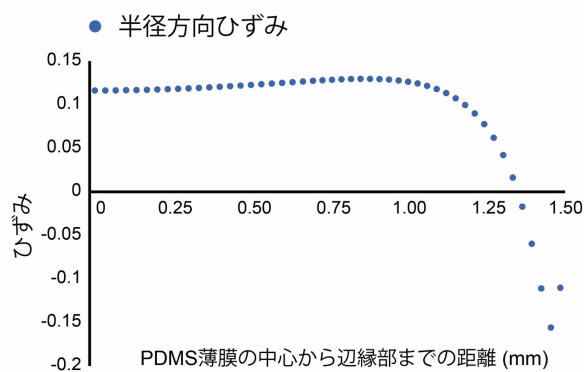
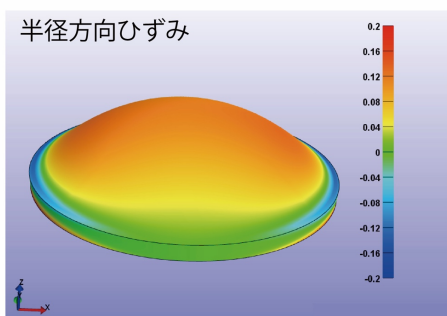
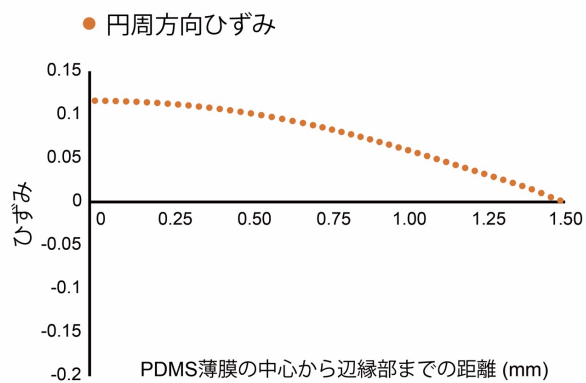
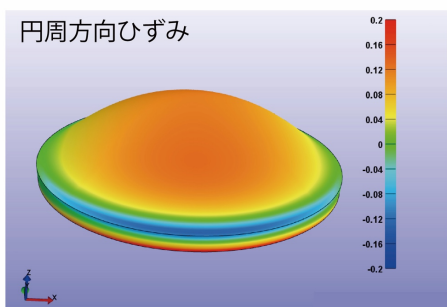


図 3-3 マイクロデバイスの PDMS 膜上で生じるひずみについてのシミュレーション。(A) PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が 0.28 mm の時の PDMS 膜上の円周方向ひずみと半径方向ひずみを図示したグラフ。(B) PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が 0.59 mm の時の PDMS 膜上の円周方向ひずみと半径方向ひずみを図示したグラフ。

3.1.3. 維持培養したヒト ES 細胞は多能性維持していた

本研究で用いたヒト ES 細胞が多能性を維持していることを確認するため、多能性細胞表面マーカーの SSEA4、TRA-1-60、分化細胞表面マーカーの SSEA1 を用いて(37, 57)、フローサイトメトリーを行った。SSEA4 陽性は $99.8 \pm 0.08\%$ 、TRA-1-60 陽性は $92.2 \pm 0.79\%$ 、SSEA1 陽性は $3.9 \pm 0.75\%$ であった (図 3-4A)。さらに免疫細胞染色により、多能性マーカーの OCT4 と NANOG の発現(11, 37)を観察した結果、未分化ヒト ES 細胞の全ての細胞が陽性であったが、ヒト ES 細胞から分化誘導した D6 の胚性内胚葉細胞はほとんどが陰性であった (図 3-4B)。以上から、使用したヒト ES 細胞は多能性を維持していた。

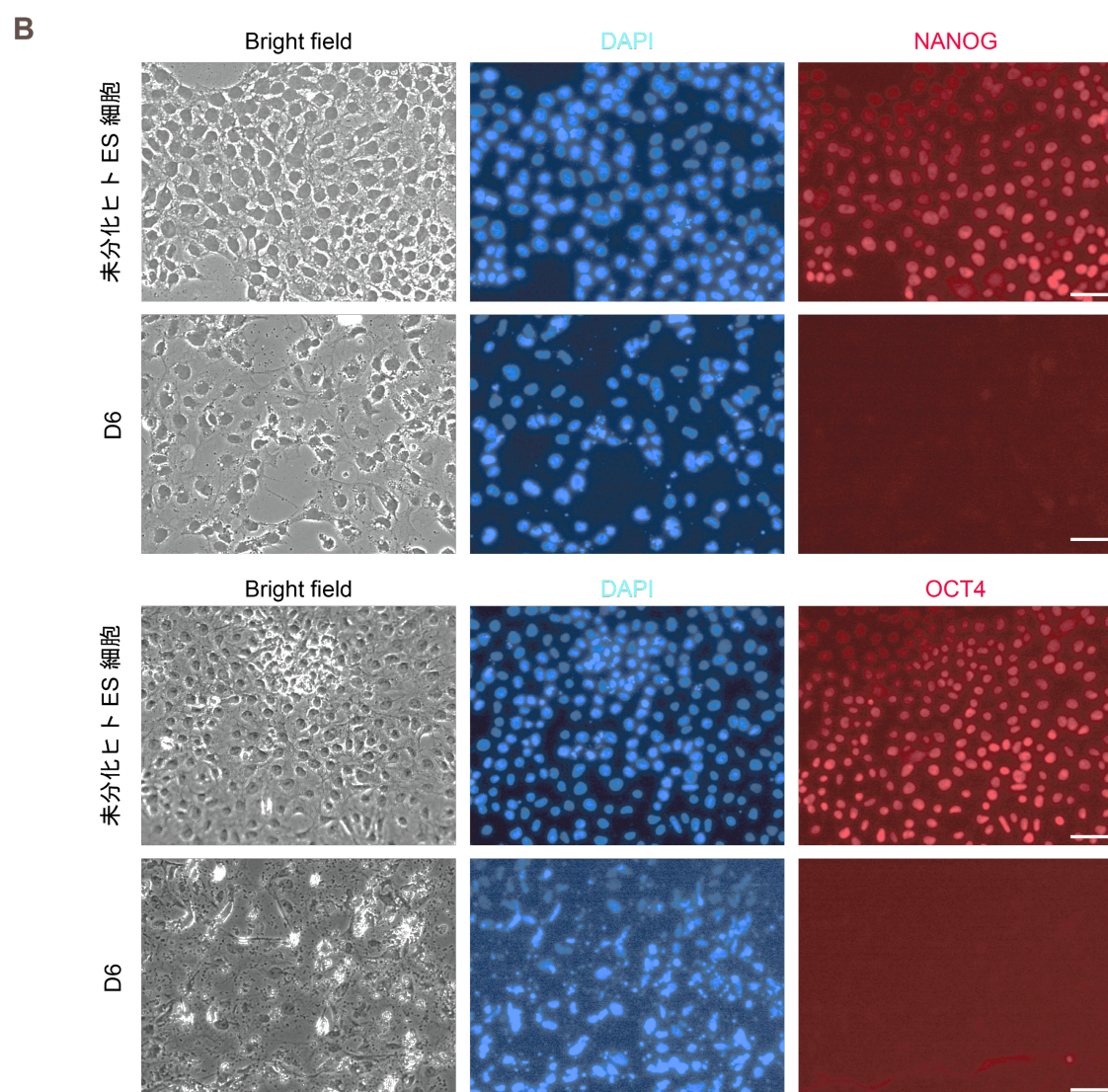
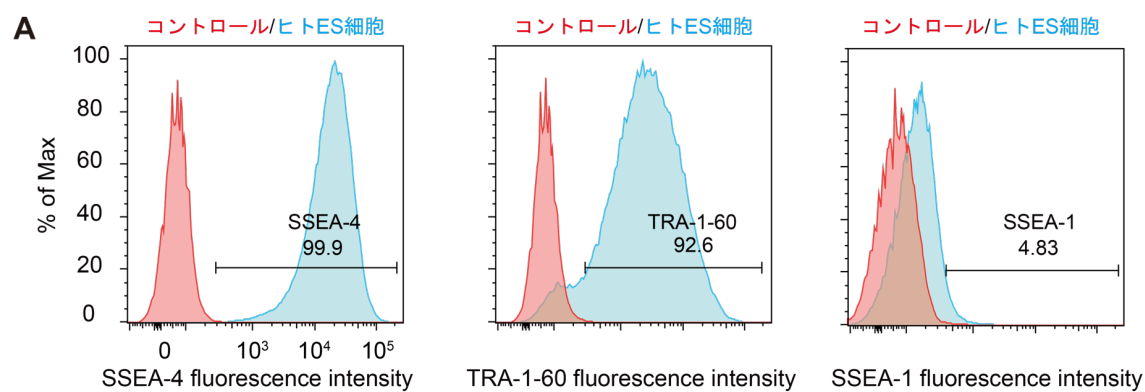


図 3-4 培養したヒト ES 細胞の多能性解析 (**A**) フローサイトメトリーを用いて解析した未分化ヒト ES 細胞の SSEA4、SSEA1、TRA-1-60 陽性細胞比率。(**B**) 免疫細胞染色した未分化ヒト ES 細胞とヒト ES 細胞から分化した胚性内胚葉細胞 (D6) の OCT4 と NANOG (赤)、核 (DAPI、青)。スケールバー: 50 μm 。

3.2. マイクロデバイスにおける肝芽細胞への分化誘導

3.2.1. 細胞外マトリックス Matrigel と ROCK 阻害剤は接着分化誘導を可能とした

開発したマイクロデバイスの PDMS 膜上において、ヒト ES 細胞から肝芽細胞へ分化誘導条件を検討した。本研究では、先行研究の分化誘導法(51)を初めに用いた。細胞培養ディッシュ上において、ヒト ES 細胞から肝芽細胞へ接着分化誘導した先行研究と同様に、PDMS 膜をゼラチン溶液によりコーティングし、接着分化誘導を試みたが、培養 2 日目 (D2) には PDMS 膜から細胞が遊離した (図 3-5A)。

この問題を解決するために、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの各細胞外マトリックスを含有する Matrigel を用いて、PDMS 膜をコーティングした。その結果、ゼラチン溶液によるコーティング時に生じた細胞遊離は抑制された。Matrigel コーティングした PDMS 膜上で、先行研究(51)と同様の培地を用いて分化誘導を行ったところ、肝芽細胞を誘導する前の D5 において、細胞が PDMS 膜から遊離した (図 3-5B)。

そこで、細胞遊離を抑制するために、細胞運動を抑制する ROCK 阻害剤 Y27632 (2)を培地中に 10 μ M 添加した。Y27632 を添加することにより、Matrigel でコーティングした PDMS 膜上では、D5 時点の細胞遊離は抑制された (図 3-5B)。一方、ゼラチン溶液でコーティングした PDMS 膜上では、Y27632 を添加しても、細胞遊離は抑制されなかった。また、D6 において、Y27632 非添加培地に交換すると、交換直後に細胞は遊離し、細胞塊を形成した (図 3-5C)。したがって、細胞を PDMS 膜上に安定に接着させるためには、Matrigel コーティングと Y27632 の継続的添加が必要である。以上のように、先行研究(51)の分化方法を改善することで、マイクロデバイスの PDMS 膜上において、ヒト ES 細胞の接着分化誘導の条件を確立した (図 3-5D)。

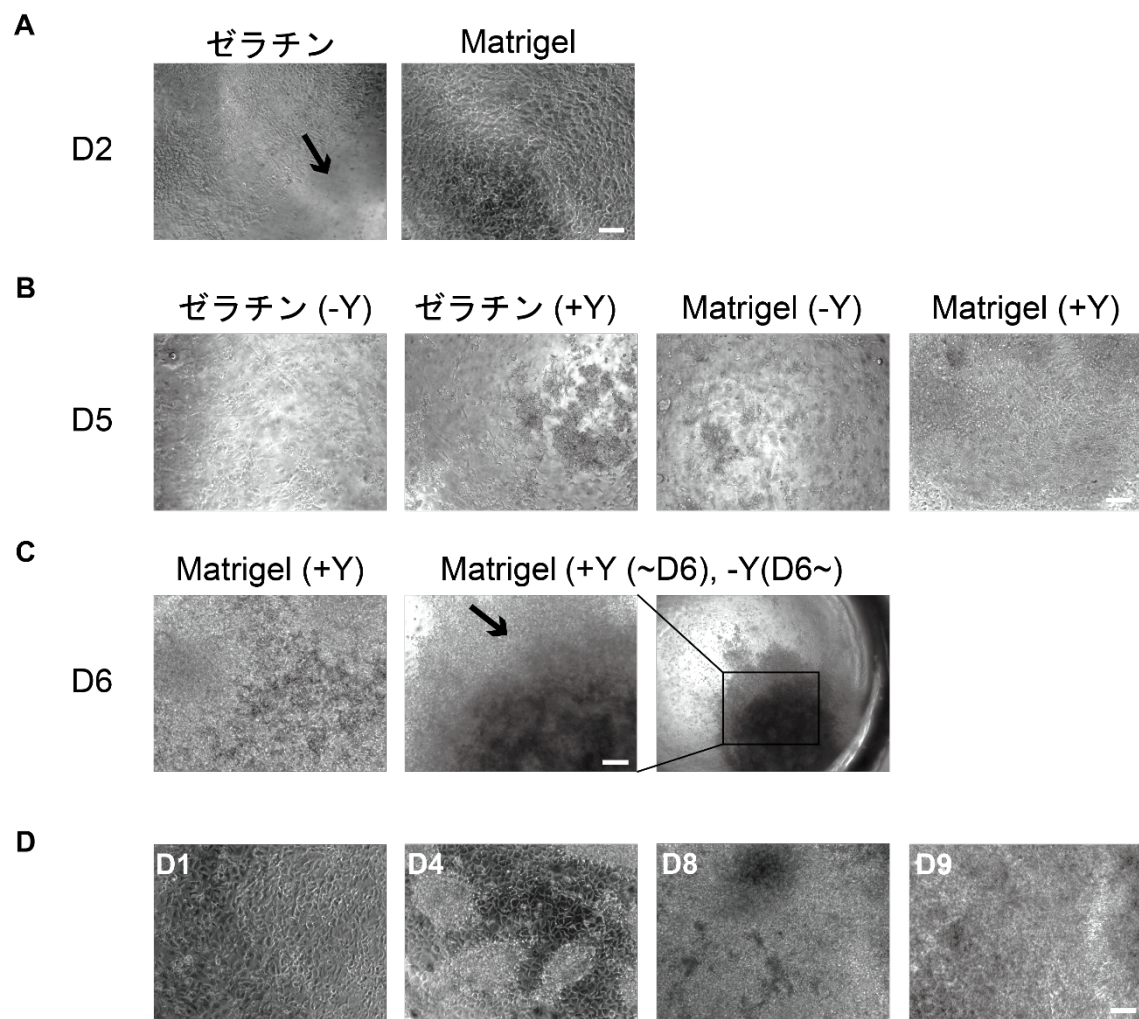


図 3-5 マイクロデバイス上でのヒト ES 細胞から肝芽細胞への分化誘導条件の検討。(A) ゼラチンコーティングした PDMS 膜上では、D2 において細胞の剥離が観察された。矢印は細胞の遊離した箇所を示している。(B) ゼラチンコーティングした PDMS 膜上や Y27632 (Y) を使用していない培養チャンバーでは、D5 において殆どの細胞が遊離した。Matrigel と Y27632 (Y) を使用したチャンバーでは細胞遊離が抑制された。(C) D6 の途中で Y27632 を中断すると培地交換直後に細胞は遊離した。(D) Matrigel と Y27632 を使用して、ヒト ES 細胞から分化誘導した D1、D4、D8、D9 の細胞を顕微鏡により観察した。スケールバー: 100 μm 。

3.2.2. 分化誘導 6 日目の細胞は胚性内胚葉細胞マーカーを発現していた

D6 にヒト ES 細胞から胚性内胚葉細胞を誘導したことを確認するため、胚性内胚葉細胞のマーカータンパク質である転写因子の SOX17、ケモカインレセプターの CXCR4 を免疫細胞染色法とフローサイトメトリーにより解析した(51, 58) (図 3-6)。その結果、未分化ヒト ES 細胞は、SOX17 を全ての細胞において発現していなかった。一方、マイクロデバイス上で分化誘導した細胞は SOX17 を発現していた (図 3-6A)。さらに、フローサイトメトリー解析において、先行研究(51)の手法により分化誘導した胚性内胚葉細胞と比較した結果、先行研究と同様に、マイクロデバイス上で分化誘導した細胞の 99.0%以上は CXCR4 を発現していた (図 3-6B)。未分化ヒト ES 細胞は、CXCR4 を発現していなかった。

以上から、改善した分化誘導条件のもと、マイクロデバイス上でヒト ES 細胞から胚性内胚葉細胞へ分化していることを確認した。

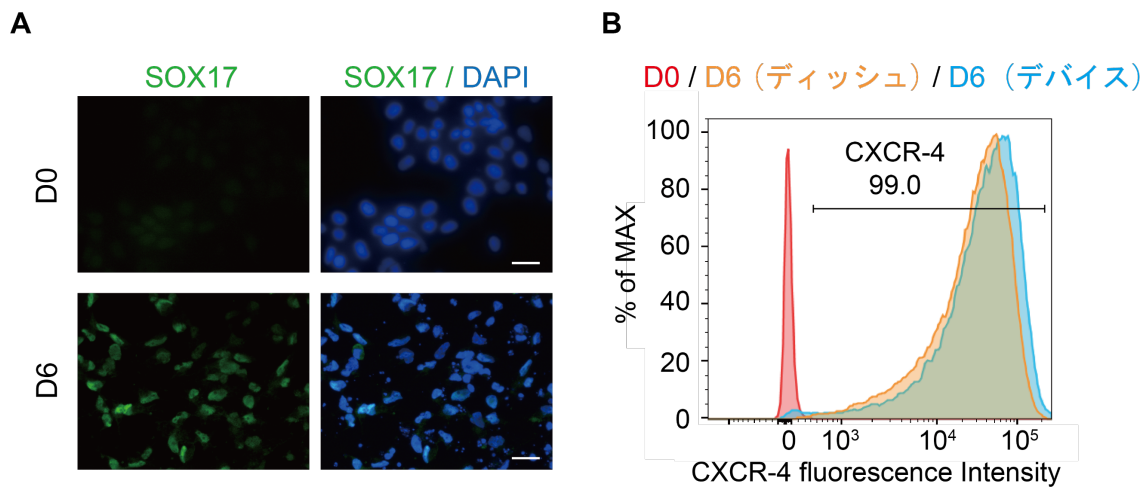


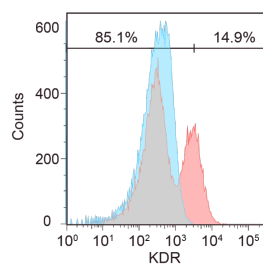
図 3-6 ヒト ES 細胞と分化誘導した D6 の細胞における胚性内胚葉細胞マーカーの発現。(A) ヒト ES 細胞とマイクロデバイス上で分化誘導した D6 細胞における SOX17 (緑) および核 (DAPI, 青) を免疫細胞染色により観察した。スケールバー: 50 μ m。(B) 未分化ヒト ES 細胞 (D0)、細胞ディッシュ上で先行研究の手法により分化誘導した D6 細胞、マイクロデバイス上において分化誘導した D6 細胞の CXCR4 を発現している細胞比率をフローサイトメトリーにより解析した。

3.2.3. KDR 陽性・陰性の肝芽細胞を分化誘導した

マイクロデバイス上で胚性内胚葉細胞を分化誘導した細胞の肝芽細胞マーカーの発現を確認した。肝芽細胞は、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞に分類されることが報告されている(25, 26)。これを確認するため、D9 の細胞を回収し、KDR 抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。その結果、得られた細胞において 85.1%が KDR 陰性、14.9%が KDR 陽性だった (図 3-7A)。

次に、KDR 陰性細胞と KDR 陽性細胞において、肝芽細胞マーカーである KRT19、FOXA2、HHEX、SOX17、HNF4 α の発現を比較したところ、KDR 陰性細胞は、これらのマーカーをより強く発現していた (図 3-7B)。

A



B

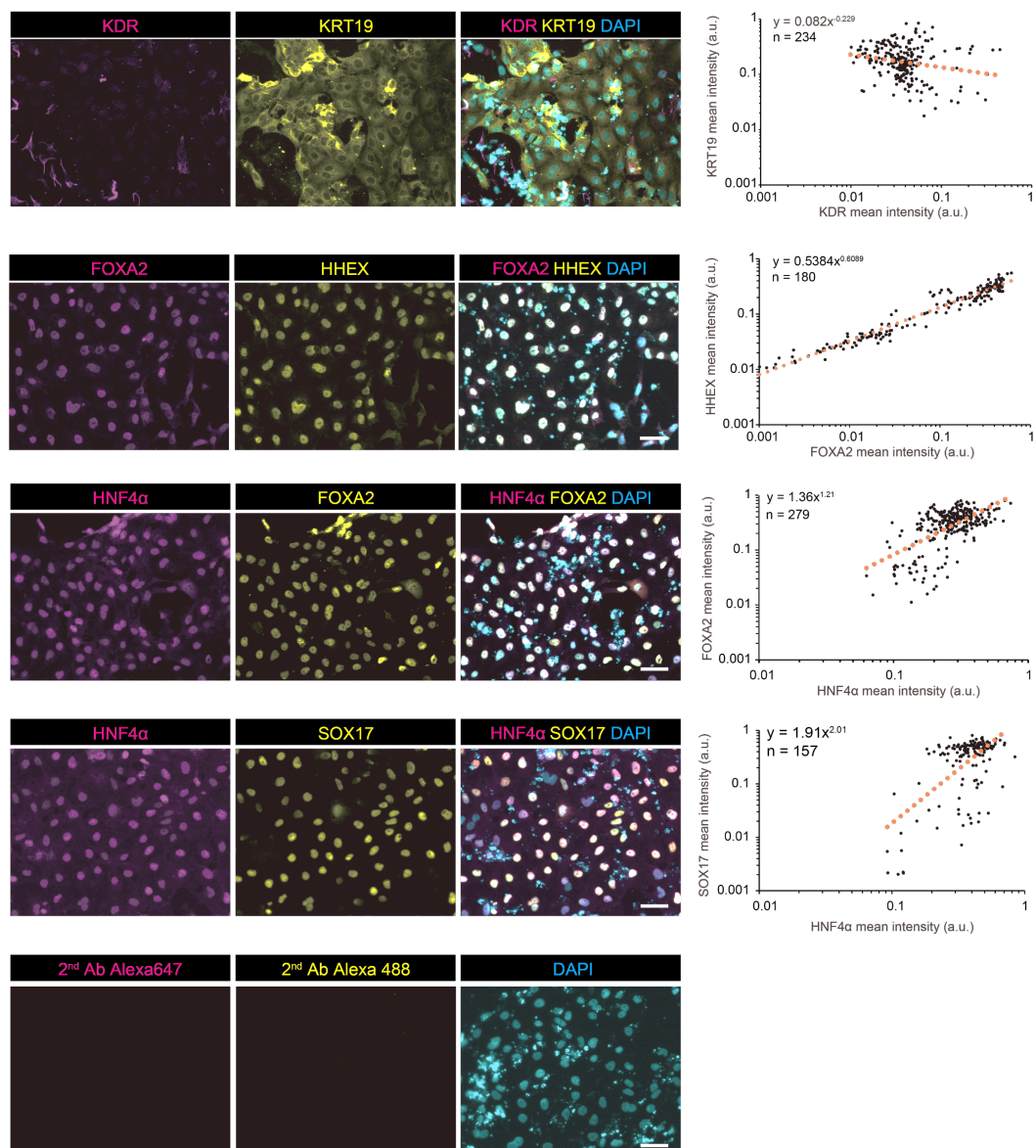


図 3-7 ヒト ES 細胞から分化誘導した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞から構成される D9 時点の細胞。(A) マイクロデバイス上で分化誘導したヒト ES 細胞由来の D9 時点の細胞における KDR 発現を示すフローサイトメトリー解析。(B) D9 時点の細胞において、肝芽細胞マーカー (KRT19、黄; FOXA2、マゼンタと黄; HHEX、黄; HNF4 α 、マゼンタ; SOX17、黄)、KDR (マゼンタ)、核 (DAPI、シアン) を染色した D9 時点の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー: 100 μm 。さらに、観察した細胞の蛍光強度を解析し、定量的 1 細胞プロファイリングの結果を図示した。

また、D9 時点における、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、肝芽細胞および血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現量を評価するため、KDR 抗体を用いてフローサイトメトリーにより細胞を分取した後、それぞれの細胞から RNA を回収し、RT-qPCR 解析を行った。KDR 陽性細胞は、 $13.9 \pm 1.4\%$ であり（**図 3-8A**）、KDR 陽性細胞の 13.6%は血管内皮細胞マーカーである CD31 を細胞表面に発現していなかった（**図 3-8B**）（27, 59）。

未分化 ES 細胞と比較して、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞のいずれにおいても、肝芽細胞マーカーの *KRT19*、*FOXA2*、*SOX17*、*HHEX*、*HNF4A* の遺伝子を有意に高く発現していた。また、KDR 陽性細胞と比較した時、KDR 陰性細胞は、*KRT19*、*FOXA2*、*SOX17* の遺伝子を有意に高く発現していた（**図 3-8C**）。一方、KDR 陰性細胞と KDR 陽性細胞の間で、*HHEX*、*HNF4A* の遺伝子発現に有意差は認められなかった。

さらに、本研究で分化誘導により得られた KDR 陽性細胞が血管内皮前駆細胞のような特徴を有するかを確認するため、血管内皮細胞マーカーの *KDR*、*CD31* の遺伝子発現量を測定した。未分化 ES 細胞、KDR 陰性細胞と比較した時、KDR 陽性細胞は、*KDR*、*CD31* の遺伝子を有意に高く発現していた（**図 3-8D**）。一方、未分化 ES 細胞と KDR 陰性細胞間で、*KDR*、*CD31* の遺伝子発現に有意差は認められなかった。

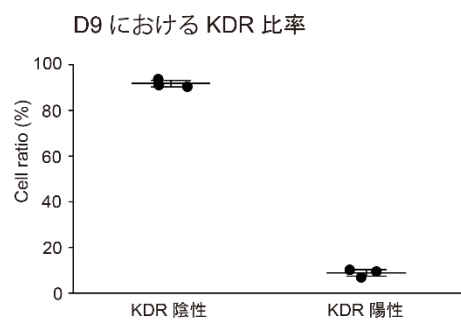
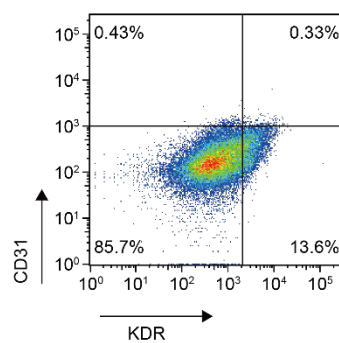
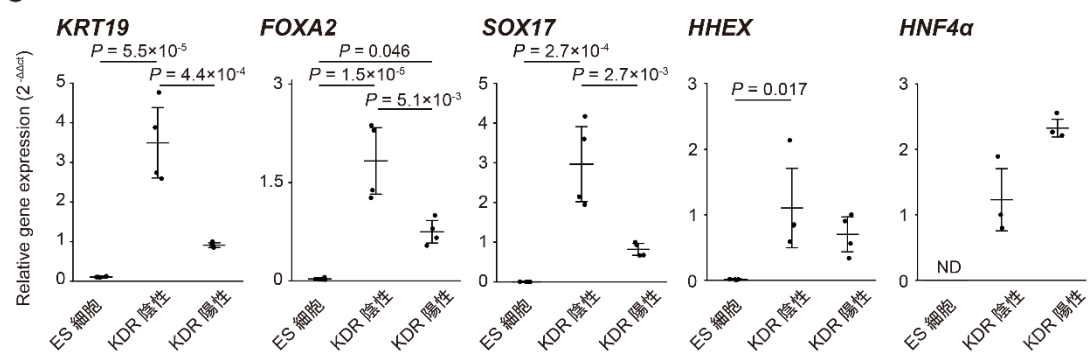
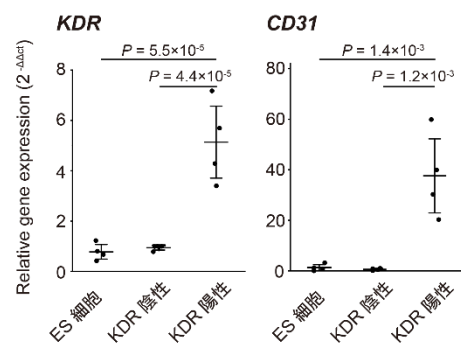
A**B****C****D**

図 3-8 D9 における KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の評価 (A) フローサイトメトリーによる D9 細胞における KDR 陽性細胞比率の解析。データは全て平均値 $\pm$ SD で表現した。(n=3) (B) KDR 抗体と CD31 抗体を用いたフローサイトメトリーによる D9 細胞の解析。(C、D) 細胞分取後の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞における、RT-qPCR による肝芽細胞マーカー (C、*KRT19*, *FOXA2*, *SOX17*, *HHEX*, *HNF4A*) と血管内皮細胞マーカー (D、*KDR*, *CD31*) の遺伝子発現解析。データは全て平均値 $\pm$ SD で表現した。一元配置分散分析として Tukey' test を行い、有意差を算出した (n=4)。

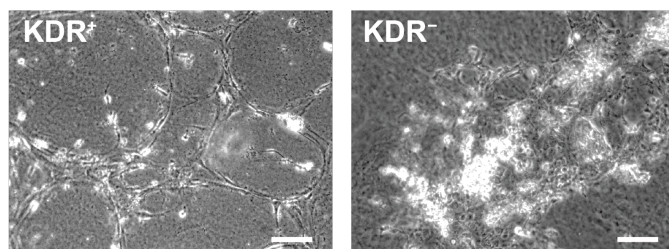
D9 の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の分化能を評価するため、血管内皮細胞と肝実質細胞への分化誘導用培地で、それぞれ培養した。

まず、Geltrex 上で、血管内皮細胞への分化誘導用培地により 48 時間培養し、血管内皮細胞に特徴的な sprouting 網形成能(27)と CD31 の発現評価を行った。KDR 陽性細胞は sprouting 網を形成し (図 3-9A)、CD31 を発現した (図 3-9B)。一方、KDR 陰性細胞は sprouting 網を形成せず (図 3-9A)、CD31 も発現しなかった (図 3-9B)。また、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞を分取し、ヒト間葉系幹細胞とそれぞれ混合し、血管内皮細胞への分化誘導用培地により Geltrex 中で培養した。その結果、KDR 陽性細胞は血管様構造を形成し、CD31 を発現した (図 3-9C)。一方、KDR 陰性細胞は血管様構造を形成せず、CD31 を発現しなかった。

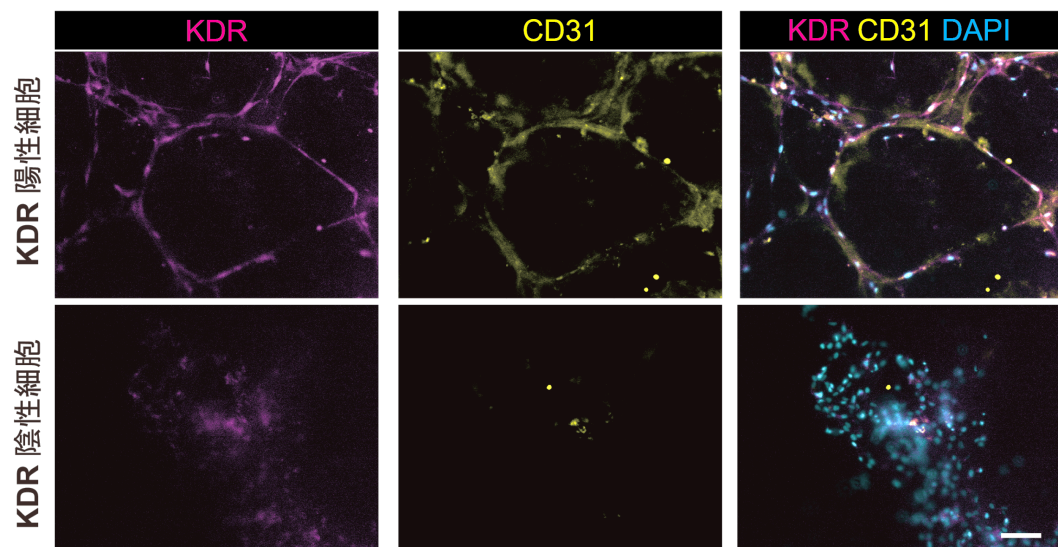
次に、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞をそれぞれ、肝実質細胞への分化誘導用培地を用いて 12 日間培養し、肝実質細胞のマーカータンパク質の AAT、ALB、CYP3A7、CYP3A4 について(11)、免疫細胞染色した (図 3-9D)。KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞のどちらも肝実質細胞マーカーを発現した (図 3-9D)。

以上の結果から、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞は、どちらも肝芽細胞マーカーを発現しており、肝実質細胞へ分化誘導可能であったことから、(28, 55)肝芽細胞であると考えられる。KDR 陽性細胞は、血管内皮細胞マーカータンパク質である CD31 を細胞表面に発現していなかったが、血管内皮細胞マーカー遺伝子レベルは、ES 細胞と KDR 陰性細胞よりも高く、血管内皮細胞へ分化誘導可能であった。そのため、KDR 陽性細胞は血管内皮前駆細胞などの特徴も有すると考えられる。

A



B



C

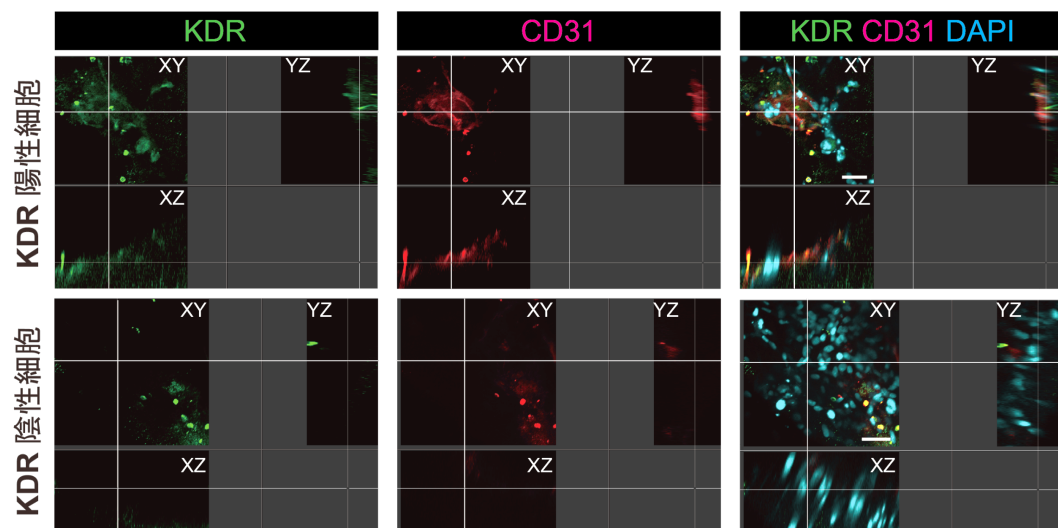


図 3-9 D9 の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の血管内皮細胞への分化能の評価。(A) 細胞分取後の Geltrex 上で KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞を血管内皮細胞へ分化誘導した。スケールバー：100 μm 。(B) 細胞分取後に Geltrex 上で血管内皮細胞への分化用培地で 2 日間培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、血管内皮細胞マーカー (KDR、マゼンタ; CD31、イエロー) および核 (DAPI、シアン) を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー；200 μm 。(C) 細胞分取後に Geltrex 内で間葉系幹細胞と共培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、血管内皮細胞マーカー (KDR、マゼンタ; CD31、イエロー) および核 (DAPI、シアン) を免疫細胞染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー：50 μm 。

D

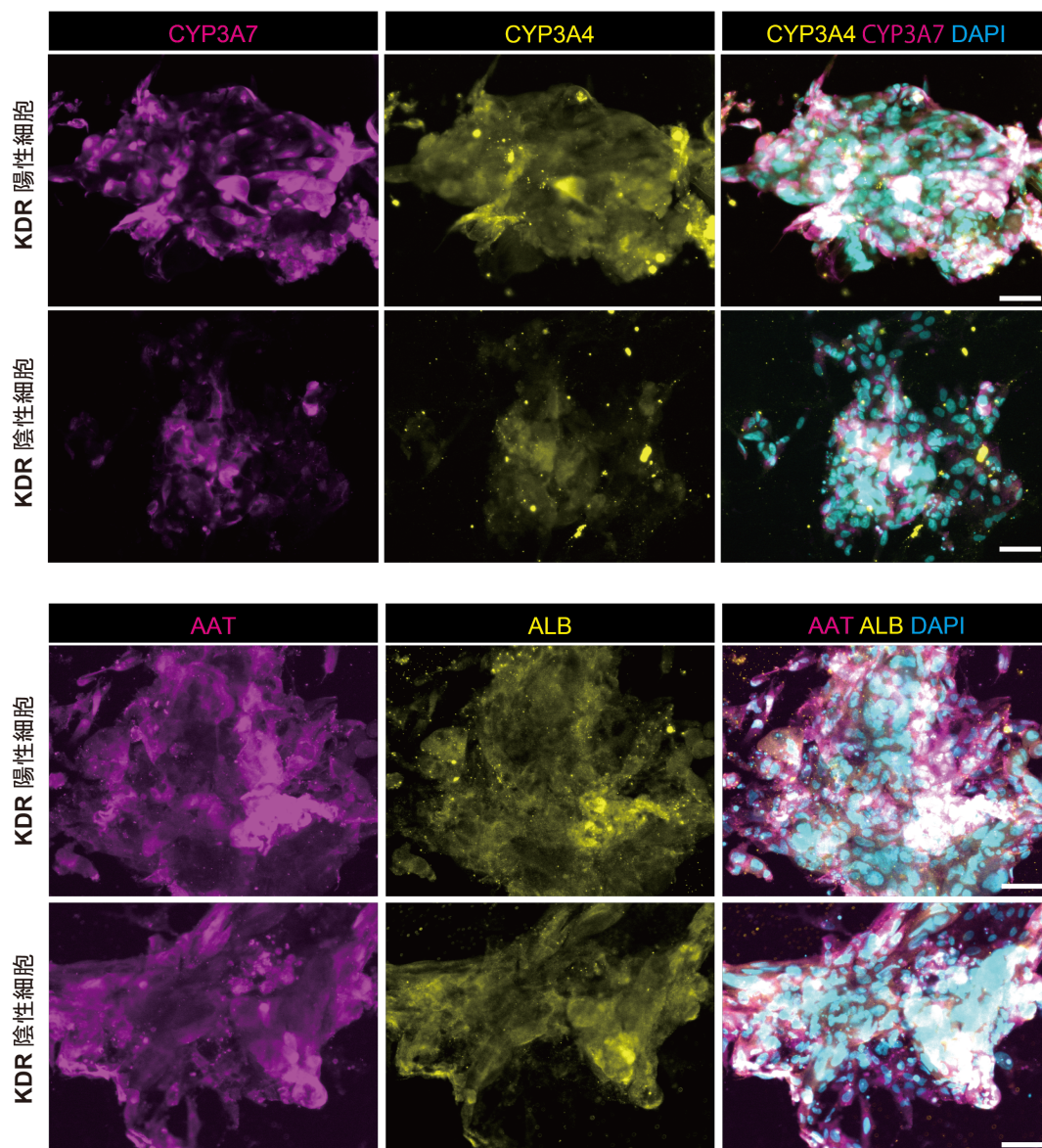


図 3-9 D9 の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の肝实质細胞への分化能の評価。

(D) 細胞分取後、肝实质細胞への分化用培地で 12 日間培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、肝实质細胞マーカー (CYP3A7、マゼンタ; CYP3A4、イエロー; AAT、マゼンタ; ALB、イエロー) および核 (DAPI、シアン) を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー: 100 μm 。

3.3. 伸展刺激が肝芽細胞に与える効果

3.3.1. 伸展刺激は肝実質様細胞への分化を阻害しなかった

伸展刺激が肝芽細胞の分化に与える影響を評価するため、D9、D12 時点の肝芽細胞で活性がみられる CYP3A 活性(11, 16, 60)を測定した (図 3-10)。伸展刺激の条件として、PDMS 膜中心の変位が 0、0.37、0.41、0.45、0.49、0.54、0.58 mm の時の伸展刺激を細胞に 0.1 Hz の周期で与えた。ここで、変位条件が 0.58 mm の周期的伸展刺激を与えた細胞を (0.58) として表記することにする。まず、周期的伸展刺激を加える前の D9 の細胞はほとんど CYP3A の活性を示さなかった。一方、D12 の (0) の CYP3A の活性は、D9 に対して高かった。また、D12 の (0) と比較した時、(0.37)、(0.41)、(0.45) の CYP3A 活性は変化がなかった。しかし、(0.49)、(0.54)、(0.58) の CYP3A 活性は (0) に対して、それぞれ約 1.6、1.8、2.1 倍高かった。以上の結果から、D9 から D12 の培養は肝芽細胞への分化を促進し、変位の大きな周期的伸展刺激は肝芽細胞の分化をより促進する可能性が示唆された。

さらに、周期的伸展刺激が肝芽細胞の分化能に与える影響を評価するため、(0.58) を肝実質細胞へ分化誘導した。分化誘導した細胞に対して、肝実質細胞マーカーとして使用される ALB 分泌量と CYP3A 活性を測定した (図 3-11A)。肝実質細胞へ分化誘導した細胞において、刺激の有無に関わらず、ALB 分泌量と CYP3A 活性は経時的に増加した。ALB 分泌量について、各日、刺激の有無による有意差はなかった。一方、D15 と D23 において、周期的伸展刺激を付与した細胞の CYP3A 活性は、平均 2.4 倍、1.7 倍増加した。また、ALB 分泌量と CYP3A 活性の測定結果に基づき、分泌量と活性が最も高かった D23 において肝実質細胞マーカーを免疫細胞染した (図 3-11B)。ここでは CYP3A のサブファミリーであり、胎児において優勢に発現する CYP3A7 と成体において優勢に発現する CYP3A4(6I)を染色した。さらに、ALB に加えて、分化して初期から発

現する代表的な肝実質細胞である AAT を染色した(11)。その結果、刺激の有無にかかわらず、D23 の細胞は CYP3A7 と CYP3A4 は両方を発現しており、ALB と AAT についても両方陽性であった。この染色結果は、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肝実質細胞を染色した結果と同様であった(15, 58)。以上の結果から、ヒト ES 細胞由来の肝芽細胞への周期的伸展刺激の付与は、肝実質細胞への分化能の阻害に繋がらないと考えられる。

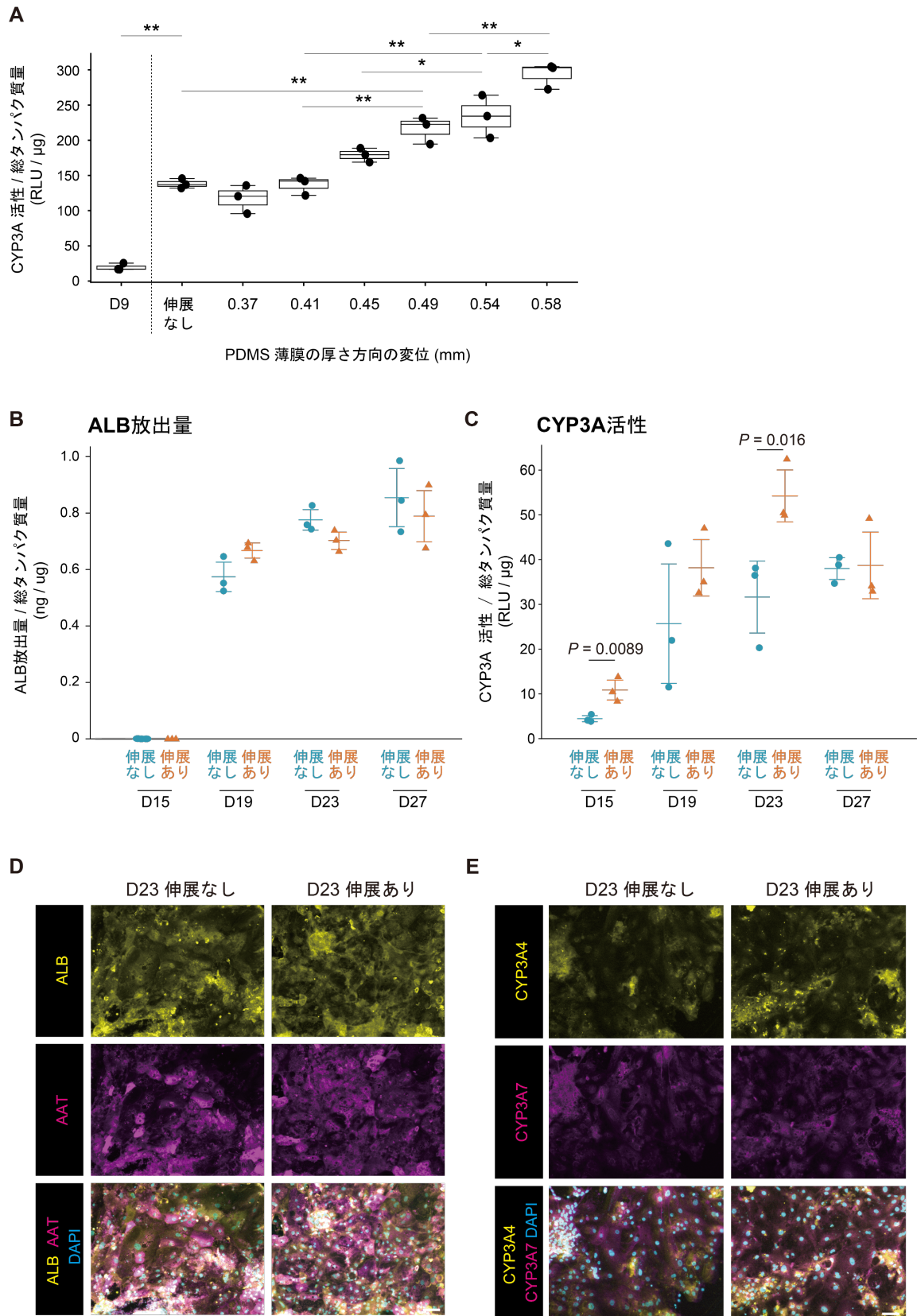


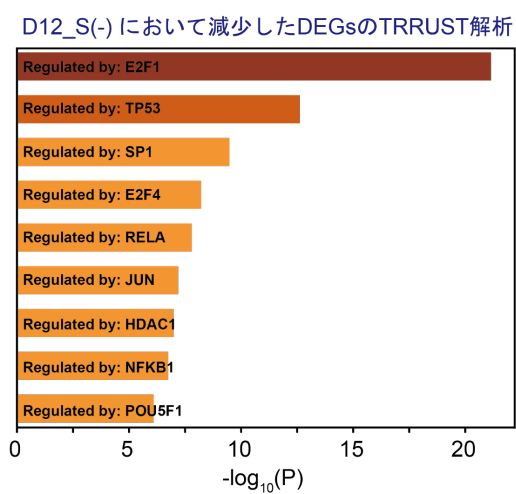
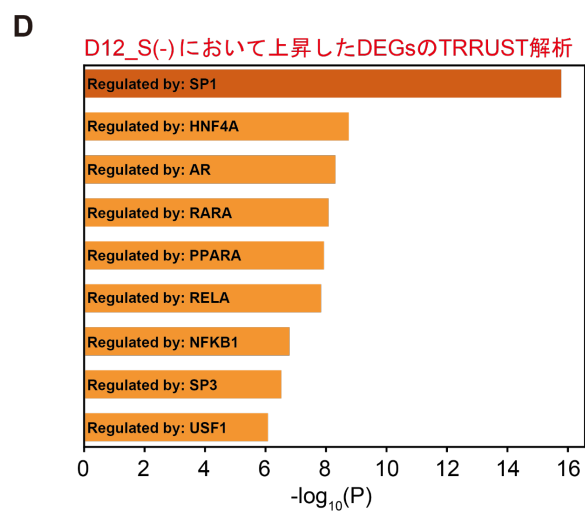
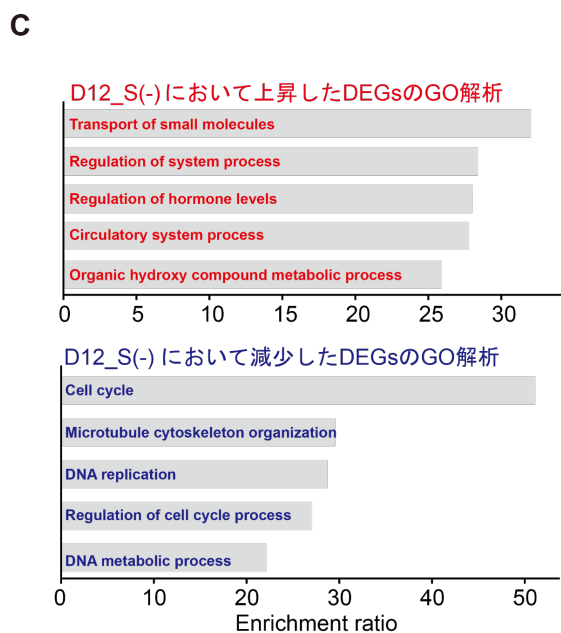
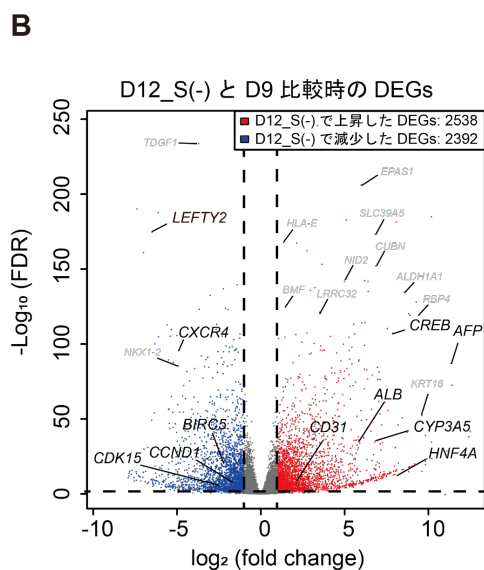
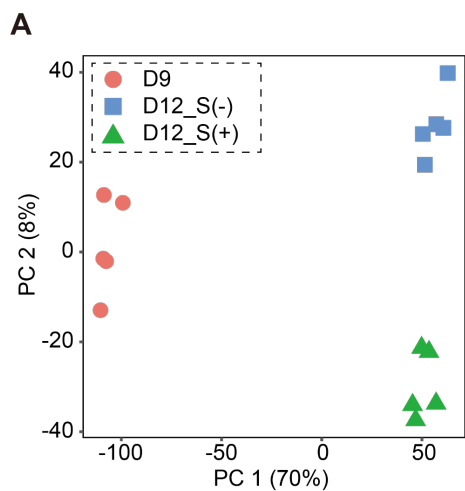
図 3-10 (A) D9 と各伸展刺激条件下の D12 における肝芽細胞の CYP3A 活性。全サンプルの細胞溶解液中のタンパク質で標準化した RLU に対して、一元配置分散分析として Tukey's test を行い、有意差を算出した。*P < 0.05, **P < 0.001 (n=3)。(B) 肝実質細胞へ分化誘導した細胞から分泌された ALB。データは全て平均値 ±SD で表現した。(n=3)。(C) 肝実質細胞へ分化誘導した細胞の CYP3A 活性。データは全て平均値 ±SD で表現した。Unpaired Student's *t* 検定により有意差を計算した (n=3)。(D、E) D23 における CYP3A4 (黄) および CYP3A7 (マゼンタ) ; ALB (黄) および AAT (マゼンタ) について免疫細胞染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー: 150 μm。

3.3.2. 伸展刺激は肝芽細胞関連遺伝子の発現を阻害しなかった

周期的伸展刺激が肝芽細胞の遺伝子発現に与える影響を調べるため、分化 9 日目の肝芽細胞 (D9)、伸展刺激を与えていない肝芽細胞 (D12_S(-))、**3 章 3.1 項**において CYP3A 活性が最も高かった (0.58) の肝芽細胞 (D12_S(+)) を用いて、RNA-seq を行った。サンプル間の遺伝子発現変動パターンを可視化するため、RNA-seq により得られた結果を主成分分析した。各サンプルは D9、D12_S(-)、D12_S(+)) などのグループに識別された (**図 3-11A**)。この結果から、PC1 は D9 から D12 の培養による分化を識別する第 1 成分、PC2 は D12 における伸展刺激の効果を識別する第 2 成分と考えられる。

分化 9 日目から 12 日目への培養による影響を明らかにするため、D9 と D12_S(-)、D9 と D12_S(+)) の DEGs 解析をそれぞれ行った。D9 と D12_S(-) を比較した時、D12_S(-) において上昇した DEGs が 2538 遺伝子、低下した DEGs が 2392 遺伝子だった (**図 3-11B**)。上昇した DEGs に、肝芽細胞マーカー遺伝子となる *ALB*、*CYP3A5*、*HNF4A*、*AFP*、*CREB*、血管内皮細胞マーカーの *CD31* が含まれていた (13, 27, 62)。一方、低下した DEGs に、胚性内胚葉細胞のマーカー遺伝子の *CXCR4* (58) が含まれていた。それぞれの DEGs に対して、生物学的意味を明らかにするため、GO 解析を行った。D12_S(-) において、上昇した DEGs の GO terms には肝芽細胞の代謝能に関わる「Transport of small molecules」、
「Regulation of system process」などが含まれていた。一方、低下した DEGs の GO terms には細胞分裂に関わる「Cell cycle」、「DNA replication」などが含まれていた (**図 3-11C**)。さらに、これらの DEGs を TRSSUT 解析することで (63)、DEGs を制御する可能性のある転写因子を解析した (**図 3-11D**)。解析により示唆された SP1、HNF4A などの転写因子は、活性化すること肝芽細胞分化を促進すると報告されている (13, 64)。以上の結果から、分化 9 日目から 12 日目への培養により、肝分化が促進されたと考えられる。

同様に、D9 と D12_S(+)を比較した時、D12_S(+) において上昇した DEGs は 2487 遺伝子、低下した DEGs は 2457 遺伝子だった (図 3-11E)。ここでも、上昇した DEGs に、*ALB*、*CYP3A5*、*HNF4A*、*AFP*、*CREB*、*CD31* が含まれており、低下した DEGs に *CXCR4* が含まれていた。GO 解析において、上昇した DEGs の GO terms には、「Transport of small molecules」、「Regulation of system process」などに加え、「Embryonic morphogenesis」や「Tissue morphogenesis」などの GO terms が高いエンリッチメントスコアで含まれていた (図 3-11F)。一方、低下した DEGs の GO terms には、「Cell cycle」、「DNA replication」などが含まれていた (図 3-11F)。また、D9 と比較した時の D12_S(+)における上昇した DEGs を対象とした TRRUST 解析によっても、SP1、HNF4A などの転写因子が示唆された (図 3-11G)。以上の結果から、周期的伸展刺激を肝芽細胞に与えた場合でも、分化 9 日目から 12 日目への培養過程において肝分化は促進されたと考えられる。



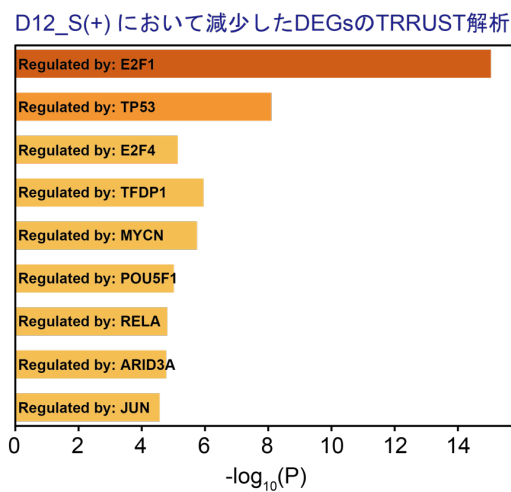
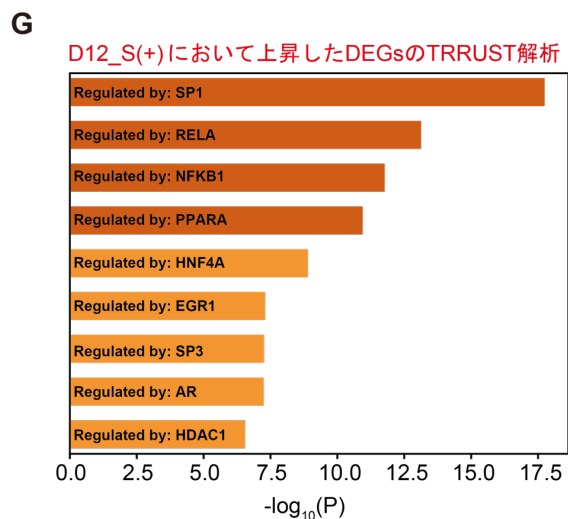
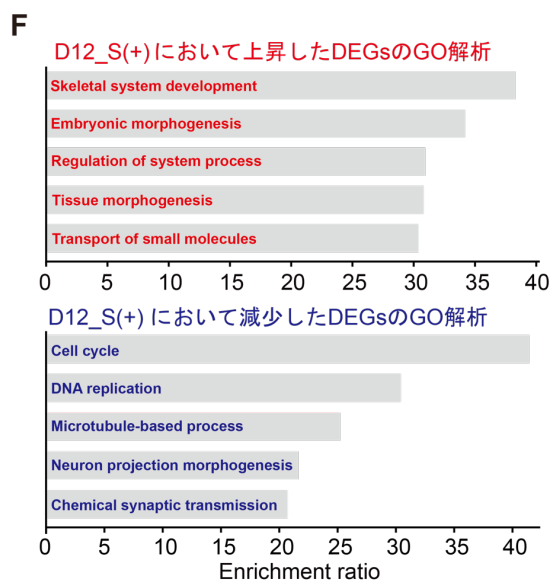
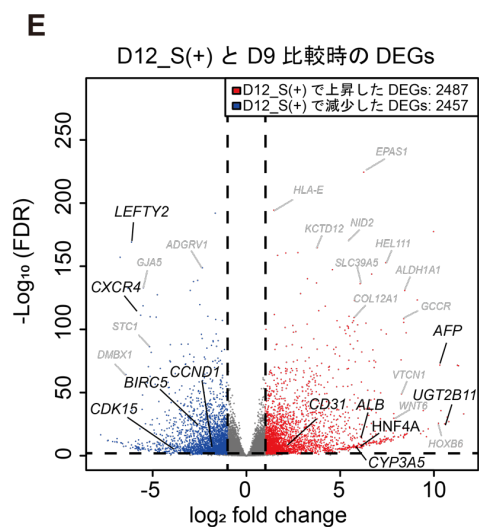


図 3-11 (A) RNA-seq により解析した D9、D12_S (-)、D12_S (+) の遺伝子発現プロファイリングに基づく主成分分析では、D9 (赤)、D12_S (-) (青)、D12_S (+) (緑) が 3 つのグループに分離された。(B) D9 と D12_S (-) を比較した volcano plot。赤と青のプロットは偽発見率 (FDR) <0.05 と $|\log_2 \text{fold change (FC)}| > 1$ で解析した DEGs を示す。D12_S (-) において上昇した DEGs には、肝芽細胞マーカー (*CYP3A5*、*HNF4*、*AFP*、*ALB* など) が含まれ、D12_S (-) において低下した DEGs には、内胚葉マーカー (*CXCR4*) と細胞分裂関連遺伝子 (*CDK15*、*CCND1*、*BIRC1* など) が含まれていた。(C) D9 と比較した時、D12_S (-) において、上昇した 2538DEGs と低下した 2392DEGs に基づく GO terms。(D) TRRUST により示唆された、D12_S (-) において DEGs を制御する可能性のある転写因子。(E) D9 と D12_S (+) を比較した volcano plot。D12_S (+) と同様に、上昇した DEGs には、肝芽細胞マーカー (*CYP3A5*、*HNF4*、*AFP*、*ALB* など) が含まれ、低下した DEGs には、内胚葉マーカー (*CXCR4*) と細胞分裂関連遺伝子 (*CDK15*、*CCND1*、*BIRC1* など) が含まれていた。(F) D9 と比較した時、D12_S (+) において、上昇した 2538DEGs と低下した 2392DEGs に基づく GO terms。(G) TRRUST により示唆された D12_S (+) において DEGs を制御する可能性のある転写因子。

3.3.3. 伸展刺激は血管形成関連遺伝子の発現を促進した

次に、周期的伸展刺激により変化した DEGs を明らかにするため、D12_S(-) と D12_S(+) を解析した (図 3-12A)。D12_S(+)において上昇した DEGs は 459 遺伝子、低下した DEGs は 547 遺伝子だった。D12_S(+)において上昇した DEGs には、*IL6*、*NODAL*、*EGF*、*ZEB2*、*MMP2*、*MMP9*、*TWSIT1* など血管形成や、血管形成時に生じる上皮間葉転換に関連する遺伝子が含まれていた(65-68)。また、肝臓の血管再生時(34)や肝芽の成長時(69)に血管形成に関連する HGF も含まれていた。そのため、HGF の下流に共通して存在する、上皮間葉転換に関連する遺伝子の発現量 (TPM) を調べた (図 3-12D)。その結果、これらの遺伝子において、周期的伸展刺激による発現量の上昇がみられた。さらに、得られた DEGs に対して GO 解析を行った (図 3-12B)。D12_S(-) において、上昇した DEGs の GO terms は形態形成や血管形成に関わる「Embryonic morphogenesis」、「Tissue morphogenesis」、「Vasculature development」であった。減少した DEGs の GO terms はイオン輸送に関わる「Metal ion transport」、「Anion transport」であった (図 3-12B)。

さらに、D12_S(-) 比較した時の D12_S(+)における DEGs を対象とした TRSSUT 解析により、上昇した DEGs を制御する可能性がある転写因子として SP1、STAT3、CREB1 などが示唆された (図 3-12C)。一方、低下した DEGs を制御する可能性がある転写因子は示唆されなかった。これらの示唆された転写因子の遺伝子発現量 (TPM) を調べたところ、D12_S(-) と D12_S(+) の間で有意差はなかった (図 3-12E)。以上の結果から、SP1、STAT3、CREB1 の遺伝子発現量が上昇したのではなく、これらの転写因子が活性化したことで、下流に存在する遺伝子が上昇したと考えられる。これらの転写因子はカルシウムイオンにより活性するため、カルシウムイオンが流入することで発現量が上昇する遺伝子について調べたところ、殆どの遺伝子において上昇がみられた (図 3-12F)

(70)。細胞質内へのカルシウムイオン流入に関わるチャネルの遺伝子発現量 (TPM) を確認した。機械的刺激により活性化し細胞質内へカルシウムイオンを流入させる機械受容チャネルである TRP ファミリー(71-73)と PIEZO ファミリー(74)のうち、*PIEZO1*、*TRPM4*、*TRPM7* の遺伝子発現量が分化に関係なく比較的高かった (図 3-12H)。細胞質内へのカルシウム流入に関わる *ITPR3* や *SERCA* など他の遺伝子の遺伝子発現量 (TPM) には変化がなかったため (図 3-12G) (75, 76)、PIEZO、TRPM4、TRPM7 などのチャネルを介した細胞質内へのカルシウムイオン流入が SP1 や STAT3、CREB1 の活性化に関わっている可能性が考えられる。

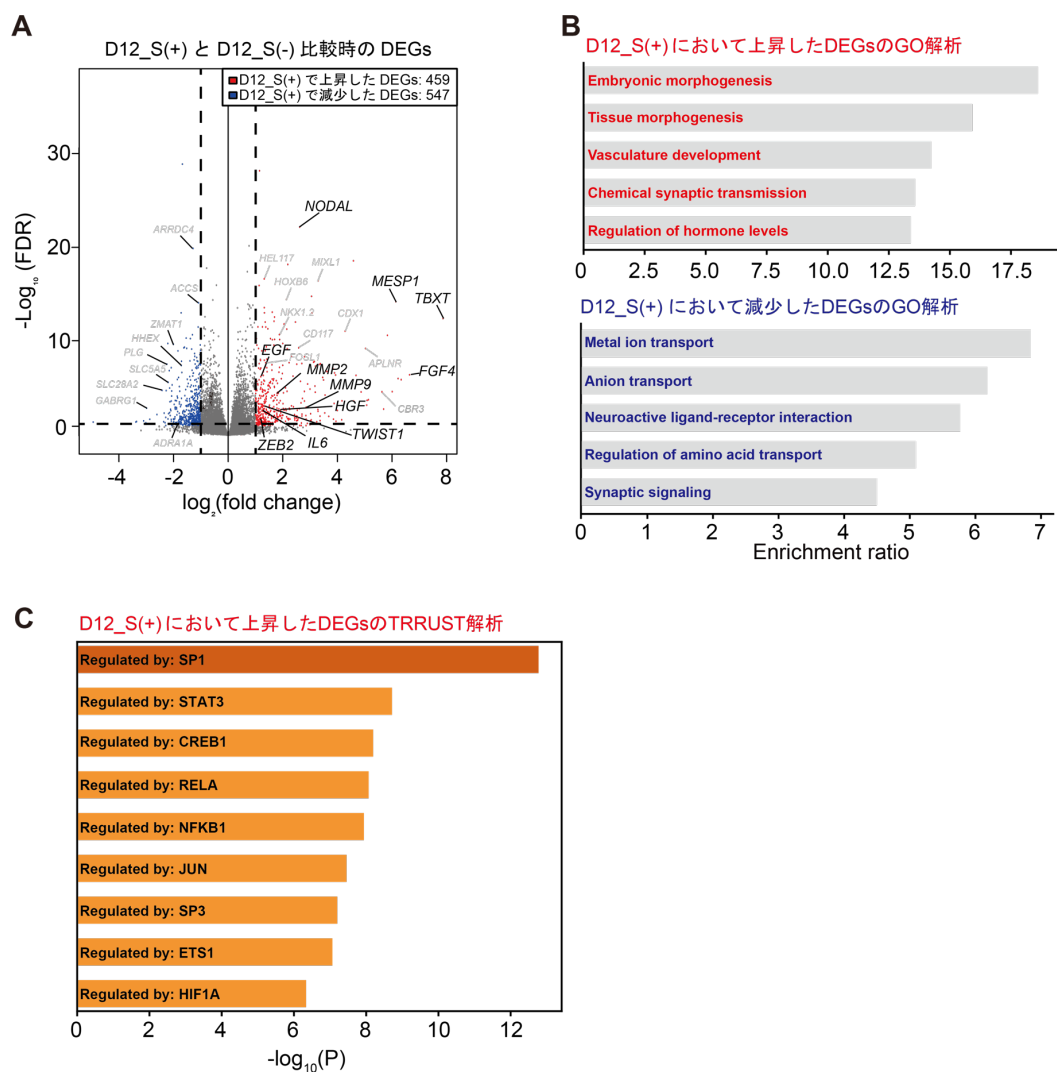
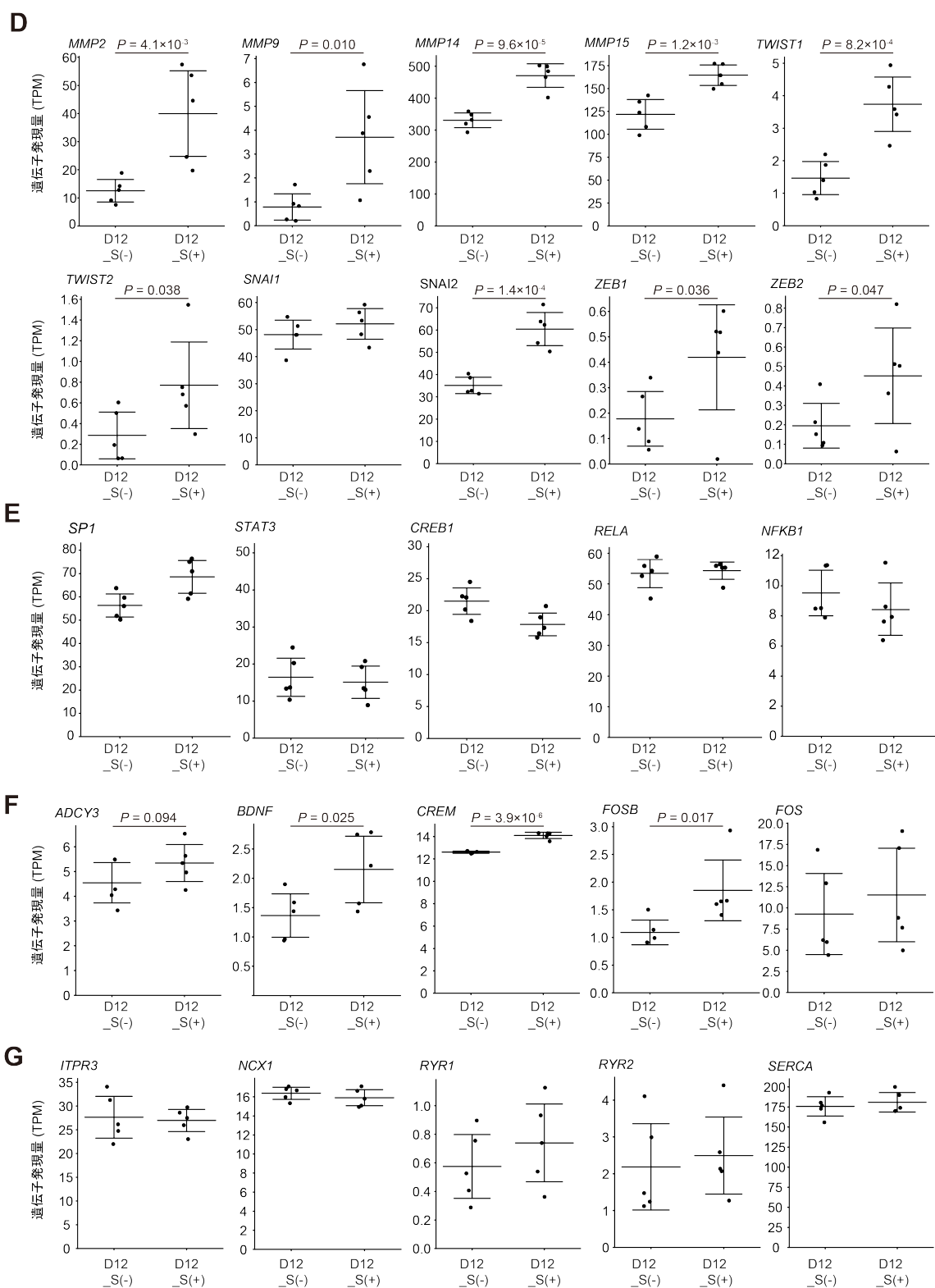


図 3-12 (A) D12_S (-) と D12_S (+) を比較した volcano plot。D12_S (+) において上昇した DEGs には、血管形成に関連する遺伝子 (HGF、MMP2、NODAL、MMP9、IL6、ZEB2、TWIST) が含まれていた。低下した DEGs には、内胚葉マーカー (CXCR4) とイオン輸送関連遺伝子 (SLC5A5、SLC6A3、SLC9A2) が含まれていた。**(B)** D12_S (-) と比較した時、D12_S (+) において上昇した 459DEGs と低下した 547DEGs。**(C)** TRRUST により示唆された D12_S (+) において DEGs を制御する可能性のある転写因子。



H

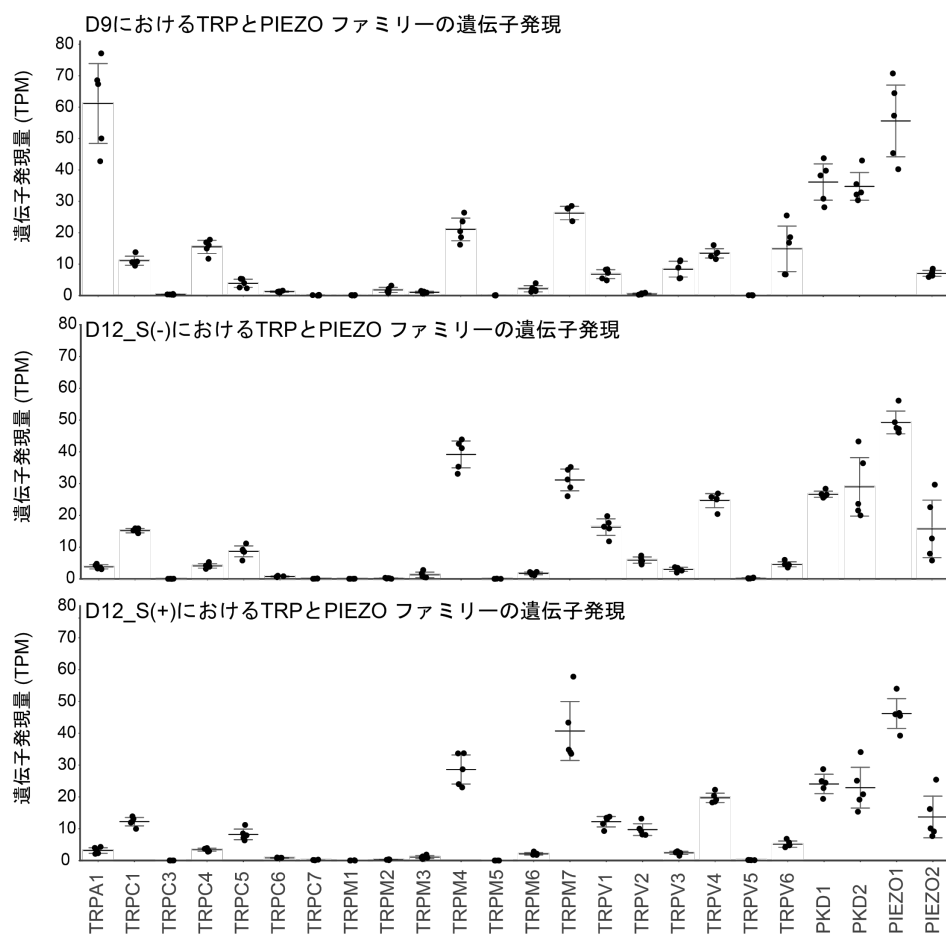
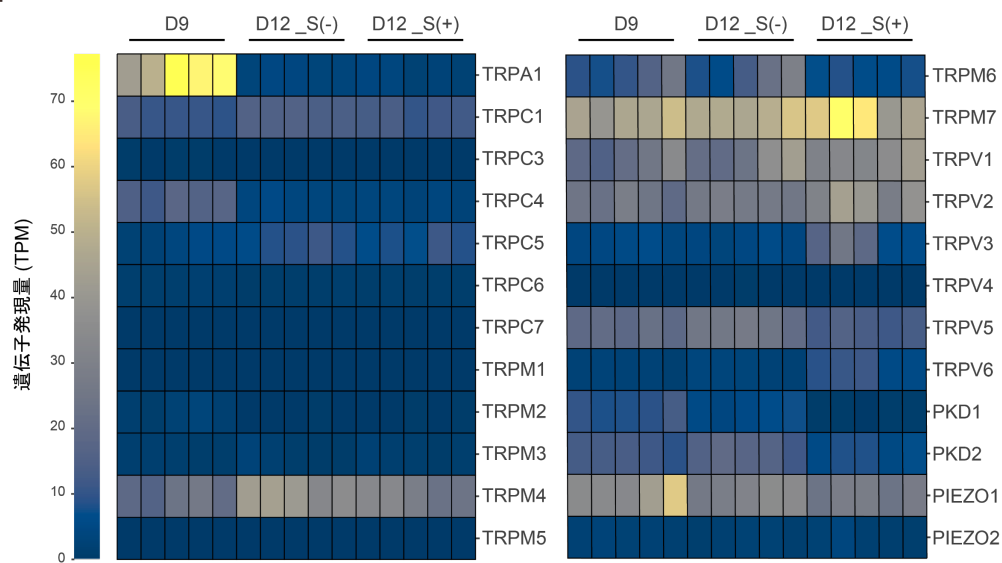


図 3-12 (D) D12_S (-) と D12_S (+) における HGF の下流に存在し、上皮間葉転換に関連する遺伝子の発現量。(E) D12_S (-) と比較した時、D12_S (+) において上昇した DEGs を TRRUST により解析して得られた転写因子の遺伝子発現量 (TPM)。(F) D12_S (-) と D12_S (+) における STAT3 と CREB などを紹介したカルシウムシグナリングに関連する遺伝子発現量 (TPM)。(G) 細胞質へのカルシウム流入に関連しているタンパク質の遺伝子発現量 (TPM)。データは全て平均値 $\pm$ SD で表現した。(H) D9、D12_S (-) と D12_S (+) における TRP ファミリーと PIEZO ファミリーの遺伝子発現量 (TPM)。

3.4. 伸展刺激による血管形成因子の生成と分泌の促進

3.4.1. 伸展刺激は血管形成因子の分泌を促進した

伸展刺激が血管形成に関連するタンパク質、血管形成因子の分泌に与える影響を評価するため、肝臓の血管形成に関連する HGF と MMP9 に着目した(34)。伸展刺激と HGF と MMP9 の放出量の関係を解析するため、複数条件の周期(0.01、0.1、1 Hz) と PDMS 膜中心の厚さ方向への変位(0.45、0.51、0.58 mm) の伸展刺激を与え、D12 の肝芽細胞の HGF と MMP9 の分泌量を測定した(図 3-13A)。

肝芽細胞の HGF と MMP9 の分泌量は、どちらも伸展刺激の周期と相関して増加した。同じ周期の伸展刺激では、PDMS 膜中心の厚さ方向への変位量の増加と相関して、HGF と MMP9 の分泌量は増加した。さらに、位置依存的なひずみを生じる PDMS 膜上の肝芽細胞における HGF、MMP9、肝芽細胞マーカー(HNF4 α と KRT19) の生成量を可視化するため、免疫細胞染色法で D12 の肝芽細胞を染色した(図 3-13B)。3 章 2.2 項における有限要素解析を用いた PDMS 膜の面内ひずみと各タンパク質の蛍光強度の明らかな相関は見られなかった。

A

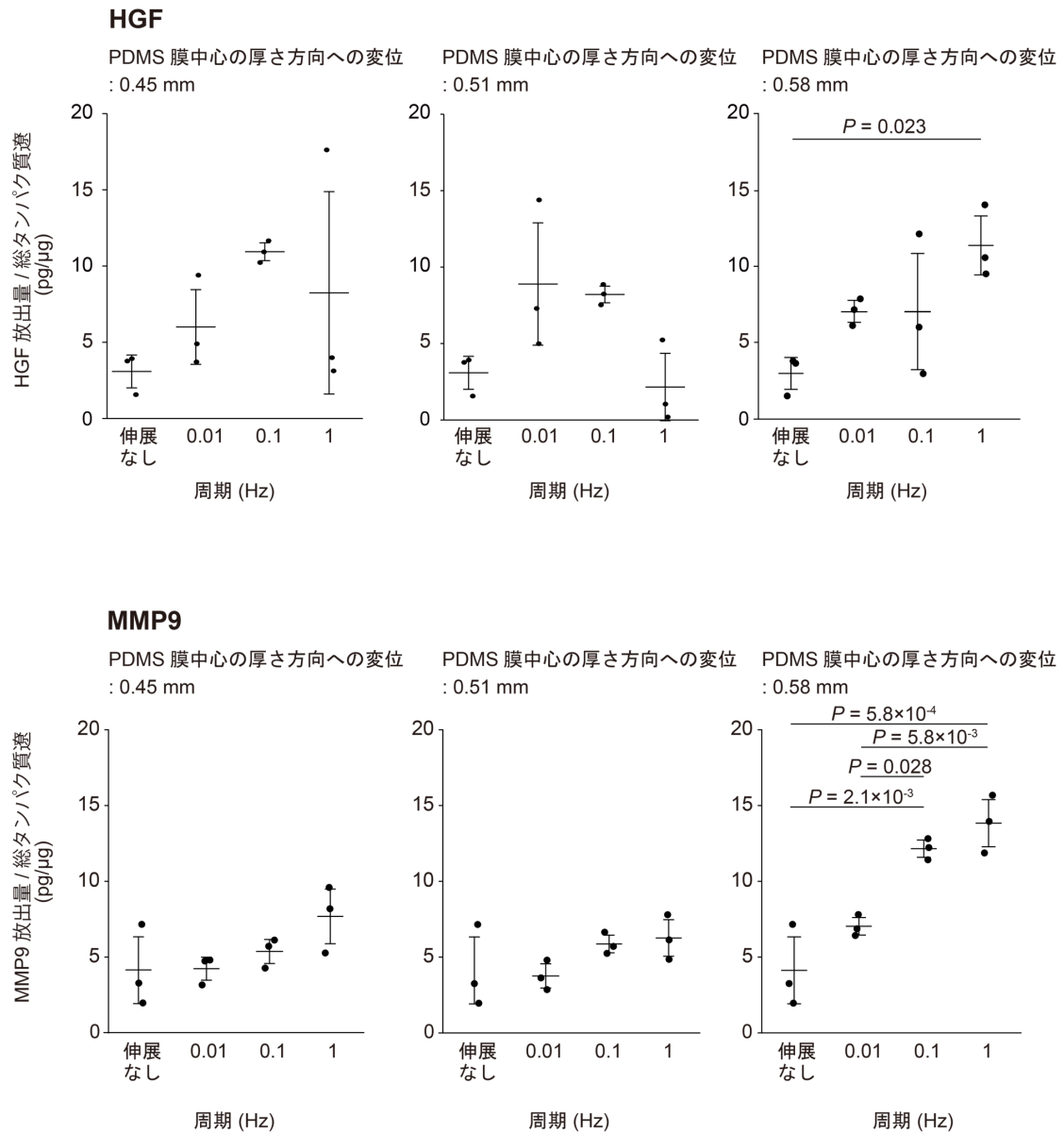


図 3-13A PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が 0.45 mm、0.51 mm、0.58 mm、周期がそれぞれ 0、0.01、0.1、1 Hz の伸展刺激を与えて培養した肝芽細胞が分泌した HGF と MMP9。データは平均値±SD。一元配置分散分析として Tukey's test を行い、有意差を算出した ($n=3$)。

B

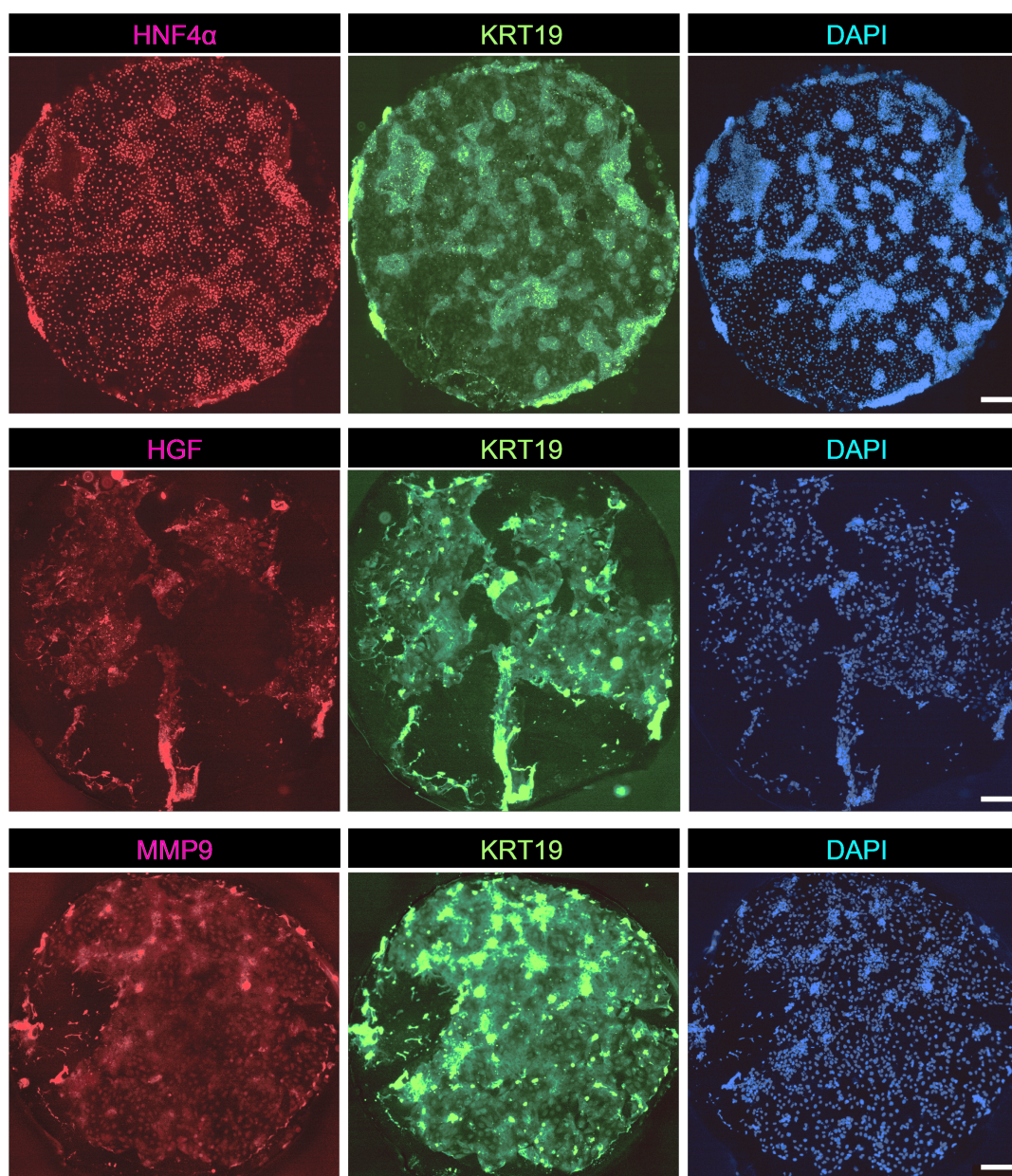


図 3-13B 1 Hz (周期)、0.58 mm (PDMS 膜中心の厚さ方向への変位) の伸展刺激を与えて培養した D12 の肝芽細胞について、PDMS 膜上で肝芽細胞マーカー (HNF4α、赤; KRT19、緑)、血管形成因子 (HGF、赤; MMP9、赤) および核 (DAPI, 青) を用いて免疫細胞染色をした。スケールバー: 300 μm 。

3.4.2. KDR 陽性・陰性細胞の双方で血管形成関連遺伝子の発現量が上昇した

肝芽細胞において周期的伸展刺激が血管形成因子の生成・分泌を促進した細胞を明らかにするため、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞それぞれの血管形成関連遺伝子の発現量を測定した。

まず、**3 章 4.1 項**の結果において、HGF と MMP9 の分泌量が最も多かった、1 Hz、PDMS 膜中心の厚さ方向への変位が 0.58 mm の伸展刺激を肝芽細胞に与え、伸展刺激が KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の比率に与える影響をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、D12 時点で刺激の有無による KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の比率に有意差は認められなかった。**(図 3-14A、B)**。

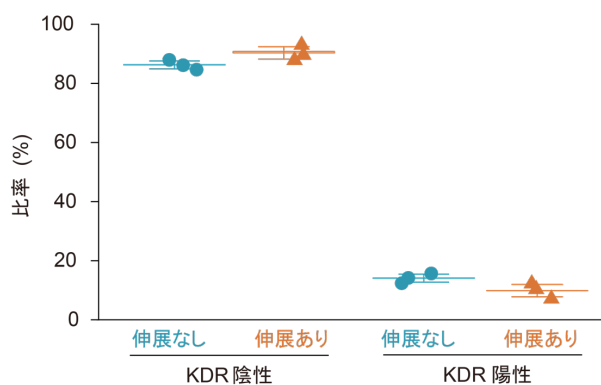
次に、フローサイトメトリーにより分取した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の遺伝子発現を RT-qPCR により解析した **(図 3-14C)**。KDR 陽性細胞と比較して、刺激の有無に関わらず、KDR 陰性細胞は *CYP3A7* と *HNF4A* などの肝芽細胞マーカー遺伝子を高く発現していた。また、周期的伸展刺激により、*CYP3A7* の遺伝子発現量は平均 15 倍上昇し、*HNF4A* の遺伝子発現量は平均 0.37 倍に低下した。*HNF4A* の遺伝子発現量の減少は、肝芽において上皮間葉転換を生じた肝芽細胞に見られる(77)。一方、KDR 陰性細胞と比較して、KDR 陽性細胞は *KDR* と *CD31* などの血管内皮細胞マーカー遺伝子を高く発現していた。周期的伸展刺激により、血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現量は変化しなかった。

さらに、周期的伸展刺激を付与した時の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、肝芽形成時に発現量が上昇し、血管形成に関係していると考えられる遺伝子 (*HGF*、*MMP2*、*MMP9*、*TWIST1*) (34, 78) の発現量の変化を RT-qPCR を用いて調べた **(図 3-14D)**。周期的伸展刺激の付与により、KDR 陰性細胞の *HGF* の遺伝子発現量は平均 44 倍に上昇した一方、KDR 陽性細胞において変化はなかった。また、伸展刺激により *MMP9* の遺伝子発現量は KDR 陽性細胞において平均 12 倍、KDR 陰性細胞において平均 22 倍、それぞれ上昇した。周期的伸展刺

激付与により、KDR 陽性細胞、KDR 陰性細胞の *MMP2* の遺伝子発現量はそれぞれ平均 2.2 倍、18 倍上昇し、*TWIST* の遺伝子発現量はそれぞれ平均 15 倍、13 倍上昇した。以上の細胞分取と遺伝子解析の結果、肝芽細胞の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞のどちらにおいても、周期的伸展刺激は血管形成関連遺伝子の発現を促進していた。

A

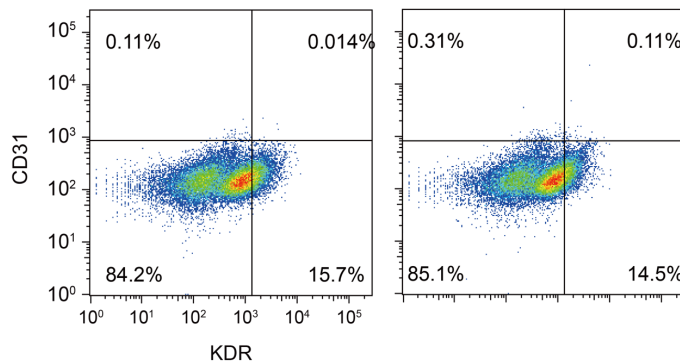
D12におけるKDR 陽性細胞比率



B

D12 伸展なし

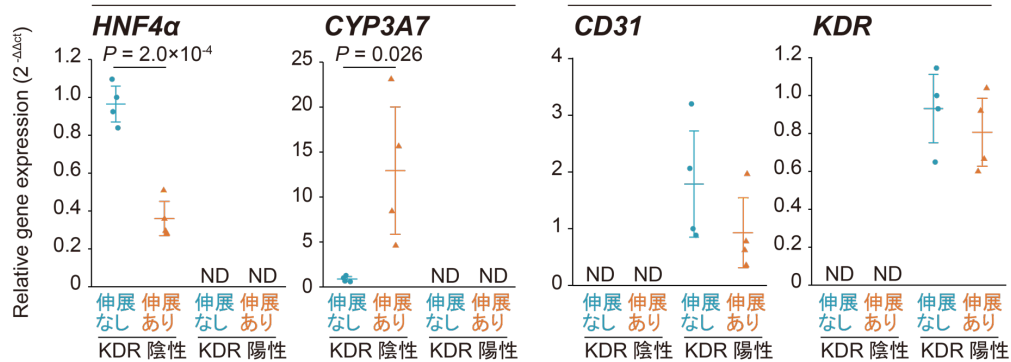
D12 伸展あり



C

肝芽細胞マーカー

内皮細胞マーカー



D

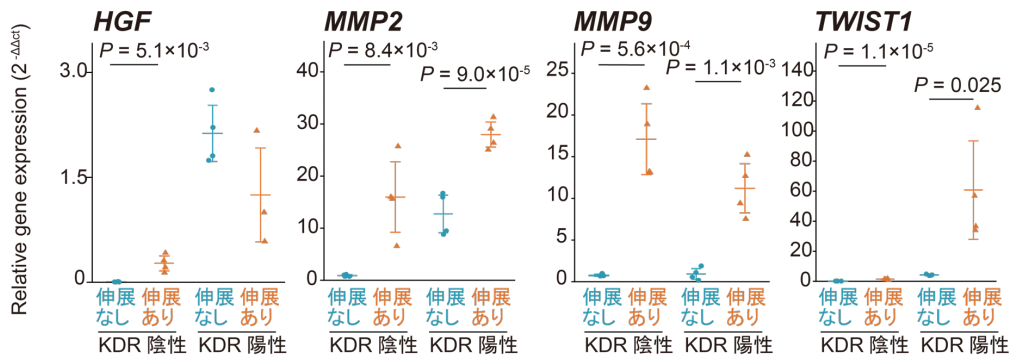


図 3-14 (A) 周期的伸展刺激の有無が D12 の肝芽細胞の KDR 陽性比率に与える影響。データは全て平均値 $\pm$ SD で表現した。(n=3) (B) 周期的伸展刺激の有無が D12 の肝芽細胞の KDR と CD31 陽性比率に与える影響。(C) 周期的伸展刺激の有無が KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞における肝芽細胞マーカー (*HNF4A* と *CYP3A7*) と血管内皮細胞マーカー (*CD31* と *KDR*) の遺伝子発現に及ぼす影響。データは平均値 $\pm$ SD で表現した。Unpaired Student's *t* 検定により有意差を計算した (n=4)。(D) KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、周期的伸展刺激の付与により変化した *HGF*、*MMP2*、*MMP9*、*TWIST1* の遺伝子発現。データは全て平均値 $\pm$ SD で表現した。Unpaired Student's *t* 検定により有意差を計算した (n=4)。

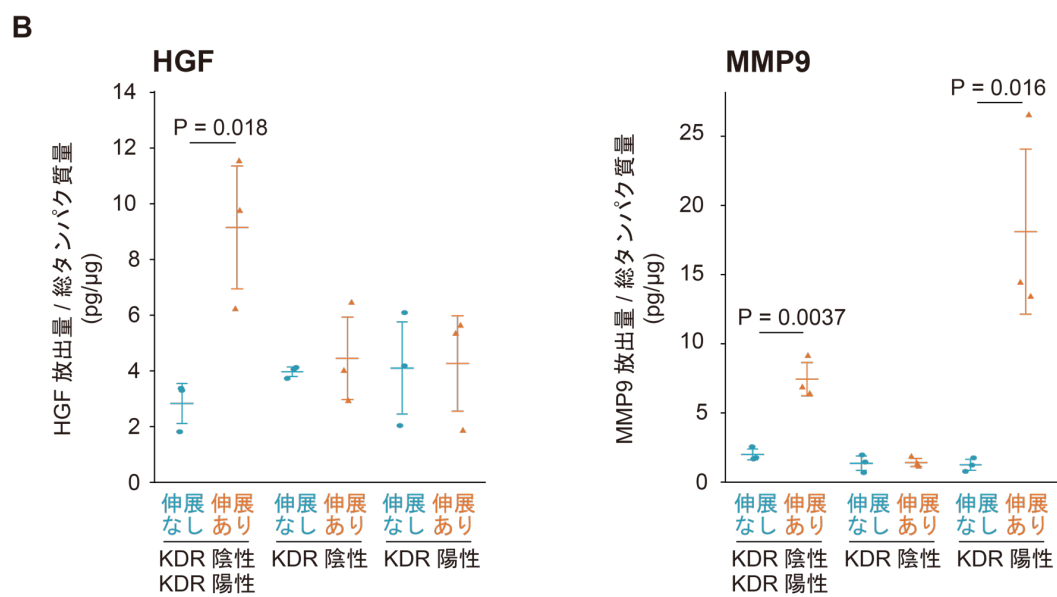
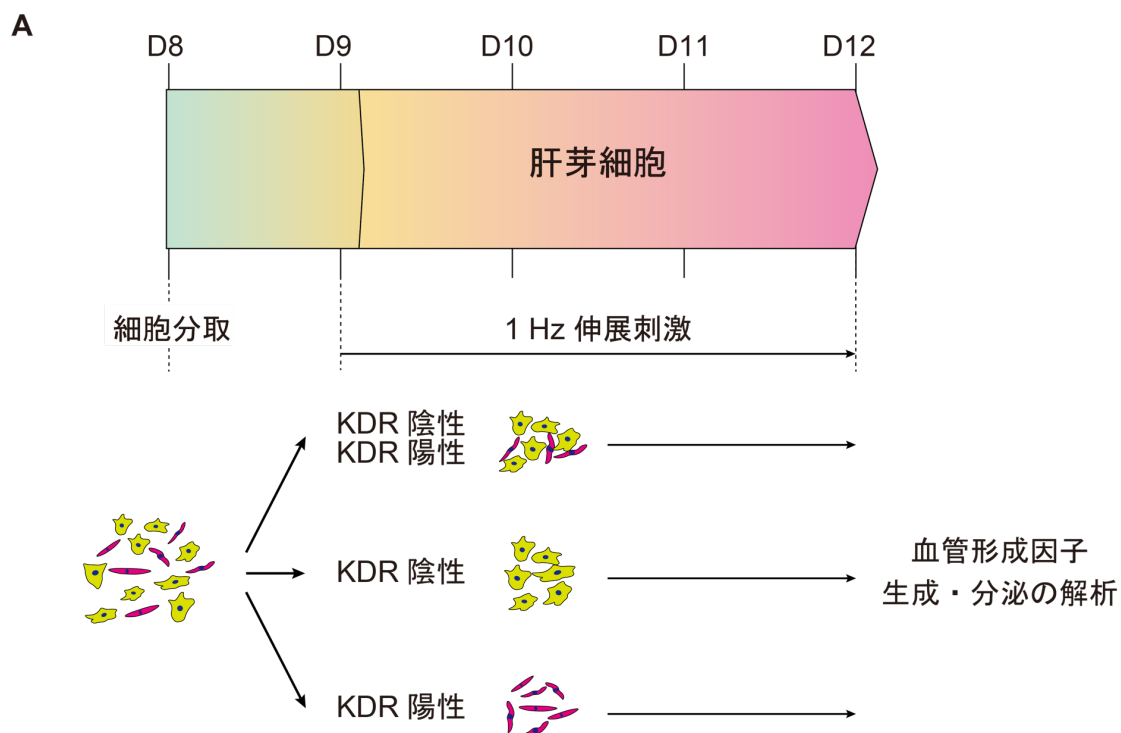
3.4.3. 血管形成因子の生成・分泌促進には KDR 陽性・陰性細胞の共培養が必要だった

周期的伸展刺激による HGF と MMP9 の生成と分泌の促進に KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の共培養が必要であることを検証するため、D9 の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞を分取し、それぞれをマイクロデバイスの培養チャンバーに播種した（**図 3-15A**）。播種してから 1 日後、1 Hz、PDMS 膜の厚さ方向への変位が 0.58 mm の周期的伸展刺激を与え、3 日間培養した。

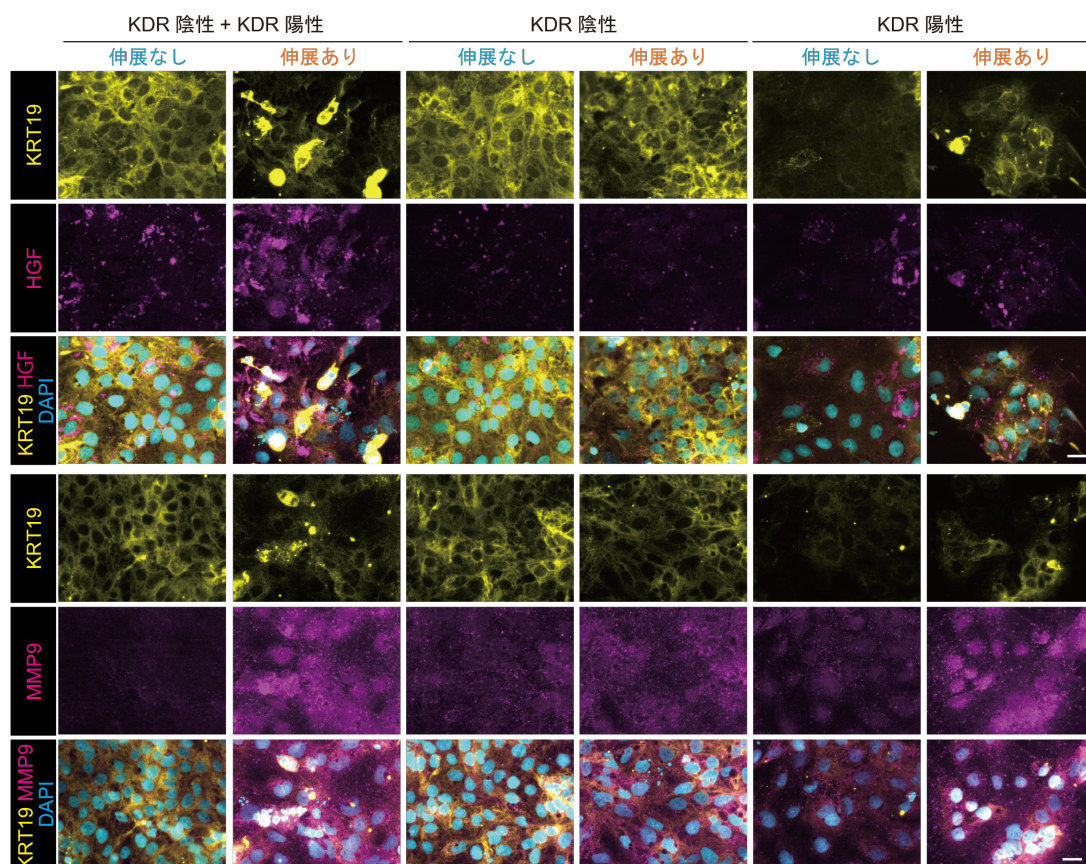
共培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞において、伸展刺激により HGF の分泌量は平均 3.2 倍増加したが、分取培養時、伸展刺激により HGF の分泌量は変化しなかった（**図 3-15B**）。一方、共培養した細胞、分取培養した KDR 陽性細胞において、MMP9 の分泌量は、平均 3.7 倍と 18 倍にそれぞれ増加した（**図 3-15B**）。

また、刺激の有無と、共培養の有無が HGF と MMP9 の生成量に与える影響を調べるため、免疫細胞染色を行い、蛍光強度を解析した。これらの細胞の共培養時、伸展刺激により、HGF の生成量は平均 2.0 倍に増加した。一方、周期的伸展刺激により HGF の生成量の増加は、分取培養した KDR 陰性細胞において平均 1.2 倍、分取培養した KDR 陽性細胞において平均 1.4 倍に留まった（**図 3-15C と D**）。共培養した細胞、分取培養した KDR 陽性細胞において、周期的伸展刺激により MMP9 の生成量は約 1.7 倍それぞれ増加した。一方、分取培養した KDR 陰性細胞においては、周期的伸展刺激により MMP9 の生成量の増加は約 1.2 倍に留まった。

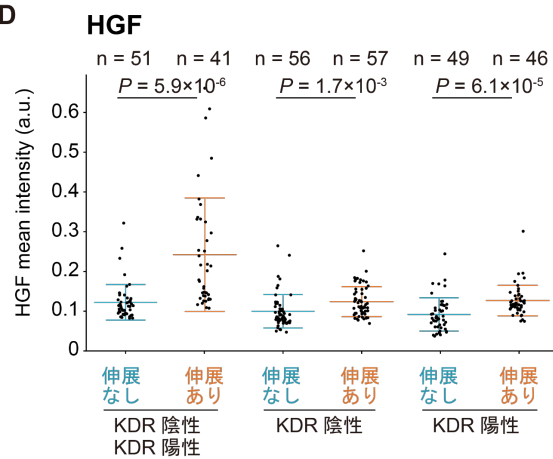
このように、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の共培養を介して、周期的伸展刺激は HGF と MMP9 の分泌量を増加させた。また、分取培養した KDR 陽性細胞においても、伸展刺激は MMP9 の分泌量を増加した（**図 3-15C と D**）。



C



D



E

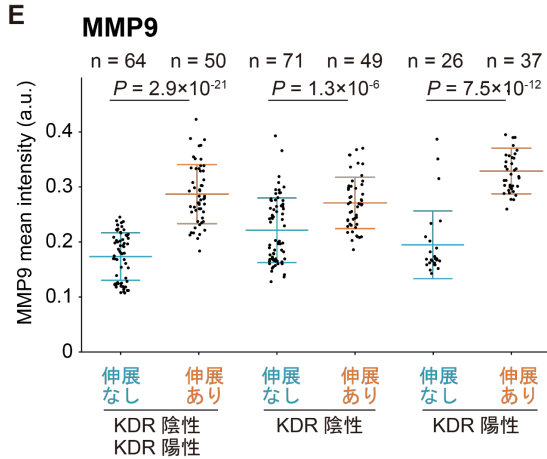


図 3-15 KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の共培養時に、周期的伸展刺激は血管形成因子である HGF と MMP9 の生成と分泌を促進した。(A) D8 の KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の分取後の培養と周期的伸展刺激付与についての概要図。(B) D12 において刺激の有無によって変化した、共培養・分取培養した時の HGF と MMP9 の分泌量。データは全て平均値 $\pm$ SD で表現した。Unpaired Student's *t*-test を行い、有意差を計算した ($n=3$)。(C) 刺激の有無によって共培養時と分取培養時の肝芽細胞マーカー (KRT19、黄)、血管形成因子 (HGF、マゼンタ; MMP9、マゼンタ)、核 (DAPI、シアン) によって免疫細胞染色を行い、撮影した蛍光顕微鏡画像。スケールバー: 25 μ m。(D、E) (C) の顕微鏡画像に基づく共培養および分取培養時における HGF および MMP9 発現の定量的細胞プロファイリング。同時に免疫細胞染色を行った 2 つのウェルにおいて PDMS 膜中心付近と端付近の細胞を撮影し、計 4 枚の画像から輝度を算出した。データは平均値 $\pm$ SD で表現した。二元配置分散分析として Welch's test を行い、有意差を算出した。

第 4 章 考察

4.1. 本研究で用いた分化誘導法

本研究では、周期的伸展刺激の付与により KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の比率が約 1.5:8.5 から変化しないことを確認した (図 3-14A)。この比率は、受精後 15 から 24 週の胎児由来の肝芽細胞における KDR 陽性と KDR 陰性細胞の比率 (1.25:8.75) とほぼ同等である (27)。マウスにおいて肝類洞内皮細胞の一部は、内胚葉細胞由来の KDR 陽性細胞から生じることが報告されている (27)。本研究で分化誘導した KDR 陽性細胞は血管内皮細胞マーカーである KDR を細胞膜表面に発現していたが、CD31 を細胞膜表面に発現していなかった (図 3-8B)。ゲル上で培養することにより、KDR 陽性細胞は sprouting 網を形成し、CD31 を発現した一方、KDR 陰性細胞はそのような構造を形成せず、CD31 も発現しなかった (図 3-9A と 3-9B)。さらに、肝実質細胞へ分化誘導することにより、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞は肝実質細胞マーカー (CYP3A7、CYP3A4、ALB、AAT) を発現した (図 3-9D)。これらの結果は、本研究で得られた KDR 陽性細胞は肝類洞内皮細胞と肝実質細胞に分化する可能性がある一方、KDR 陰性細胞は肝類洞内皮細胞に分化できないことを示唆している。このように、本研究では、生体内の肝芽細胞と同様の特徴を有する肝芽細胞を分化誘導したと考えられる。

本研究において、伸展刺激により血管形成因子の分泌が促進された時、KDR 陽性肝芽細胞の血管内皮細胞への分化は促進されなかった。KDR 陽性肝芽細胞の血管内皮細胞への分化誘導において VEGF を用いたように、生体内においても KDR 陽性肝芽細胞を血管内皮細胞へ分化誘導する因子は、伸展刺激ではなく、肝芽へ侵入した血管内皮細胞や血管壁細胞から分泌される VEGF などの化学因子だと考えられる (図 3-14C)。

4.2. カルシウムシグナリング増幅による血管形成因子生成・分泌促進の可能性

本研究では、RNA-seq 解析により、周期的伸展刺激がヒト ES 細胞由来の肝芽細胞の *HGF* や *MMP9* などの血管形成に関わる遺伝子発現を促進することを示した (図 3-12H)。D12_S(+)において上昇した DEGs についての GO 解析と TRRUST 解析では、*HGF* や *MMP9* を含む「Embryonic morphogenesis」、「Tissue morphogenesis」、「Vasculature development」などの形態形成や血管形成に関わる GO terms が確認され (図 3-12I)、これらの遺伝子発現の促進は *STAT3* や *CREB1* などの転写因子の活性化による可能性が示唆された (図 3-12L)。一方、周期的伸展刺激により *STAT3* や *CREB1* の遺伝子発現量は変化していなかった。肝芽細胞において、伸展刺激により分泌が促進された *HGF* と *MMP9* は、カルシウムシグナルに関係する転写因子 *STAT3* や *CREB1* により遺伝子発現制御されており (79, 80)、伸展刺激の周期やひずみと正の相関を示した (図 3-13A)。これらの結果から、伸展刺激の周期に依存して活性化する *PIEZO1* や *TRPV4* などの機械受容チャネルを介して (81, 82)、細胞質へのカルシウムイオンの流入が生じ、*STAT3* と *CREB3* が活性化している可能性が考えられる (83-85)。また、本研究の RNA-seq 解析による機械受容チャネルに関連する遺伝子プロファイルにおいて、*TRPM7* や *PIEZO1*、*TRPM4*、*PKD1* などの一部の機械受容チャネルの遺伝子発現量が高かった (図 3-12O)。したがって、これらのチャネルが *STAT3* や *CREB3* の活性化に関連している可能性がある。その場合、生体内での胎児の心臓の 1 分間あたりの心拍数は 110-150 回と報告されているため (86)、本研究においてマイクロデバイスで与えることが可能であった最速周期の伸展刺激 (1 Hz、すなわち 60 回/分) よりも 2 倍程度速く、生体内では肝芽細胞の機械受容チャネルの活性化と血管形成因子の生成は、より促進されている可能性がある。

4.3. 血管形成因子生成・分泌促進への KDR 陽性・陰性細胞の共培養の寄与

本研究では、HGF や MMP などの血管形成因子の促進に KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の共培養が必要であることを実証するため、ヒト ES 細胞から分化誘導した肝芽細胞において、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞をそれぞれ分取し、培養した。分取培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞へ周期的伸展刺激をそれぞれに与えた時、HGF の遺伝子発現、タンパク質の生成や分泌は促進しなかったが、共培養することで、HGF の生成量は平均 2.0 倍、分泌量は平均 3.2 倍増加した (図 3-15B-D)。一方、共培養した時の KDR 陽性細胞における HGF の遺伝子発現量は変化しなかった (図 3-13D)。これらの結果は、KDR 陽性細胞における HGF の翻訳および分泌過程に、KDR 陰性細胞との細胞間相互作用が関与している可能性を示している。KDR 陽性細胞と共培養した KDR 陰性細胞では、伸展刺激により、HGF の遺伝子発現量とタンパク質の生成・分泌量は促進された (図 3-14D、3-15B-D)。これは、KDR 陽性細胞との細胞間相互作用が HGF の発現に関与していることを示唆している。そのため、KDR 陰性細胞では、伸展刺激による、カルシウムイオン流入を介した STAT3 や CREB3 の活性化(84, 85)に、KDR 陽性細胞との細胞間相互作用が関与している可能性がある。

また、分取培養した KDR 陽性細胞および共培養した肝芽細胞において、伸展刺激は、MMP9 の分泌を促進したが、分取培養した KDR 陰性細胞において、MMP9 の分泌を促進しなかった (図 3-15B)。共培養した肝芽細胞や分取培養した KDR 陽性細胞と比較して、分取培養した KDR 陰性細胞における MMP9 の生成量の増加は小さかった (図 3-15C-D)。これらの結果から、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞間の細胞間相互作用も MMP9 の転写因子の活性化に寄与している可能性がある。分取培養した KDR 陽性細胞においても、伸展刺激は MMP9 の分泌を促進していた (図 3-15B)。KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の細胞間相互

作用が MMP9 の分泌に与える影響を考慮するため、共培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の細胞数の比（陽性細胞:陰性細胞=1.5 : 8.5）と分取培養した時の細胞の MMP9 分泌量より、細胞間相互作用の影響がないと仮定した MMP9 の分泌量を加重平均で算出した。算出した加重平均は 3.92 pg/μg であったが、実際に共培養した時の MMP9 の分泌量は 7.44 pg/μg であった。これは、KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞間の細胞間相互作用が MMP9 の分泌量を促進したことを意味する。

以上の結果を総合すると、肝芽細胞において KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞の細胞間相互作用を介して、周期的伸展刺激は血管形成に関わるタンパク質の生成と分泌を促進していると考えられる。この細胞間相互作用の候補として、RNA-seq による解析により活性化したと示唆された SP1、STAT3 や CREB1 の上流に存在する FOSL1(87)や MAPK(88)などの転写因子を促進するリガンドが考えられる。実際に、volcano-plot 解析により、FOSL1 の遺伝子発現が周期的伸展刺激によって上昇している（図 3-12A）。この候補を具体的に絞り込むため、周期的伸展刺激条件下で、共培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞と、分取培養した KDR 陽性細胞と KDR 陰性細胞をそれぞれ網羅的遺伝子解析し、volcano-plot により比較する手法が有効だと考えられる。

4.4. 本研究で用いた手法の改良点

本研究では、PDMS 膜を加圧し、円蓋状に変形させることで細胞に伸展刺激を与えるマイクロデバイスを用いた。本デバイスでは、伸展刺激以外にも力学刺激が加わっている可能性がある。例えば、PDMS 膜の変形に伴う培地の流れによる細胞へのせん断応力、膜の厚さ方向への周期的な細胞の変位による静水圧の周期的な変化による刺激などが考えられる。伸展刺激のみが重要だと検証するためには、PDMS 膜を 2 次元方向に物理的に引張ることで伸展刺激を細胞に与え

るマイクロデバイスとポンプを使用してせん断応力を細胞に与えるマイクロデバイスを開発の上、細胞を培養・比較することが考えられる。さらに、ヒト胚に形状が似たマウス胚を用いて、心拍に伴う肝芽の変形を心拍に同期した MRI など撮影し、肝芽細胞に生じるひずみを分析した上で、マイクロデバイスに反映させることは、より体内に近い伸展刺激を再現することを可能とする。

一方、これまでの研究により、様々な細胞において、伸展刺激は、細胞内の化合物やシグナル伝達、構造を変化させることが明らかになっている(89)。伸展刺激を付与した際の細胞質内へのカルシウムイオン流入には、主に PIEZO チャネルなどの機械受容チャネルが関連しており、PIEZO チャネルの活性化は細胞の分化や発生に寄与している(90, 91)。このような機構の関連を検証には、カルシウムセンサーやレポーター遺伝子を細胞に導入し、カルシウムシグナリングに関わる遺伝子のノックダウン・ノックアウトやライブセルイメージングを組み合わせる実験が有効である。しかし、本研究において用いた 3 層構造のマイクロデバイスは培養中に焦点が変化するため、蛍光顕微鏡を用いたライブイメージングに適さない。本研究結果により示唆された分子機構を解明するためには、伸展刺激条件下において細胞のライブイメージングを可能とするマイクロデバイスを開発する必要がある。

さらに、本研究の改良点として、肝芽を構成する横隔間充織細胞を用いる点が挙げられる。体内では、横隔間充織細胞から分泌される BMP4 が肝芽細胞の分化を促進することが報告されている(92, 93)。さらに分化に加えて、横隔間充織細胞が肝芽における血管の発達に寄与している可能性があるため、伸展刺激による血管形成因子の生成促進機構の解明には、横隔間充織細胞と肝芽細胞を混合した培養系へ改良し、伸展刺激条件下での多細胞間相互作用についても考慮する必要がある。

4.5. 発生生物学分野と組織工学分野への貢献

本研究では、伸展刺激の付与による肝芽細胞の血管形成に関わるタンパク質の生成と分泌を促進する機構について解明の手掛かりを得た。機械受容チャネルやカルシウムイオンの流入の関与が示唆された。示唆された肝芽細胞における血管形成因子の促進機構を完全に解明することで、灌流可能な血管を有するヒト多能性幹細胞由来肝芽作製を実現する手掛かりになる。この肝芽の実現は、生体移植に利用可能な人工肝臓の開発を加速するだけでなく、肝小葉における血管構造形成機構の理解にも寄与する。また、そのような機構の解明は肝臓以外の器官における血管形成の発生研究や組織工学への応用が期待される。例えば、心臓や肺など、血管網が機能維持に重要な役割を果たす器官においても、伸展刺激による血管形成の制御機構が関与している可能性が考えられる。この知見を用いることで、他臓器においても生体内の臓器により近い人工臓器の作製の実現が期待される。さらに、実現した人工臓器を基にした病態モデルの開発や、血管形成異常を伴う疾患の発症メカニズムの解明、治療法の開発に寄与する。このように本研究成果は、肝臓やその他の器官における発生生物学や組織工学へ貢献する大きな可能性を秘めている。

一方、これらを実用化する上で解決すべき課題は山積している。その中でも、分化誘導にかかる時間的コストは金銭的成本にも繋がるため、解決すべき最も重要な課題である。例えば、機能が成熟していない肝実質細胞を分化誘導するために、現在の手法は 30 日近く要する。そこで将来的に、生体内環境を再現する培養デバイスや発生時間が異なる動物種の多能性幹細胞を組み合わせる研究を行うことで、この分化誘導に要する時間の短縮に関する手掛かりを得る必要がある。また、このような研究により、分化や発生といった生物学的な疑問を解き明かすことが可能となる。

第 5 章 結論

本研究では、マイクロデバイスを用いてヒトES細胞由来の肝芽細胞において、伸展刺激が血管形成因子の生成に与える影響とその機構を明らかにすることを目指した。その結果、ヒトES細胞由来の肝芽細胞において、伸展刺激がHGFやMMP9などの血管形成に関わる遺伝子の発現、タンパク質の生成・分泌を促進することを明らかにした。また、この促進に伸展刺激の周期に関連して活性化し、STAT3などの転写因子に関わる機構が寄与している可能性を示唆した。さらに、伸展刺激による血管形成因子の生成・促進には、KDR陽性肝芽細胞とKDR陰性肝芽細胞の共培養が必要であることを明らかにした。

本研究で用いた手法と結果は、肝芽における血管形成因子の分泌機構の解明や灌流可能な肝芽を生体外で作製するための組織工学技術の発展に寄与する。また、肝芽における血管形成因子の分泌機構の解明は、肝臓以外の肺や心臓のような臓器における血管形成機構の解明の一助となる。さらに、将来的に筆者は細胞の分化誘導期間の短縮を実現することで、再生医療において血管を有する人工臓器を用いた移植を実現したい。

表

表 1. フローサイトメトリーに使用した抗体

名称	会社名	Catalog number	希釈
R-Phycoerythrin-labeled human anti-SSEA4	Stemgent	09-0003	1:50
Dylight™ 488-labeled Human anti-TRA-1-60	Stemgent	09-0068	1:50
Allophycocyanin-labeled human anti-CD15 (SSEA1)	BioLegend	323012	1:50
Mouse IgG3, k Isotype Control phycoerythrin	Stemgent	09-0004	1:50
Mouse IgM, k, Isotype Control Dylight	Stemgent	09-0072	1:50
Mouse IgG,k Isotype Ctrl	Biolegend	400130	1:50
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD309 (KDR)	BD Biosciences	560495	1:50
Alexa Fluor® 488 anti-human CD31	BioLegend	303110	1:50
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1κ isotype control	BD Bioscience	557783	1:50
Alexa Fluor® 488 mouse IgG1κ isotype control	BD Bioscience	557782	1:50

表 2. 免疫細胞染色に用いた抗体リスト

名称	会社	Catalog number	希釈
NANOG Antibody	Cell signaling	4903S	1:200
OCT4 Antibody	Santa Cruz	sc-5279	1:200
MMP9 Antibody	Bioss	bs-0397R	1:500
HHEX Antibody	R&D systems	MAB83771-100	1:200
SOX17 Antibody	R&D systems	MAB1924	1:200
HGF Antibody	Protein tech	26881-1-AP	1:500
KRT19 Antibody	Thermo Fisher	61-7300	1:500
FOXA2 Antibody	R&D systems	AF2400	1:200
KDR Antibody	Abcam	ab2349	1:500
HNF4 α Antibody	Cell signaling	mAb #3113	1:200
CD31 Antibody	R&D systems	AF3628	1:500
CYP3A4 antibody	Santa Cruz Biotechnology	Sc-53850	1:50
CYP3A7 antibody	Proteintech	55428-1-AP	1:400
ALB antibody	R&D Systems	188835	1:400
AAT antibody	Dako	A0012	1:400
AlexaFluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch	715-545-150	1:1000
AlexaFluor® 647 donkey anti-rabbit IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch	711-606-152	1:1000
AlexaFluor® 488 donkey Anti-goat IgG	Abcam	Ab150129	1:1000

表 3. Real-time RT-PCR 解析に用いたプライマーリスト

Gene Symbol	プライマー (forward/reverse; 5' to 3')
<i>FOXA2</i>	GGAACACCACTACGCCTTCAAC/AGTGCATCACCTGTTTCGTAGGC
<i>CD31</i>	AAGTGGAGTCCAGCCGCATATC/ATGGAGCAGGACAGGTTTCAGTC
<i>KDR</i>	GGAACCTCACTATCCGCAGAGT/CCAAGTTCGTCTTTTCCTGGGC
<i>TWIST1</i>	GCCAGGTACATCGACTTCCTCT/TCCATCCTCCAGACCGAGAAGG
<i>HGF</i>	GAGAGTTGGGTCTTACTGCACG/CTCATCTCCTCTTCCGTGGACA
<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC/TGGTGAAGACGCCAGTGGA
<i>CYP3A7</i>	AAGTCTGGGGTATTTATGACT/CGCTGGTGAATGTTGGAGAC
<i>HNF4A</i>	GAGCTGCAGATCGATGACAA/TACTGGCGGTCGTTGATGTA
<i>HHEX</i>	CCAGGTGAGATTCTCCAACGAC/CTCCATTTAGCGCGTCGATTCTG
<i>KRT19</i>	AGCTAGAGGTGAAGATCCGCGA/GCAGGACAATCCTGGAGTTCTC
<i>MMP2</i>	TACAGGATCATTGGCTACACACC/GGTCACATCGCTCCAGACT
<i>SOX17</i>	AGGAAATCCTCAGACTCCTGGGTT/CCCAAAGTGTCAAGTGGCAGACA

引用文献

1. 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).
2. M. Ohgushi, M. Matsumura, M. Eiraku, K. Murakami, T. Aramaki, A. Nishiyama, K. Muguruma, T. Nakano, H. Suga, M. Ueno, T. Ishizaki, H. Suemori, S. Narumiya, H. Niwa, Y. Sasai, Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 225–239 (2010).
3. K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. I. Nishikawa, K. Muguruma, Y. Sasai, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 681–686 (2007).
4. 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).
5. J. Itskovitz-Eldor, M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, N. Benvenisty, Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. *Molecular Medicine* **6**, 88–95 (2000).
6. J. S. Odorico, D. S. Kaufman, J. A. Thomson, Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells* **19**, 193–204 (2001).
7. K. A. D’Amour, A. D. Agulnick, S. Eliazar, O. G. Kelly, E. Kroon, E. E. Baetge, Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1534–1541 (2005).
8. L. Rambhatla, C. P. Chiu, P. Kundu, Y. Peng, M. K. Carpenter, Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant.* **12**, 1–11 (2003).
9. Z. Song, J. Cai, Y. Liu, D. Zhao, J. Yong, S. Duo, X. Song, Y. Guo, Y. Zhao, H. Qin, X. Yin, C. Wu, J. Che, S. Lu, M. Ding, H. Deng, Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* **19**, 1233–1242 (2009).
10. J. Cai, Y. Zhao, Y. Liu, F. Ye, Z. Song, H. Qin, S. Meng, Y. Chen, R. Zhou, X. Song, Y. Guo, M. Ding, H. Deng, Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* **45**, 1229–1239 (2007).
11. K. Si-Tayeb, F. K. Noto, M. Nagaoka, J. Li, M. A. Battle, C. Duris, P. E. North, S. Dalton, S. A. Duncan, Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* **51**, 297–305 (2010).
12. K. Takayama, M. Inamura, K. Kawabata, M. Sugawara, K. Kikuchi, M. Higuchi, Y.

- Nagamoto, H. Watanabe, K. Tashiro, F. Sakurai, T. Hayakawa, M. K. Furue, H. Mizuguchi, Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J. Hepatol.* **57**, 628–636 (2012).
13. K. Si-Tayeb, F. P. Lemaigre, S. A. Duncan, Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189 (2010).
 14. K. Sakabe, T. Takebe, A. Asai, Organoid Medicine in Hepatology. *Clin. Liver Dis. (Hoboken)* **15**, 3–8 (2020).
 15. T. Touboul, S. Chen, C. C. To, S. Mora-Castilla, K. Sabatini, R. H. Tukey, L. C. Laurent, Stage-specific regulation of the WNT/ β -catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes. *J. Hepatol.* **64**, 1315–1326 (2016).
 16. K. Takayama, K. Kawabata, Y. Nagamoto, K. Kishimoto, K. Tashiro, F. Sakurai, M. Tachibana, K. Kanda, T. Hayakawa, M. K. Furue, H. Mizuguchi, 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* **34**, 1781–1789 (2013).
 17. S. Collardeau-Frachon, J. Y. Scoazec, Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *Anatomical Record* **291**, 614–627 (2008).
 18. A. Soto-Gutierrez, A. Gough, L. A. Verneti, D. L. Taylor, S. P. Monga, Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: The potential of microphysiology systems. *Exp. Biol. Med.* **242**, 1605–1616 (2017).
 19. M. A. McNiven, A. W. Wolkoff, A. Hubbard, A stimulus needed for the study of membrane traffic in hepatocytes. *Hepatology* **50**, 345–348 (2009).
 20. J. M. DeSesso, Vascular ontogeny within selected thoracoabdominal organs and the limbs. *Reproductive Toxicology* **70**, 3–20 (2017).
 21. H. Zhang, W. Pu, X. Tian, X. Huang, L. He, Q. Liu, Y. Li, L. Zhang, L. He, K. Liu, A. Gillich, B. Zhou, Genetic lineage tracing identifies endocardial origin of liver vasculature. *Nat. Genet.* **48**, 537–543 (2016).
 22. F. Shalaby, J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.-F. Wu, M. L. Breitman, A. C. Schuh, Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62–66 (1995).
 23. T. Takahashi, M. Shibuya, The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC- γ pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **14**, 2079–2089 (1997).
 24. K. Matsumoto, H. Yoshitomi, J. Rossant, K. S. Zaret, Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science (1979)* **294**, 559–563 (2001).
 25. O. Goldman, S. Han, M. Sourrisseau, N. Dziedzic, W. Hamou, B. Corneo, S. D’Souza, T.

- Sato, D. N. Kotton, K. D. Bissig, T. Kalir, A. Jacobs, T. Evans, M. J. Evans, V. Gouon-Evans, KDR identifies a conserved human and murine hepatic progenitor and instructs early liver development. *Cell Stem Cell* **12**, 748–760 (2013).
26. A. Kiso, Y. Toba, S. Tsutsumi, S. Deguchi, K. Igai, S. Koshino, Y. Tanaka, K. Takayama, H. Mizuguchi, Tolloid-Like 1 Negatively Regulates Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Through Transforming Growth Factor Beta Signaling. *Hepatol. Commun.* **4**, 255–267 (2020).
 27. O. Goldman, S. Han, W. Hamou, V. Jodon De Villeroche, G. Uzan, H. Lickert, V. Gouon-Evans, Endoderm generates endothelial cells during liver development. *Stem Cell Reports* **3**, 556–565 (2014).
 28. M. Hofer, M. P. Lutolf, Engineering organoids. *Nat. Rev. Mater.* **6**, 402–420 (2021).
 29. S. J. Mun, J. S. Ryu, M. O. Lee, Y. S. Son, S. J. Oh, H. S. Cho, M. Y. Son, D. S. Kim, S. J. Kim, H. J. Yoo, H. J. Lee, J. Kim, C. R. Jung, K. S. Chung, M. J. Son, Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J. Hepatol.* **71**, 970–985 (2019).
 30. C. B. Severn, A morphological study of the development of the human liver. I. Development of the hepatic diverticulum. *American Journal of Anatomy* **131**, 133–158 (1971).
 31. A. Abu Rmilah, W. Zhou, E. Nelson, L. Lin, B. Amiot, S. L. Nyberg, Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **8**, 1–46 (2019).
 32. J. G. Camp, K. Sekine, T. Gerber, H. Loeffler-Wirth, H. Binder, M. Gac, S. Kanton, J. Kageyama, G. Damm, D. Seehofer, L. Belicova, M. Bickle, R. Barsacchi, R. Okuda, E. Yoshizawa, M. Kimura, H. Ayabe, H. Taniguchi, T. Takebe, B. Treutlein, Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* **546**, 533–538 (2017).
 33. S. J. I. Blackford, T. T. L. Yu, M. D. A. Norman, A. M. Syanda, M. Manolakakis, D. Lachowski, Z. Yan, Y. Guo, E. Garitta, F. Riccio, G. M. Jowett, S. S. Ng, S. Vernia, A. E. del Río Hernández, E. Gentleman, S. T. Rashid, RGD density along with substrate stiffness regulate hPSC hepatocyte functionality through YAP signalling. *Biomaterials* **293** (2023).
 34. L. Lorenz, J. Axnick, T. Buschmann, C. Henning, S. Uerner, S. Fang, H. Nurmi, N. Eichhorst, R. Holtmeier, K. Bódis, J. H. Hwang, K. Müssig, D. Eberhard, J. Stypmann, O. Kuss, M. Roden, K. Alitalo, D. Häussinger, E. Lammert, Mechanosensing by $\beta 1$ integrin induces angiocrine signals for liver growth and survival. *Nature* **562**, 128–132 (2018).
 35. Dongeun Huh, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martín Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, Donald E. Ingber, Reconstituting Organ-Level Lung. *Science* 1662–1668 (2010).
 36. B. A. Hassell, G. Goyal, E. Lee, A. Sontheimer-Phelps, O. Levy, C. S. Chen, D. E. Ingber, Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. *Cell Rep.* **21**, 508–516 (2017).

37. K. I. Kamei, Y. Koyama, Y. Tokunaga, Y. Mashimo, M. Yoshioka, C. Fockenberg, R. Mosbergen, O. Korn, C. Wells, Y. Chen, Characterization of Phenotypic and Transcriptional Differences in Human Pluripotent Stem Cells under 2D and 3D Culture Conditions. *Adv Healthc. Mater.* **5**, 2951–2958 (2016).
38. K. Shimizu, A. Shunori, K. Morimoto, M. Hashida, S. Konishi, Development of a biochip with serially connected pneumatic balloons for cell-stretching culture. *Sens. Actuators B Chem.* **156**, 486–493 (2011).
39. K. Yoshimoto, N. Minier, J. Yang, S. Imamura, K. Stocking, J. Patel, S. Terada, Y. Hirai, K. Kamei, Recapitulation of Human Embryonic Heartbeat to Promote Differentiation of Hepatic Endoderm to Hepatoblasts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–11 (2020).
40. D. Huh, H. J. Kim, J. P. Fraser, D. E. Shea, M. Khan, A. Bahinski, G. A. Hamilton, D. E. Ingber, Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat. Protoc.* **8**, 2135–2157 (2013).
41. K. I. Kamei, Y. Mashimo, M. Yoshioka, Y. Tokunaga, C. Fockenberg, S. Terada, Y. Koyama, M. Nakajima, T. Shibata-Seki, L. Liu, T. Akaike, E. Kobatake, S. E. How, M. Uesugi, Y. Chen, Microfluidic-Nanofiber Hybrid Array for Screening of Cellular Microenvironments. *Small* **13**, 1–10 (2017).
42. C. T. Ho, R. Z. Lin, W. Y. Chang, H. Y. Chang, C. H. Liu, Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab. Chip* **6**, 724–734 (2006).
43. P. Godoy, N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J. G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Böttger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C. S. Cho, Y. J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M. T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. P. Goldring, M. J. Gómez-Lechón, G. M. M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Häussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhütter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J. M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. Lecluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. K. Stelzer, B. Stieger, R. Stöber, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T. S. Weiss, A. Widera, C. G. Woods, J. J. Xu, K. M. Yarborough, J. G. Hengstler, *Recent Advances in 2D and 3D in Vitro Systems Using Primary Hepatocytes, Alternative Hepatocyte Sources and Non-Parenchymal Liver Cells and Their Use in Investigating Mechanisms of Hepatotoxicity, Cell Signaling and ADME* (2013)vol. 87.
44. D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem.* **70**, 4974–4984 (1998).

45. E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science* **276**, 779–781 (1997).
46. K. Kamei, Y. Mashimo, Y. Koyama, C. Fockenberg, M. Nakashima, M. Nakajima, J. Li, Y. Chen, 3D printing of soft lithography mold for rapid production of polydimethylsiloxane-based microfluidic devices for cell stimulation with concentration gradients. *Biomed. Microdevices* **17**, 36 (2015).
47. Y. Mashimo, M. Yoshioka, Y. Tokunaga, C. Fockenberg, S. Terada, Y. Koyama, T. Shibata-Seki, K. Yoshimoto, R. Sakai, H. Hakariya, L. Liu, T. Akaike, E. Kobatake, S.-E. How, M. Uesugi, Y. Chen, K. Kamei, Fabrication of a Multiplexed Artificial Cellular MicroEnvironment Array. *Journal of Visualized Experiments* **2018** (2018).
48. S. Dogru, B. Aksoy, H. Bayraktar, B. E. Alaca, Poisson’s ratio of PDMS thin films. *Polym. Test* **69**, 375–384 (2018).
49. M. Kim, B. U. Moon, C. H. Hidrovo, Enhancement of the thermo-mechanical properties of PDMS molds for the hot embossing of PMMA microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **23** (2013).
50. S. A. Maas, B. J. Ellis, G. A. Ateshian, J. A. Weiss, FEBio: Finite elements for biomechanics. *J. Biomech. Eng.* **134**, 1–10 (2012).
51. K. Kamei, M. Yoshioka, S. Terada, Y. Tokunaga, Y. Chen, Three-dimensional cultured liver-on-a-Chip with mature hepatocyte-like cells derived from human pluripotent stem cells. *Biomed Microdevices* **21**, 73 (2019).
52. A. E. Carpenter, T. R. Jones, M. R. Lamprecht, C. Clarke, I. H. Kang, O. Friman, D. A. Guertin, J. H. Chang, R. A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland, D. M. Sabatini, CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome. Biol.* **7** (2006).
53. N. Otsu, A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans Syst. Man. Cybern.* **9**, 62–66 (1979).
54. D. Kim, B. Langmead, S. L. Salzberg, HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* **12**, 357–360 (2015).
55. S. X. Ge, E. W. Son, R. Yao, iDEP: An integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* **19**, 1–24 (2018).
56. Y. Zhou, B. Zhou, L. Pache, M. Chang, A. H. Khodabakhshi, O. Tanaseichuk, C. Benner, S. K. Chanda, Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10** (2019).
57. L. Liu, K. Kamei, M. Yoshioka, M. Nakajima, J. Li, N. Fujimoto, S. Terada, Y. Tokunaga, Y. Koyama, H. Sato, K. Hasegawa, N. Nakatsuji, Y. Chen, Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells. *Biomaterials* **124**, 47–54 (2017).

58. N. R. F. Hannan, C. P. Segeritz, T. Touboul, L. Vallier, Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **8**, 430–437 (2013).
59. M. Xu, J. He, C. Zhang, J. Xu, Y. Wang, Strategies for derivation of endothelial lineages from human stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 1–14 (2019).
60. S. Okuyama, F. Kawamura, M. Kubiura, S. Tsuji, M. Osaki, H. Kugoh, M. Oshimura, Y. Kazuki, M. Tada, Real-time fluorometric evaluation of hepatoblast proliferation in vivo and in vitro using the expression of CYP3A7 coding for human fetus-specific P450. *Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, 1–13 (2020).
61. S. Krusekopf, I. Roots, U. Kleeberg, Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *Eur. J. Pharmacol.* **466**, 7–12 (2003).
62. N. Tanimizu, A. Miyajima, Molecular Mechanism of Liver Development and Regeneration. *Int. Rev. Cytol.* **259**, 1–48 (2007).
63. H. Han, J. W. Cho, S. Lee, A. Yun, H. Kim, D. Bae, S. Yang, C. Y. Kim, M. Lee, E. Kim, S. Lee, B. Kang, D. Jeong, Y. Kim, H. N. Jeon, H. Jung, S. Nam, M. Chung, J. H. Kim, I. Lee, TRRUST v2: An expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res.* **46**, D380–D386 (2018).
64. J. A. D'Alessio, R. Ng, H. Willenbring, R. Tjian, Core promoter recognition complex changes accompany liver development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **108**, 3906–3911 (2011).
65. N. J. Sullivan, A. K. Sasser, A. E. Axel, F. Vesuna, V. Raman, N. Ramirez, T. M. Oberyszyn, B. M. Hall, Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 2940–2947 (2009).
66. R. Fang, G. Zhang, Q. Guo, F. Ning, H. Wang, S. Cai, J. Du, Nodal promotes aggressive phenotype via Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in murine melanoma. *Cancer Lett.* **333**, 66–75 (2013).
67. T. Shirakihara, K. Horiguchi, K. Miyazawa, S. Ehata, T. Shibata, I. Morita, K. Miyazono, M. Saitoh, TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Journal* **30**, 783–795 (2011).
68. S. Bhatia, P. Wang, A. Toh, E. W. Thompson, New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 1–18 (2020).
69. A. Suárez-Causado, D. Caballero-Díaz, E. Bertrán, C. Roncero, A. Addante, M. García-Álvaro, M. Fernández, B. Herrera, A. Porras, I. Fabregat, A. Sánchez, HGF/c-Met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidyl inositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1853**, 2453–2463 (2015).
70. W. A. Carlezon, R. S. Duman, E. J. Nestler, The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* **28**,

- 436–445 (2005).
71. C. E. Paulsen, J. P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, D. Julius, Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **520**, 511–517 (2015).
 72. S. M. Swain, S. R. Vigna, R. A. Liddle, TRPV4 channel opening mediates pressure-induced pancreatitis initiated by Piezo1 activation Graphical abstract The Journal of Clinical Investigation. *J. Clin. Invest.* **130**, 2527–2541 (2020).
 73. S. K. Sonkusare, A. D. Bonev, J. Ledoux, W. Liedtke, M. I. Kotlikoff, T. J. Heppner, D. C. Hill-Eubanks, M. T. Nelson, Elementary Ca²⁺ Signals Through Endothelial TRPV4 Channels Regulate Vascular Function. *Science* **336**, 597–601 (2012).
 74. A. H. Lewis, A. F. Cui, M. F. McDonald, J. Grandl, Transduction of Repetitive Mechanical Stimuli by Piezo1 and Piezo2 Ion Channels. *Cell Rep.* **19**, 2572–2585 (2017).
 75. M. Shigekawa, T. Iwamoto, Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange molecular and pharmacological aspects. *Circ. Res.* **88**, 864–876 (2001).
 76. K. Rahate, L. K. Bhatt, K. S. Prabhavalkar, SERCA stimulation: A potential approach in therapeutics. *Chem. Biol. Drug Des.* **95**, 5–15 (2020).
 77. J. Lotto, S. Drissler, R. Cullum, W. Wei, M. Setty, E. M. Bell, S. C. Boutet, S. Nowotschin, Y. Y. Kuo, V. Garg, D. Pe'er, D. M. Church, A. K. Hadjantonakis, P. A. Hoodless, Single-Cell Transcriptomics Reveals Early Emergence of Liver Parenchymal and Non-parenchymal Cell Lineages. *Cell* **183**, 702-716.e14 (2020).
 78. B. Li, Y. W. Zheng, Y. Sano, H. Taniguchi, Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PLoS One* **6** (2011).
 79. S. Y. Won, J. J. Park, E. Y. Shin, E. G. Kim, PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4–CREB axis. *Exp. Mol. Med.* **51** (2019).
 80. J. H. Ma, L. Qin, X. Li, Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Communication and Signaling* **18**, 1–13 (2020).
 81. A. Elosegui-Artola, R. Oria, Y. Chen, A. Kosmalska, C. Pérez-González, N. Castro, C. Zhu, X. Trepát, P. Roca-Cusachs, Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nat. Cell Biol.* **18**, 540–548 (2016).
 82. Q. Zhao, H. Zhou, S. Chi, Y. Wang, J. Wang, J. Geng, K. Wu, W. Liu, T. Zhang, M. Q. Dong, J. Wang, X. Li, B. Xiao, Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature* **554**, 487–492 (2018).
 83. S. Murase, R. D. McKay, Neuronal activity-dependent STAT3 localization to nucleus is dependent on Tyr-705 and Ser-727 phosphorylation in rat hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* **39**, 557–565 (2014).

84. M. T. Miras-Portugal, R. Gomez-Villafuertes, J. Gualix, J. I. Diaz-Hernandez, A. R. Artalejo, F. Ortega, E. G. Delicado, R. Perez-Sen, Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* **104**, 243–254 (2016).
85. M. Sheng, M. A. Thompson, M. E. Greenberg, CREB: A Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**, 1427–1430 (1991).
86. S. Pildner von Steinburg, A.-L. Boulesteix, C. Lederer, S. Grunow, S. Schiermeier, W. Hatzmann, K.-T. M. Schneider, M. Daumer, What is the “normal” fetal heart rate? *PeerJ* **1**, e82 (2013).
87. F. Galvagni, M. Orlandini, S. Oliviero, Role of the AP-1 transcription factor FOSL1 in endothelial cell adhesion and migration. *Cell Adh. Migr.* **7**, 408–411 (2013).
88. E. Pradines, D. Loubet, B. Schneider, J. M. Launay, O. Kellermann, S. Mouillet-Richard, CREB-dependent gene regulation by prion protein: Impact on MMP-9 and β -dystroglycan. *Cell Signal.* **20**, 2050–2058 (2008).
89. L. Przybyla, J. M. Muncie, V. M. Weaver, Mechanical Control of Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in Development and Cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 527–554 (2016).
90. L. He, G. Si, J. Huang, A. D. T. Samuel, N. Perrimon, Mechanical regulation of stem-cell differentiation by the stretch-activated Piezo channel. *Nature* **555**, 103–106 (2018).
91. M. B. Baghdadi, R. M. Houtekamer, L. Perrin, A. Rao-Bhatia, M. Whelen, L. Decker, M. Bergert, C. Pérez-González, R. Bouras, G. Gropplero, A. K. H. Loe, A. Afkhami-Poostchi, X. Chen, X. Huang, S. Descroix, J. L. Wrana, A. Diz-Muñoz, M. Gloerich, A. Ayyaz, D. Matic Vignjevic, T.-H. Kim, PIEZO-dependent mechanosensing is essential for intestinal stem cell fate decision and maintenance. *Science* **386** (2024).
92. K. D. Tremblay, K. S. Zaret, Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev. Biol.* **280**, 87–99 (2005).
93. A. Palaria, J. R. Angelo, T. M. Guertin, J. Mager, K. D. Tremblay, Patterning of the hepatopancreatobiliary boundary by BMP reveals heterogeneity within the murine liver bud. *Hepatology* **68**, 274–288 (2018).

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員である京都大学医生物学研究所 教授の安達 泰治 先生には、博士研究者としてだけでなく、一社会人としての基本的な心構えや姿勢、必要な能力について、厚いご指導を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、本論文の執筆にあたり、京都大学生命科学研究科の豊島 文子 先生、野々村 恵子 先生、坂本 雅行 先生には、貴重なご助言を賜りました。深く感謝を申し上げます。New York University Abu Dhabi, Associate Professor の亀井 謙一郎 先生には、マイクロピペットも握ったことがないような未熟な学部 1 回生の頃より、本研究の遂行に必要な知識や技術、研究姿勢について、ご指導いただきました。New York University Abu Dhabi にご異動した後も、京都大学において私が研究を続けることができるように格別のご配慮をいただきました。多大なるご迷惑をおかけしましたが、これまでご指導していただいたことを深く御礼申し上げます。また、学部 1 回生の頃より、京都大学物質-細胞システム拠点 (iCeMS) 亀井チーム 研究員 寺田 志穂 氏には、細胞培養の方法から研究室の基本的な使い方まで、根気よくご指導いただきました。深く感謝申し上げます。医生物学研究所 助教の牧 功一郎 先生には、研究だけではなく、私生活に至るまで、快く親身に相談に乗っていただきました。その都度、適切なご助言をいただき、大変救われました。深く感謝申し上げます。New York University Abu Dhabi 研究員の今村 聡 氏には、本研究のさきがけとなる研究を 3 回生に始めたころから、些細なことでもいつも快く議論いただきました。深く御礼申し上げます。iCeMS 古川 修平 教授には、iCeMS において実験を続けるにあたり、格別のご配慮を賜りました。深く感謝申し上げます。

さらに、医生物学研究所バイオメカニクス研究室の皆さまと iCeMS 亀井チームの皆さまには、大変お世話になりました。深く御礼申し上げます。各研究室の進捗発表では、Rodi Kado Abdalkader 先生、Okeyo Kennedy 先生、亀尾 佳貴 先

生、金 英寛 先生、竹田 宏典 先生には、とりわけ数多くのご助言と激励のお言葉を頂きました。須長 純子 氏には、技術的な助言や補助などを多大に頂きました。1 学年先輩の福手 淳平 氏と横山 優花 氏には、研究や本論文の執筆に関して多大なご助言をいただきました。iCeMS 亀井チームの博士後期課程の同級生の陸田 香織 氏は、切磋琢磨する仲間として大いに刺激を与えてくださいました。iCeMS 亀井チーム 井内 雅恵 氏には、2 回生の頃より研究をサポートいただいただけではなく、年度末の研究費に関して、いつも我儘を聞いていただきました。また、医生物研究所の平良 美智代 氏には、研究費の手続きなど、多くの煩雑な事務手続きなどをしていただきました。皆様に深く御礼申し上げます。

iCeMS 共通機器の使用にあたり、藤原 敬宏 先生、本間 貴之 先生には、多大なるご援助を賜りました。深く感謝申し上げます。本研究のフローサイトメトリー解析において、磯村 彰宏 先生、小原 乃也 氏、童 友 氏にご指導いただき、RNA-seq 解析において、近藤 武史 先生、山銅 ゆかり氏にご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

京都大学医生物学研究所 助教の北畠 真 先生には、学部 1 回生から 2 回生にかけて、研究に対する誠実な姿勢や基礎的な実験技術についてご指導いただきました。特に、研究遂行にあたり、時間を有効に使うという研究姿勢は今でも私の根幹となっております。深く感謝申し上げます。

最後に、ここまでサポートしていただいた家族に感謝を示して結びとします。

2025 年 2 月 吉本 昂希

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Koki Yoshimoto, Koichiro Maki, Taiji Adachi, and Ken-ichiro Kamei

Cyclic Stretching Enhances Angiocrine Signals at Liver Bud Stage from Human Pluripotent Stem Cells in Two-Dimensional Culture

Tissue Engineering Part A, vol. 30, pp.426-439 (2024).

DOI: 10.1089/ten.tea.2023.0148