

両親媒性高分子を用いる細胞凝集体の形成と幹細胞の分化制御

岩田博夫¹⁾、寺村裕治²⁾、苗村祥太¹⁾、山本英樹¹⁾

Hiroo Iwata, Yuji Teramura, Syota Namura, Hideki Yamamoto

¹⁾京都大学再生医科学研究所

²⁾京都大学放射性同位元素総合センター

1. 緒言

多分化能を持つ胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）などの幹細胞は再生医療への応用が期待されており、これらの幹細胞を様々な組織や臓器へと分化を制御する手法の確立が近年求められている[1-3]。特に、ES 細胞と基層表面材料との相互作用が、ES 細胞の分化に及ぼす影響についての研究が多くの研究者によって行われている[4-8]。最近では、iPS 細胞も作製され、制御された分化誘導法は、非常に重要なものになってきている。例えば、種々の成長因子などを培養液中に添加して、幹細胞の分化誘導が試みられている[9,10]。また、種々の高分子やコラーゲン、ラミニンなどの細胞外マトリックスを基板上に固定化したアレイを用いて、その上に接着した ES 細胞の接着及び成長を観察した実験が行われている[4,7]。これらの研究では、添加因子と細胞外マトリックス、フィーダー細胞の組み合わせにより、幹細胞の分化誘導を試みている報告例である。しかしながら、ES 細胞間やヘテロ細胞間の相互作用による影響はほとんど考慮していない。

周囲に存在する細胞が細胞の生死、増殖、分化などに大きな影響を与えることは良く知られている。このような現象を利用することで、細胞間の相互作用を調べることができる。例えば、基板へ接着させた単一細胞に対して、その細胞から一定の距離内に接着させた細胞の有無によって細胞の生死が決定される。また、マイクロチャンバー内に未分化ES細胞と分化ES細胞を封入することで、細胞間相互作用により未分化ES細胞が神経系へ分化誘導されることが報告されている[11]。このように、細胞と細胞どうしの直接の相互作用の研究についての報告はあるものの、いまだ十分な研究が行われていない。また、その方法の開発も行われていない。

我々のグループでは、フィーダー細胞と ES 細胞との細胞間相互作用を調べてきた。基板上にスポットした細胞上に ES 細胞を播種し、細胞が ES 細胞の分化に及ぼす影響について調べた[12]。金基板上に、PA6 細胞（マウス頭蓋骨髄由来

細胞)、COS-1 細胞(CV-1 細胞由来)、HUVEC 細胞(ヒトさい帯静脈血管内皮細胞)を固定したスポット状のアレイを作成し、その上にマウス ES 細胞を播種し、数日間の培養後、マウス ES 細胞の分化を観察した。PA6 細胞は ES 細胞を神経系への分化を促進し、COS-1 細胞、HUVEC 細胞では、分化が見られないことがわかった。このように細胞間相互作用は、ES 細胞の分化誘導へ非常に影響を与えることが分かる。

本研究では、細胞間相互作用を調べる新しい手法を提案する。両親媒性高分子[13-15]とビオチンとストレプトアビジンの強力な結合により細胞間の接着を引き起こし、異なる二種類の細胞の配列を試みた。具体的には、ビオチン基を末端に有するポリエチレングリコール結合脂質(ビオチン-ポリエチレングリコール(PEG)脂質、スキーム 1(a))にて細胞を表面修飾してビオチン基を導入し、他方の細胞には、同処理を行った後、ストレプトアビジンを反応させて、ストレプトアビジンを細胞表面に固定した。両者を混合することによって異なる細胞間の接着を引き起こした(スキーム 1(b))。この手法を利用し、マウス ES 細胞の胚様体周囲に異種細胞を固定し、細胞間相互作用による ES 細胞の分化の様子を経時的に観察した。胚様体中の ES 細胞の分化状態を調べ、時空間的な変化を調べ、細胞間相互作用の解析に取り組んだ。

2. 実験

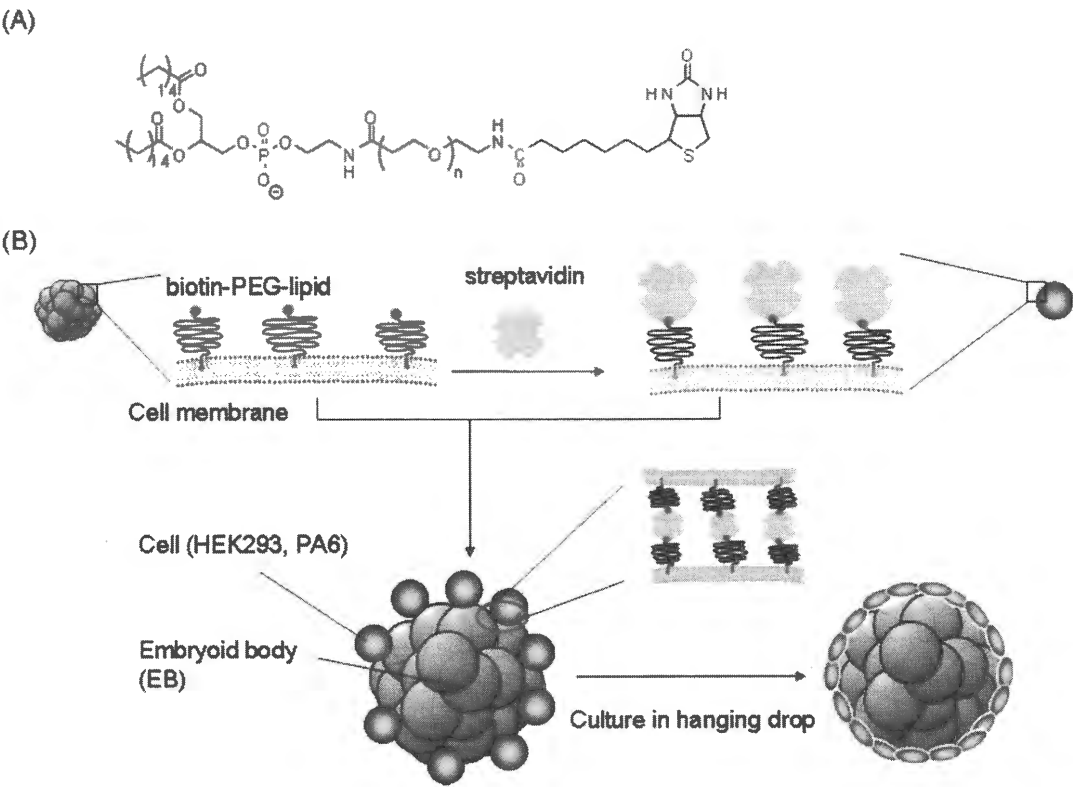
2-1. 細胞の表面修飾と細胞間相互作用の観察

本実験で使用したビオチンを PEG 鎖末端に有する PEG 脂質(ビオチン PEG 脂質)の構造式をスキーム 1(a)に示した。疎水部分のリン脂質が細胞の脂質二重層と相互作用して、細胞表面にビオチン PEG 脂質を導入することができる(スキーム 1(b))。ヒト胎児腎細胞(HEK293)とヒト T リンパ球性白血球由来細胞(CCRF-CEM)をそれぞれビオチン PEG 脂質溶液(250 $\mu\text{g/mL}$ in PBS)に懸濁し、室温で 30 分間振とうした。ハンクス緩衝液で洗浄後、細胞膜にビオチン PEG 脂質を導入した細胞を得た。さらにビオチン PEG 脂質を導入した CCRF-CEM を Fluorescein isothiocyanate (FITC)標識ストレプトアビジン溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)に懸濁して、4°C で 10 分間振とうし、ストレプトアビジンを細胞表面に導入した。それぞれの細胞(1.0×10^5 cells/mL)を 1:1 の比率で混合した。混合液を 20 μL 取り hanging drop 法にて培養し(37°C, 5% CO_2)、経時的に共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

2-2. 異種細胞間による ES 細胞の分化誘導

マウス ES 細胞から構成される胚様体表面への細胞の固定化は、スキーム 1(b)

に示す方法により行った。マウス ES 細胞[16]を培地(GMEM, 10%KSR, 1%FBS)で 5.0×10^3 cells/mL に懸濁し 20 μ L ずつ hanging drop 法にて 3 日間培養し(37°C, 5% CO₂)、胚様体を形成した。ビオチン PEG 脂質を導入した胚様体とストレプトアビジンを細胞表面に導入した GFP 発現 HEK293 細胞あるいは Celltracker® で緑色蛍光標識したマウス頭蓋骨由来ストローマ細胞 (PA6) [17,18] と混合し胚様体周囲に細胞を接着させた。その後、浮遊培養によって培養し、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した。また、経時的に胚様体の凍結切片(厚さ 6 μ m)を作製し、免疫染色法から神経細胞への分化状態を調べた。本実験では、2種類の神経マーカー(Nestin (神経前駆細胞マーカー)、TuJ1 (成熟神経細胞マーカー))により免疫染色を行った。



Scheme 1. (A) Chemical structure of biotin-PEG-conjugated DPPE (biotin-PEG-lipid). (B) Scheme for the immobilization of streptavidin-immobilized cells on the surface of biotin-PEG-lipid-modified EBs. Biotin-PEG-lipid has two long alkyl chains and is incorporated into the lipid bilayer of the cell membrane via hydrophobic interaction. A layer of streptavidin was present on the biotin-PEG-lipid-modified cell surface. After mixing streptavidin-immobilized cells and biotin-PEG-lipid-modified EBs, they were hanging drop cultured in medium at 37°C.

3. 結果

3-1. PEG 脂質による細胞間相互作用の観察

まず、細胞表面に導入したビオチン PEG 脂質とストレプトアビジンにより細胞間の接着が引き起こされることを調べるために、HEK293 細胞と CCRF-CEM 細胞を用いて単個細胞レベルで細胞間接着を検討した。ビオチン PEG 脂質を表面修飾した HEK293 細胞と FITC 標識したストレプトアビジンで表面修飾した CCRF-CEM 細胞を混合し、浮遊培養により培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図 1)。混合直後は HEK293 細胞と CCRF-CEM 細胞間の相互作用はみられず、接着はほとんど見られなかったが、15 分後にはそれぞれの細胞が交互に並んでいる様子が見られた。このことは、PEG 脂質を利用して細胞膜上へ導入されたビオチン基とストレプトアビジン間の相互作用により、異なる細胞間の接着が引き起こされたものと考えられた。

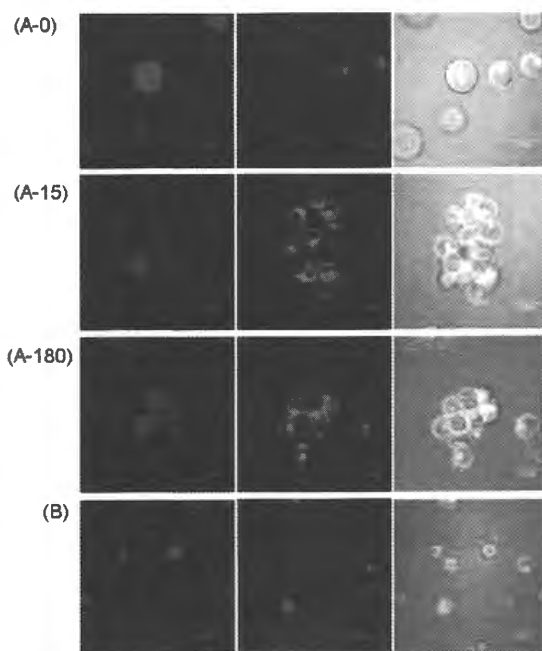


Figure 1. Confocal laser scanning and differential interference microscopic images of the mixed cells. (A) GFP-HEK293 and CCRF-CEM cells labeled with PKH26 (red) were modified with biotin-PEG-lipid and streptavidin-biotin-PEG-lipid, respectively. A-0, A-30, and A-180 are images taken 0, 15, and 180 min after mixing the cells in culture. (B) Either the GFP-HEK or CCRF-CEM cells were not treated with biotin-PEG-lipid or streptavidin. The image was taken 3 hr of culture.

次に、同様にして PEG 脂質を利用して、マウス ES 細胞の胚様体表面に HEK293 細胞 (GFP 発現) あるいは PA6 細胞 (緑色蛍光標識) を固定し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図 2)。ES 細胞の凝集体である胚様体の大きさは、およそ

200 μm である。全ての胚様体表面に細胞が固定化されていることが分かる。このことは、ビオチン PEG 脂質とストレプトアビジンを用いることで、HEK293 細胞及び PA6 細胞のいずれの細胞において、胚様体表面へ固定することが可能であることを示す結果である。この胚様体を浮遊培養の状態で行い、観察した (図 3)。培養 3 日後では、HEK293 細胞は胚様体表面を取り囲むように伸展していた (図 3 (A))。他方、PA6 細胞では胚様体表面に接着しているものの伸展はみられなかった (図 3 (B))。培養 5、9 日後では、HEK293 細胞は胚様体の表面上を分裂・伸展し、被覆する様子が観察された。しかしながら、PA6 細胞では細胞の伸展はみられず、胚様体内部に侵入している像が見られた。

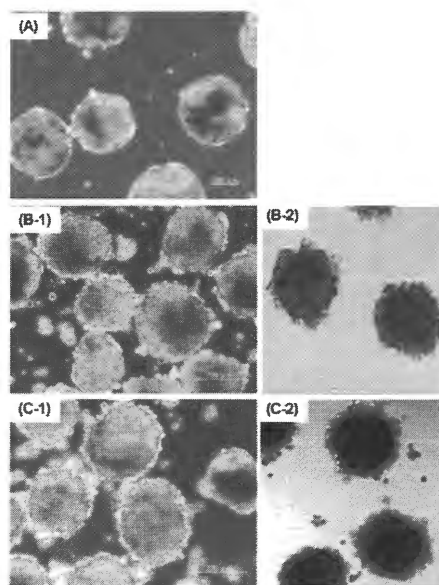


Figure 2. Phase-contrast and confocal laser scanning microscopic images of (A) EBs, (B-1, B-2) GFP-HEK cells immobilized on EBs, and (C-1, C-2) PA6 cells immobilized on EBs immediately after preparation. The PA6 cells were previously labeled with PKH67 (green).

次に、それぞれの胚様体の分化状態を調べるために、凍結切片(厚さ 6 μm)を作製し、2 種類の神経マーカー(Nestin (神経前駆細胞マーカー)、TuJ1 (成熟神経細胞マーカー))により免疫染色を行った(図 4)。Hanging drop 法により作製した胚様体 (0 日目) では、Nestin と TuJ1 の発現は見られず、神経への分化はみられない。培養 3 日後の胚様体では、胚様体内部の全体に Nestin の発現が認められ、TuJ1 の発現が表面に見られた。他方、PA6 細胞を固定化した胚様体では、Nestin 及び TuJ1 の発現が局所的に見られた (矢印)。このことは、PA6 細胞と相互作用している領域から神経への分化が促進されたためと考えられる。時間の経過とともに、Nestin 及び TuJ1 の発現がより広範囲に見られ、胚様体の表面から分化が引

き起こされていた。培養 9 日後では、Nestin 及び TuJ1 の発現がさらに増加し、胚様体と PA6 細胞を固定化した胚様体間に、顕著な差は見られなかった。

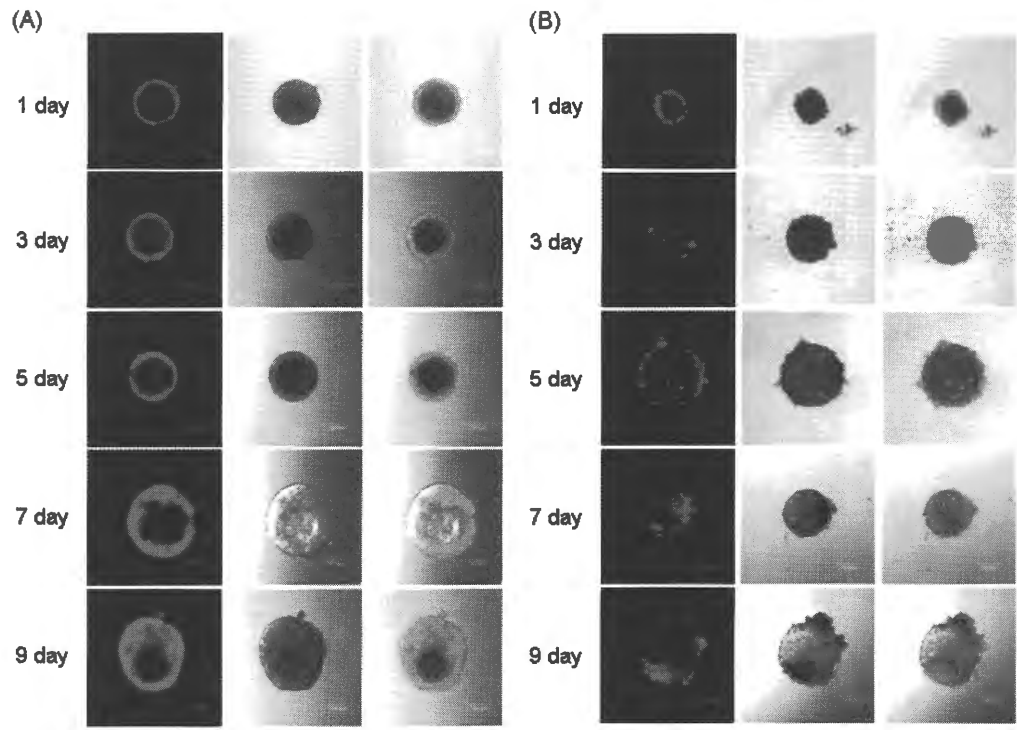


Figure 3. Morphological changes of EBs carrying (A) GFP-HEK cells or (B) PA6 cells over 9 days of hanging drop culture. The HEK and PA6 cells were immobilized on EBs through biotin and streptavidin interaction. Images were obtained with a confocal laser scanning and differential interference microscope.

他方、HEK293 細胞を固定化した胚様体では、培養 9 日目まで Nestin 及び TuJ1 の発現は全く見られなかった。このことは、HEK293 細胞と胚様体間の相互作用により、ES 細胞の分化が抑制されたためと考えられる。

4. 考察

細胞間相互作用を調べる方法は、これまでに数例報告されている [11]。しかしながら、細胞同士の直接の接触により相互作用を調べている報告は、ほとんど無い。これまでに我々は、基板上に固定化した細胞とマウス ES 細胞との相互作用を調べ、PA6 細胞と接触した場合では、神経系へ分化するが、他の細胞では、神経への分化が抑制されることを報告してきた[12]。本研究では、両親媒性の PEG 脂質により胚様体表面へ導入したビオチンとストレプトアビジンにより細胞接着を引き起こし、細胞間接着による相互作用を調べることが実現できて

いる。ビオチン PEG 脂質とストレプトアビジンにより、細胞表面を修飾することによって、異種細胞の接着を誘導できることがわかった。この手法を用いて、細胞同士の接着を意図的に行わせることが可能になり、胚様体表面へ PA6 や

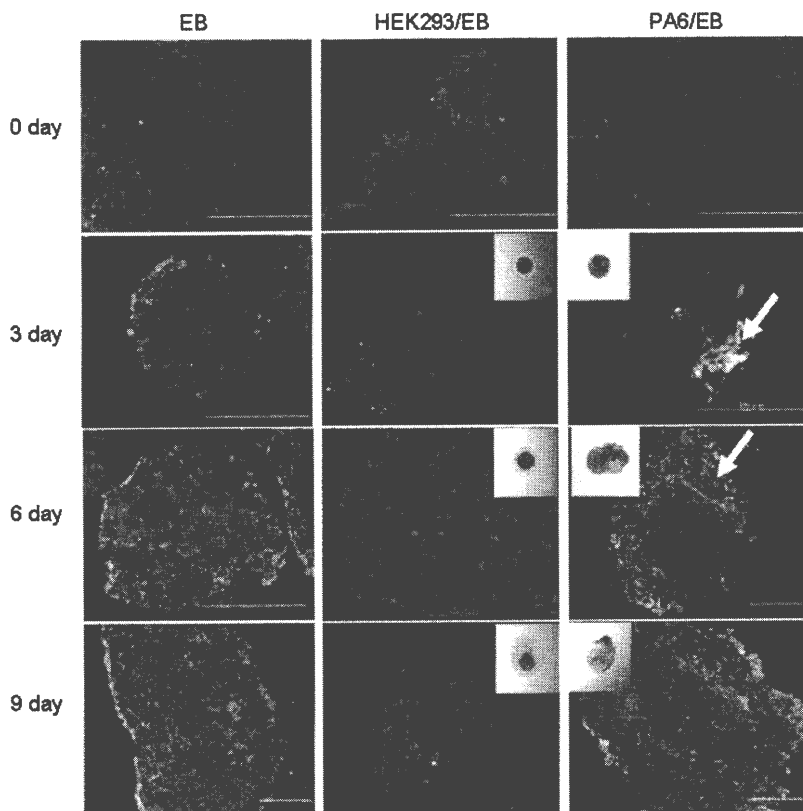


Figure 4. Immunocytochemical analyses of EBs immobilized with HEK293 and PA6 cells over 9 days of hanging drop culture. Untreated EBs were used as controls. Frozen sample sections were stained with antibodies for Nestin (red) and TuJ1 (green), which are markers of neural progenitor cells and mature neurons, respectively. Hoechst 33342 dye (blue) was used for nuclear staining. The pictures are merged images from Nestin, TuJ1, and Hoechst 33342 staining by a fluorescence microscope. The arrows indicate the local expression of Nestin and TuJ1. Insets show the confocal laser scanning images. GFP-HEK and PA6 cells labeled with PKH67 (green) were used.

HEK293細胞の固定化が可能であり、ES細胞との細胞間相互作用を調べることが可能になった。HEK293細胞では、胚様体周囲へ固定化後、伸展・増殖し、胚様体周辺を被覆したものの、PA6細胞では、EB表面上での伸展はあまりみられず、胚様体表面は被覆されていないものの、胚様体内部へ細胞が移動する現象が認められた。この挙動の違いについては、詳しい理由については分かっていない。免疫染色像から、HEK293細胞で被覆した胚様体では、神経系マーカーである Nestin及びTuJ1の発現が見られず、神経系への分化が抑制されていることが示唆された。これらの現象は、以前報告したように、HUVECやCOS-1でも認められ

た現象である。どのような相互作用が関与しているのかは、今後詳細に調べる必要がある。一方、PA6細胞で処理した胚様体では、NestinおよびTuJ1の強力な発現が局所的に見られた。胚様体表面上に接着したPA6細胞がマウスES細胞の神経系への分化を促進したと考えらる。

5. 結論

以上により、両親媒性高分子及びビオチン、ストレプトアビジンを用いることによって、異なる細胞同士の接着が可能となり、細胞間相互作用を調べることが可能になった。ES細胞に異種細胞を接着させ、その分化状態を経時観察することにより、細胞間の相互作用を観察することができた。

参考文献

1. Keller, G. and Snodgrass, H.R. Human embryonic stem cells: the future is now. *Nat Med* 1999;5:151-152.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
4. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:863-866.
5. Barberi T, Bradbury M, Dincer Z, Panagiotakos G, Socci, ND, Studer L. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 2007;13:642-648.
6. Barberi T, Wills LM, Socci ND, Studer L. Derivation of Multipotent Mesenchymal Precursors from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Med.* 2005;2:554-560.
7. Flaim CJ, Chien S, Bhatia SN. An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. *Nat Methods* 2005;2:119-125.
8. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett*, 2001;497:15-19.

9. Lang KJ, Rathjen J, Vassilieva S, Rathjen PD. Differentiation of embryonic stem cells to a neural fate: a route to re-building the nervous system? *J Neurosci Res* 2004;76:184-192.
10. Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol*. 2009;5:258-265.
11. Parekkadan B, Berdichevsky Y, Irimia D, Leeder A, Yarmush G, Toner M, et al. Cell-cell interaction modulates neuroectodermal specification of embryonic stem cells. *Neurosci Lett* 2008;438:190-195.
12. Yamazoe H, Iwata H. Cell Microarray for Screening Feeder Cells for Differentiation of Embryonic Stem Cells. *J Biosci Bioeng* 2005;100:292-296.
13. Teramura Y, Iwata H. Islet encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials* 2009;30:2270-2275.
14. Teramura Y, Iwata H. Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses *Bioconjugate Chem* 2008;19:1389-1395.
15. Teramura Y, Kaneda Y, Totani T, Iwata H. Behavior of Synthetic Polymers Immobilized on Cell Membrane *Biomaterials* 2008;29:1345-1355.
16. Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2002;22:1526-1536.
17. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000;28:31-40
18. Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:1580-1585.