

2021年5月11日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2021年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：大阪大学大学院・基礎工学研究科

職名：教授

氏名：出口 真次

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： 常在収縮力計測による多能性幹細胞の分化状態評価
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： オケヨ ケネディ オモンディ
3. 研究期間： 2021年4月1日～2022年3月31日

4. 研究経過及び研究成果：

細胞は細胞外マトリックスに形成する接着斑を通じて周囲の力学的刺激を感知し、その情報をもとに遺伝子発現や分化方向性を決定することが知られている。例えば、細胞外基質の硬さに応じて間葉系幹細胞の分化方向性が変わることが報告されている

(Engler et al., Cell, 2006)。高い増殖能を有する多能性幹細胞は、その分化状態に応じた固有の常在収縮力を接着基板に及ぼしていると考えられる。しかしながら、「力」は分子マーカーとは異なり、通常目に見えず、その評価も難しい。そのため、収縮力の重要性は的確には認知されていない。そこで、本研究では、研究代表者らが独自に開発した細胞収縮力解析技術を活用し、多能性幹細胞の常在収縮力の大規模解析を行うことにより、常在収縮力と分化状態の相関関係が明らかにすることを目的としている。

本件度は、研究代表者らにより開発された「細胞収縮力アッセイ基板」を用い、細胞の分化状態を識別できるように蛍光標識を施した上で、ヒト iPS 細胞の分化に伴う常在収縮力の評価を目指した。本法では、細胞が基板に及ぼす「トラクションフォース」に応じて基板表面が変形し、しわが形成される。このしわの形成を常在収縮力のリードアウトとして用いることにより、分化等の細胞状態変化を評価する。本研究では、分化に伴ってアクチン骨格構造が発達し、収縮力が増加すると仮定した。そこで、硬さの異なる収縮力アッセイ基板上でヒト iPS 細胞を培養、3日以上タイムラプス顕微鏡観察を行いながら、細胞状態変化に伴うしわ形成の画像データを取得した。そして、画像データを元に機械学習 (AI) による大規模解析を行い、分化状態と常在収縮力の相関関係を評

価した。細胞の分化状態を識別するために、未分化なヒト iPS 細胞を選択的に染色する rBC2LCN-FITC (AiLecS1-FITC)により細胞ラベリングを行った。

その結果、未分化な細胞集団における微弱な収縮力とは対照的に、分化した細胞集団においては比較的高い収縮力が確認された。また、細胞コロニーの中心部に比べて、細胞エッジでは高い収縮力が確認された。内部に比べてコロニーエッジにおいて張力が比較的高いことはマウス ES 細胞を用いた研究でも確認されている (Ando et al., Stem Cell Research, 2021)。つまり、多能性幹細胞のコロニーのエッジにおける張力が分化トリガーとなり、エッジから内部へと多能性状態が変化することを示唆している。このことを踏まえると、本研究で確認されたヒト iPS 細胞分化と常在収縮力の関係は、物理的な因子 (例えばエッジ張力) が多能性状態の調節に何等かの影響を及ぼしていることを示唆しており、細胞分化における力学的因子の役割の理解に知見を与える。

今後、収縮力計測と合わせて、yes associated protein (YAP)依存のメカノトランスダクションパスウェイも検討し、細胞が接着基板から感知する力学的因子が細胞内張力を介して遺伝子発現を調節し、分化に至るまでの過程を明らかにしていきたい。そのために、現在 mCherry-YAP を導入した細胞を用いた実験を進めている。

最後に、当該年度においてご支援を賜り、深い感謝の意を表したい。

5. 研究成果の公表

・発表論文リスト

- [1] **Shinji Deguchi**, Machine learning-based detection of cellular forces and its application to drug screening, International Conference on Future Healthcare and Economic Development, Taiwan, online, invited, September 23-29.
- [2] **Shinji Deguchi**, Cellular adaptation to mechanical environment, MEI Summer School International Symposium 2021, online, invited, August 4-6.
- [3] **Shinji Deguchi**, Wrinkle force microscopy: a machine learning-based approach to evaluate cellular forces, DevMech Webinar, Online, invited, June 9.
- [4] *Yuta Ando, **Kennedy O. Okeyo**, Taiji Adachi, Pluripotency state of mouse ES cells determines their contribution to self-organized layer formation by mesh closure on microstructured adhesion-limiting substrates, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 590, pp. 97-102 (2022).
- [5] **Kennedy O. Okeyo**, Yoshikiyo Kibe, and Taiji Adachi, Controlling macroscale cell alignment in self-organized cell sheets by tuning the microstructure of adhesion-limiting micromesh scaffolds, Materials Today Advances, Vol. 12, #100194 (2021).
- [6] *Yuta Ando, **Kennedy O. Okeyo**, Junko Sunaga, and Taiji Adachi, Edge-localized alteration in pluripotency state of mouse ES cells forming topography-confined layers on designed mesh substrates, Stem Cell Research, Vol. 53, #102352 (2021).