

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21602001

研究課題名（和文）1細胞培養・刺激応答計測システムの開発による、ES細胞のゆらぎ緩和機構の解析

研究課題名（英文）Single-cell microscopy with stimulus and response device to analyze relaxation mechanism of ES cells fluctuation

研究代表者：

大沼 清（Ohnuma Kiyoshi）

長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター・特任准教授

研究者番号：50396834

研究成果の概要（和文）：

受精卵は非常に安定して発生するが、その仕組みには不明な点が多い。そこで、発生の良いモデルであるES細胞、余分な成分を含まない培養液、細胞が塊を作らずにバラバラにできるよう特殊コートした培養皿、微速度での顕微鏡撮影装置を用い、培養状態をいろいろと変えたときの各細胞の変化を観察するシステムを開発した。このシステムを用い、各々のES細胞が分裂・分化・生死するかを捉える事に成功した。本研究の成果は、安定して体が形作られる条件の解明に繋がる。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism that provides stability during embryonic development remains to be uncovered. To do this, we made a system to observe a single-cell reaction to culture medium stimulation. The system consists of four parts: ES cells, which are a good model for early development, a culture medium without any unknown factors, a specially coated culture dish that enabled us to dissociate cells without aggregation, and time-lapse microscopy. This system enabled us to monitor life-and-death, proliferation, and differentiation of a single ES cell. Single-cell level observation of stimulation response of ES cells will deepen our understanding of developmental stability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：1 細胞培養、ES 細胞、ゆらぎ、微細加工、初期発生

1. 研究開始当初の背景

細胞内でのタンパク質等の発現量にはゆらぎがあるために、細胞はそれ自身ゆらいでいる上に、周りの環境もゆらいでいる。細胞数が非常に多い場合には平均化されてゆらぎは小さくなるが、初期発生のように細胞数が少ない場合はゆらぎの影響は大きくなると予想される。ところが、初期発生は非常に正確に進行する。つまり、初期発生においては、多数細胞による平均化以外に、ゆらぎを緩和する機構があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題においては、初期発生の良いモデル系であるマウスの胚性幹細胞 (ES 細胞) を使用し、1 細胞で培養、観察しながら様々な変化を与え、細胞の応答を測定するシステムを開発する。このシステムを使い一つの ES 細胞がどのように環境の変化に応答して、安定して分裂、分化できるかを探る。本研究課題の成果は、初期発生の安定性に関する重要な知見をもたらすだけでなく、再生医療を目指した細胞分化の制御技術の向上にも役立つと期待される。

3. 研究の方法

マウス ES 細胞を 1 細胞で培養、観察しながら様々な変化を与え、細胞の応答を測定するシステムを開発する。培地の組成や相互作用などの環境を厳密に制御しながら 1 細胞レベルで ES 細胞の応答を光学顕微鏡で測定、解析できるシステムを構築する。研究代表者の大沼は ES 細胞の無血清・無フィーダ培養、分担者の 3 人はそれぞれ、単一 ES 細胞の分散培養、微細加工技術を用いた 1 細胞計測、初期発生の安定性に関する研究の専門家である。この 3 人が協力してシステムを開発する。このシステムを使い、ES 細胞が一細胞レベルでどのようにゆらぎを緩和し、安定して分裂、分化できるかを探る。上記のシステムを使用し、単一のマウス ES 細胞へと分化誘導因子を作用したときに、細胞がどのように死ぬか、分裂、分化、するかを測定し、解析して、その分布より細胞応答のゆらぎを調べる。

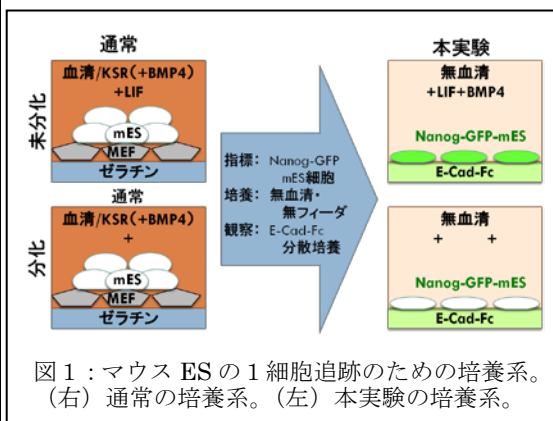
4. 研究成果

1) 最初に、我々の無血清・無フィーダ培養、平面分散培養を用いて、Nanog レポータ ES 細胞が正しく応答するかを確かめた。細胞は未分化時に発現する転写因子の Nanog のプロモータで GFP が発現する mES 細胞を用いた。この細胞は血清・フィーダ有の培養条件では、未分化な時に緑蛍光が観察でき、分化すると緑蛍光が消える事が知られている。

無血清培地は塩類などの基礎培地にインスリンなどの基本的な栄養素を加えたものをベースにして 3 つの培養液を作った。1 つ目は、未分化維持用培地で、マウス ES 細胞の未分化維持因子として知られる LIF と BMP4 を加えたもの。2 つ目は、LIF と BMP4 を抜いた分化誘導培地である。3 つ目は、bFGF を加えた神経方向への分化条件である。

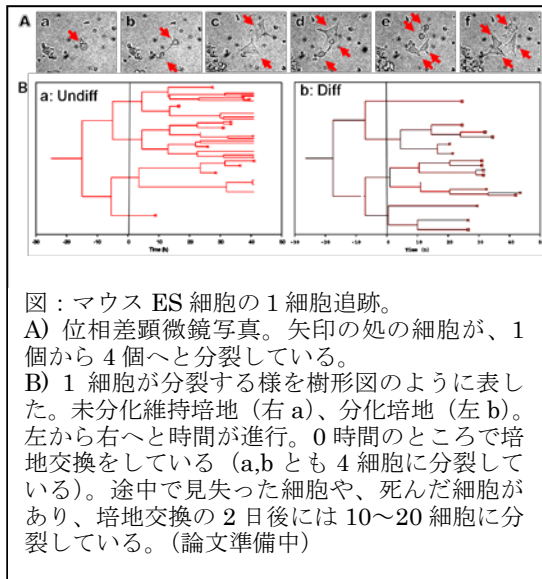
コートには細胞間接着因子の E-Cadherin を用いた。通常、マウス ES 細胞は立体的なコロニーを形成するために、個々の細胞の観察が難しいが、E-Cadherin で培養皿をコートすると、1 細胞ずつにばらばらになり、各細胞を観察できるとの報告がある。その上、培養液に入っている因子が、全ての細胞に均等に作用する。

その結果、無血清・E-Cadherin コート培養で、1 細胞ずつバラバラに培養できる事、つまり 1 細胞観察ができる事が確認できた。また、LIF・BMP4 入りの未分化維持培地に比べ、分化誘導培地 2~4 日培養すると GFP 蛍光が低下し、更に初期分化マーカーである FGF5 の発現が上昇した事が免疫染色により確認できた。以上の事より、我々の無血清培地・1 細胞観察系で、Nanog レポータマウス ES 細胞の未分化、分化を制御できる事がわかった。



2) 以上のシステムを用いて、マウス ES 細胞タイムラプス観察をし、1 細胞を追跡した。

1つの細胞が分裂していく様の樹形図を下記に示す。途中、細胞が死んだところは×を記入してある。この結果より、分化条件 (b:Diff) では細胞が多く死んでいる事が推測できる。



図：マウス ES 細胞の 1 細胞追跡。
A) 位相差顕微鏡写真。矢印の処の細胞が、1 個から 4 個へと分裂している。
B) 1 細胞が分裂する様を樹形図のように表した。未分化維持培地 (右 a)、分化培地 (左 b)。左から右へと時間が進行。0 時間のところで培地交換をしている (a,b とも 4 細胞に分裂している)。途中で見失った細胞や、死んだ細胞があり、培地交換の 2 日後には 10~20 細胞に分裂している。(論文準備中)

3) 細胞におけるゆらぎを見るために、タイムラプスデータを元に姉妹細胞解析をおこなった。姉妹細胞解析とは、1つの細胞から分裂した2つの細胞(姉妹細胞)間の性質と、ランダムに選んだ細胞間の性質を比較する事により、ゆらぎを定量化する解析法である。まだ充分な数のデータが得られていないが、分裂時間の分布が、培養条件により違う傾向がみられた。また、ランダムに選んだ細胞間の分裂時間の差と、姉妹間の分裂時間の差の間に差がある傾向がみられた。さらに同様の傾向が分化度合い(蛍光強度)に関しても見られた。まだ、統計的に議論ができる程のデータが無いが、分化により分裂時間や、分化度合いの分布(ゆらぎ)が変化することが予想される。

本研究課題においては、発生の良いモデルである ES 細胞を用い、余分な成分を含まない無血清培地、細胞が塊を作らずにバラバラにできる E-Cad-Fc コート、微速度での顕微鏡撮影装置を用い、培養状態をいろいろと変えたときの各細胞の変化を観察するシステムを開発した。このシステムを用い、各々の ES 細胞が分裂・分化・生死する様を追跡し、それを元にゆらぎを定量する事にも成功した。本研究を進めていくことにより、発生が安定して進むことを理解する事に繋がる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Tateno H, Toyoda M, Saito S, Ohnuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Nakasu A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M, Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem.*, 286 (23): 20345-20353 (2011) 査読付き原著
- 2) Y. Hayashi, T. Chan, M. Warashina, M. Fukuda, T. Ariizumi, K. Okabayashi, N. Takayama, M. Otsu, K. Eto, M. K. Furue, T. Michiue, K. Ohnuma*, H. Nakauchi, M. Asashima*, Reduction of N-glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or cultured under Feeder- and Serum-free Defined Conditions. *PLoS ONE* 5: e14099.(2010)
- 3) Y. Nishimura, A. Kurisaki, M. Nakanishi, K. Ohnuma, N. Ninomiya, S. Komazaki, S. Ishiura, and M. Asashima*, Inhibitory Smad proteins promote the differentiation of mouse embryonic stem cells into ependymal-like ciliated cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 401(1):1-6 (2010)
- 4) Y. Aihara, Y. Hayashi, M. Hirata, N. Ariki, S. Shibata, N. Nagoshi, M. Nakanishi, K. Ohnuma, M. Warashina, T. Michiue, H. Uchiyama, H. Okano, M. Asashima, and M. Kusuda Furue*, Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *Int J Dev Biol* 54 (2010) 1287-94.
- 5) R. Aoki, M. Inui, Y. Hayashi, A. Sedohara, K. Okabayashi, K. Ohnuma*, M. Murata, and M. Asashima*, An in vitro reconstitution system for the assessment of chromatin protein fluidity during *Xenopus* development. *Biochem Biophys Res Commun* 400 (2010) 200-6.
- 6) Hayashi H, Furue MK, Satoshi Tanaka S, Hirose M, Wakisaka N, Danno H, Ohnuma K, Oeda S, Aihara Y, Shiota K, Ogura A, Ishiura S and Asashima M*, BMP4 induction of trophoblast from mouse embryonic stem cells in defined culture conditions on laminin, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(5):416
- 7) Kajiyama H, Hamazaki S T, Tokuhara M, Masui S, Okabayashi K, Ohnuma K, Yabe S, Yasuda K, Ishiura S, Okochi H and Asasima M*, Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice, *IJDB*, 2010,54(4):699-705
- 8) Ohnuma K*, Toyota T, Ariizumi T, Sugawara T, Asashima M, Directional Migration of Neuronal PC12 Cells in a Ratchet Wheel-Shaped Microchamber, *J Biosci Bioeng*,

2009, 108:76-83

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) M.Asashima*, T. Michiue, K. Ohnuma, Y. Nakajima, Y. Ito “Mechanobiology During Vertebrate Organ Development” Mechanosensing Biology, 1st Edition., Noda, M.(Ed.), 2011, XIV, ISBN: 978-4-431-89756-9, Part I, Chapter 3 (39-50)
- 2) T. Toyota, Y. Wakamoto, K. Hayashi and K. Ohnuma* “Controlling Cell Migration with Micropatterns, Innovations in Biotechnology, Intech, E. C. Agbo (Ed), 2012, ISBN 978-953-51-0096-6, chapter 9 (187-208)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagaokaut.ac.jp/j/annai/NUT-toprun/ohnuma0.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼清 (Ohnuma Kiyoshi)
長岡技術科学大学
産学融合トップランナー養成センター
特任准教授
研究者番号：50396834

(2) 研究分担者

若本祐一 (Wakamoto Yuichi)
東京大学大学院総合文化研究科
准教授

研究者番号：30517884

(3) 研究分担者

賀喜白乙 (Hexig Bayar)
東京工業大学
大大学院生命理工学研究科
特任助教
研究者番号：20515168

(4) 研究分担者

道上達男 (Michiue Tatsuo)
東京大学・大学院総合文化研究科
准教授
研究者番号：10282724