

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791938

研究課題名（和文） マルチガス環境構築によるニッセ環境

研究課題名（英文） Multi Gas was recommended the individual tissue culture system for the microenvironment of Stem Cell

研究代表者

加藤 靖浩 (KATO YASUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40398780

研究成果の概要（和文）:

本研究は、細胞が培養器（CO<sub>2</sub> インキュベーター）に合わせるという従来型の概念から、機器が個々の細胞毎に最適化された培養環境を提供するという発想転換に特徴がある。つまり、幹細胞のような細胞特性の維持には、特定の培養条件（酸素濃度）の最適化が重要であり、低酸素が口腔幹細胞維持に必須であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）:

The aim of this research is provided that a hypoxia microenvironment is a key component of the human oral mucosa stem cell. Because, tissue culture plays an important role in cell biology by using the CO<sub>2</sub> incubator have been widely employed. But this conventional CO<sub>2</sub> incubator poses a structural problem if hypoxia tissue culture is to be performed. We proposed the individual tissue culture system with hypoxic atmosphere for the microenvironment of stem cell.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2011 年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 総計      | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：バイオ関連機器、再生医学、細胞・組織、シグナル伝達、移植・再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

従来、細胞培養においては培養機器としての CO<sub>2</sub> インキュベーターが 37℃、5%CO<sub>2</sub> という環境を有しているため、研究者は、何ら疑問を抱くことなく、この培養環境にすべての細

胞を適応させてきた。しかしながら近年、1) 細胞の局所環境に対応したエネルギー代謝には細胞外酸素濃度が関与する、2) 幹細胞の分化誘導に際しては、サイトカイン等の液性因子（化学環境）が重要である、3) iPS 細胞

のような遺伝子導入による細胞特性の維持など、特定細胞には特定の培養条件の最適化が重要であり、その中でも低酸素が高効率化や幹細胞維持に必須であることが報告されてきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体内に近似した *in vitro* 環境を提供するため、高精度な細胞外環境最適化システムにおける培養器具を開発、口腔幹細胞のニッチ環境構築に低酸素環境が必須であるか再現を試みた。

## 3. 研究の方法

### 「細胞膜障害の検出」

従来の CO<sub>2</sub> インキュベーター (20%O<sub>2</sub>) と本研究の個別培養器 (2-20%O<sub>2</sub>) によるガス環境 (酸素) の相違が与える影響を細胞膜変動に焦点を絞って検証する。まずは、細胞膜障害によって細胞内から漏出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することで細胞障害を指標に評価する。また、細胞膜障害によって引き起こされるアポトーシスの検出を行う。

### 「FACS を用いた至適酸素環境下における脂質ラフトのマルチ解析」

幹細胞が DNA 結合蛍光色素 (Hoescht3342) に対して高い排出能を持つことが報告されており、Side Population (SP) 細胞と呼ばれている。Hoescht3342 は ABCG2 ポンプの発現により、細胞から排出されるが verpamil 処理を行なうことで ABCG2 がブロックされ、Hoescht3342 の排出が阻害される (PNAS 2007; 104:18700-18705)。この作用を利用し、至適酸素濃度下での SP 細胞陽性率を従来型 (2%CO<sub>2</sub> air) 環境下の細胞と比較検討する。

また、細胞周期を同定し、酸素濃度が口腔幹細胞維持に関与するか検証する。

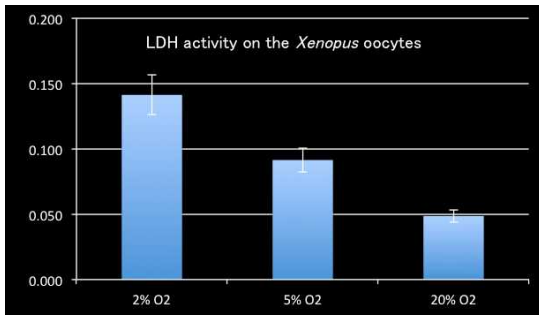
### 「生体膜を構成するコレステロールの役割について (脂質ラフト)」

マルチガス環境 (酸素濃度) における細胞膜構成脂質のコレステロールの影響を検討するために。まずは、細胞外ガス環境の相違における細胞膜上の脂質ラフトの局在を検討した。本研究では、口腔粘膜細胞を 20%O<sub>2</sub>、2%O<sub>2</sub> 環境下で培養。各細胞を抽出後、RT-PCR によって脂質ラフトマーカー (CD55, Cav-1) の発現を比較検討する。また、組織染色によって、脂質ラフト Cholera Toxin Subunit B (CT b) の局在を検討する。

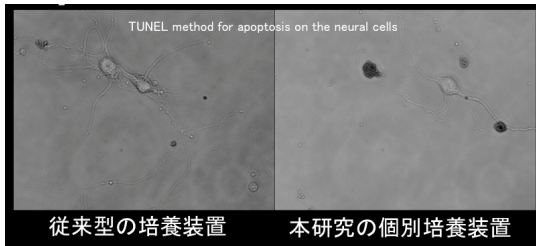
## 4. 研究成果

### 「細胞膜障害の検出」

任意の酸素濃度に到達する時間が、T75 型フラスコにおいて、測定された従来型培養器では 2-3 時間、本研究で開発された個別培養システムでは 2-5 分で達成された。つまり、短時間で目的の酸素濃度に到達することが明らかとなった。瞬時に低酸素環境が構築されることで引き起こされる細胞膜障害は、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて検討した。その結果、酸素濃度に比例して LDH 活性が有為に低下した (図 1)。また、マウス神経細胞を用いて、従来型の低酸素培養器と本研究の個別培養器で瞬時の低酸素環境が細胞に及ぼす影響をアポトーシス細胞染色で比較した所、従来型装置では観察されなかったアポトーシスが検出された (図 2)。本研究で用いる個別培養装置は、酸素濃度環境を担保していることが確認された。



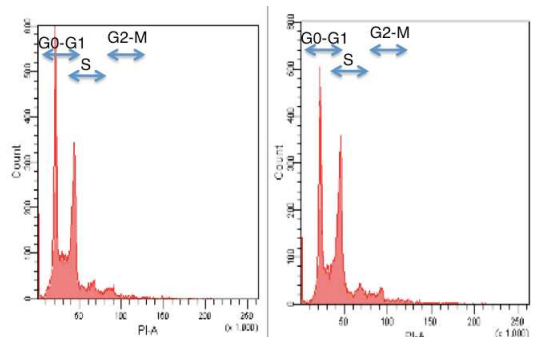
(図1) 酸素濃度依存した LDH 活性



(図2) 従来型培養装置と個別培養装置による 2%O<sub>2</sub> 濃度環境下でのアポトーシス検出

### 「FACS を用いた至適酸素環境下における脂質ラフトのマルチ解析」

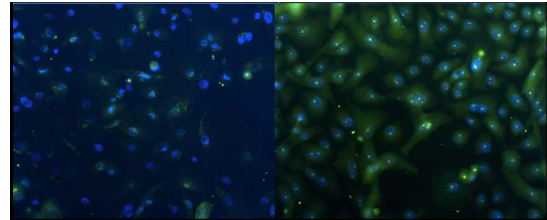
従来型培養器 (20%O<sub>2</sub>) と個別培養装置 (2%O<sub>2</sub>) において、ラビット口腔粘膜細胞を培養し、同一細胞数あたりの細胞周期を (BD 社) で染色、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、従来型培養器 (20%O<sub>2</sub>) と比較して、個別培養装置 (2%O<sub>2</sub>) では、G0-G1 期の細胞が存在、未分化細胞の維持に低酸素環境は有効であることが示唆された。



(図3) FACS による細胞周期解析、左側 20%O<sub>2</sub>、右側 5%O<sub>2</sub>

### 「生体膜を構成するコレステロールの役割について (脂質ラフト)」

リアルタイム PCR の結果、20%O<sub>2</sub> と比較して 5%O<sub>2</sub> 環境下では細胞内外のシグナル伝達を介在する脂質ラフト (CD55, Cav-1) の発現が低下、免疫組織染色においても、2%O<sub>2</sub> 環境下では脂質ラフトマーカーである CT b の発現は見られない (図4)



(図4) 蛍光組織染色による脂質ラフト検出。左側 20%O<sub>2</sub>、右側 5%O<sub>2</sub>、青：核、緑：CT b

以上の結果から、幹細胞のような細胞特性の維持には、特定の培養条件 (酸素濃度) の最適化が重要であり、低酸素が口腔幹細胞維持に必須であることが示唆された。しかし、これらの図の中には、データ数が不足し有意差検定をおこなっていないものも存在することから、今後の検討課題である。また、本研究を通して、特定の環境で生育した特定細胞を長期に保存する技術が必要となることが明らかとなった。現在、継続研究を行っており、論文も投稿準備中であることを申し添えます。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

加藤靖浩、田中愛美、阿部陽一郎、安井正人、第85回日本薬理学会 (京都)、水分子動態を制御するアクアポリンから探る凍結法、2012年03月15日

加藤靖浩、兼子智、橋本貞充、安井正人、  
第 84 回日本生化学会（京都）、酸素濃度管  
理型培養システムによる口腔幹細胞のニッ  
シエ環境構築、2011年09月22日

加藤靖浩、兼子智、橋本貞充、篠崎尚史、  
安井正人、第 83 回日本生化学会（神戸）、  
酸素濃度管理型培養システムによる口腔幹  
細胞のニッシエ環境構築、2010年12月  
08日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/pharm/about/katoyasu.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

加藤靖浩 (KATO YASUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40398780