

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656495

研究課題名(和文) ヒト幹細胞分化誘導の時間生物学的制御

研究課題名(英文) Circadian rhythmic control of differentiation of human stem cells

研究代表者

高木 睦 (Takagi, Mutsumi)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20263212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：種々の培養操作が時計遺伝子発現の再振動に与える影響を、振幅や位相の面から定量的に明らかにした。特に、培地交換やグルコース添加、高濃度血清添加、デキサメタゾン添加といった種々の操作により再振動を起こすことができるが、操作の種類により再振動開始時の振動位相が異なることは新しい知見であり、再振動開始メカニズム研究に今後資するとともに、「随意的な振動の制御」に道を拓くものとしても期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of various cultivation operation on re-oscillation of circadian gene expression, especially on amplitude and phase of oscillation, were quantitatively clarified. The phase at the beginning of re-oscillation depended on the kind of cultivation operation including medium change, additions of glucose, large amount of serum, and dexamethasone, which knowledge might contribute on not only the study about the mechanism of re-oscillation but also the control methodology of the oscillation of circadian gene expression.

研究分野：動物細胞培養工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、バイオ生産プロセス

キーワード：細胞培養 時計遺伝子 間葉系幹細胞 分化 トランスジェニックラット グルコース デキサメタゾン
ン 血清

1. 研究開始当初の背景

特定の遺伝子の誘導発現と考えられる細胞分化には通常数週間という長時間を要し、非常に効率が悪い。さらに、サイトカイン添加などの分化誘導操作を行っても、幹細胞集団に含まれるすべての細胞が同時に分化することはないこと、個々の細胞により分化度合がバラバラであることが知られている。これらの問題の背景には、幹細胞集団中の全ての細胞で、転写因子の発現レベルが時間的に適正に制御されていないことがあると考えた。そのため、遺伝子発現のタイミングを制御していると考えられる時計遺伝子の発現制御方法を基礎的に検討するとともに、時計遺伝子が細胞分化に与える影響の有無を確認する必要があると考えた。

2. 研究の目的

(1) 研究に使用する幹細胞の分離・保存
時計遺伝子 Per2 発現をルシフェラーゼ発光強度でモニタリングできる per2-luc トランスジェニックラット骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を分離し、凍結保存する。さらに、本幹細胞を一定条件で培養することにより、Per2 遺伝子発現が振動することを発光測定により確認する。

(2) 時計遺伝子の振動の制御方法の検討
本幹細胞集団における時計遺伝子 Per2 発現の振動の振幅および位相を制御する方法として、培地交換、グルコース添加、高濃度血清添加、デキサメタゾン添加等の条件を検討する。

(3) 本幹細胞の分化方法の確立
本幹細胞を軟骨細胞、脂肪細胞のいずれかの系統に分化させる条件を確立する。

(4) 時計遺伝子が分化に及ぼす影響の検討
本幹細胞で Per2 発現を制御した培養において分化誘導因子の添加時期が分化に与える影響を調べる。

3. 研究の方法

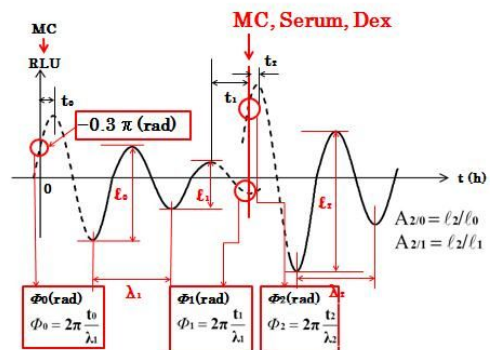
(1) 研究に使用する幹細胞の分離・保存
per2-luc トランスジェニックラットをサクリファイし、下肢骨の骨髄を培地でフラッシュし、骨髄液を採取する。有核細胞数をカウントし、細胞密度 6×10^5 cells/cm² で、10% FCS DMEM 培地を用いて 100 ディッシュに播種する。播種 1 d 後に PBS 洗浄と培地交換を行い、2 d 後および 9 d 後にも培地交換を行う。再播種後、接着細胞がコンフルエントになったら、細胞 (MSC) を剥離し、アンブルに分注し液体窒素中で凍結保存する。

保存した MSC を解凍し、35 ディッシュに、播種密度 1×10^4 cells/cm² で播種し、数日

間培養しコンフルエントにする。PBS 洗浄後、ルシフェリン ($10 \mu\text{M}$) 添加した 10% FCS DMEM 培地に交換し、ルミノメーター付インキュベーター (37) に入れて培養するとともに、10 分間隔で発光強度を測定する。この結果から、発光強度が振動すること、振動周期、振動が減衰するまでの振動持続時間を確認する。

(2) 時計遺伝子の振動の制御方法の検討
per2-luc トランスジェニックラットの MSC 様細胞を 35 ディッシュに高密度で播種して接着させた。その後、ルシフェリン含有 ($100 \mu\text{M}$) 10% FBS+DMEM-LG 培地に交換して、10 分毎にルシフェラーゼ発光を測定した。はじめの 5 日間で発光強度の振動が減衰した後に以下の各種操作を行い、さらに約 3 日間測定した。

振動が減衰した後に培地交換 (グルコース終濃度 0.9 g/L)、グルコース (0.9 g/L , 5 mM) 添加または NaCl (2.5 mM) 添加、高濃度 (50%) 血清添加、デキサメタゾン添加 (100 nM) などの操作を行い、再振動の有無、再振動開始時の位相などを確認する。(図 1)



【図 1】

(3) 本幹細胞の分化方法の確立

当研究室で従来からヒト MSC を軟骨細胞に分化している条件 (セルカルチャーインサート (CCI) を用いたシート培養、TGF 3 ng/ml 、IGF1 100 ng/ml 添加) およびラット MSC の軟骨分化の文献条件 (TGF、BMP2 添加など) を参考にして、per2-luc トランスジェニックラットから分離した MSC の軟骨細胞への分化培養条件を最適化する。軟骨細胞への分化のマーカー遺伝子としては、軟骨特有の細胞外マトリックスであるアグリカンおよび II 型コラーゲンの遺伝子発現定量値を用いる。

さらに、凍結細胞を解凍後 35 ディッシュに播種密度 1.5×10^4 cells/cm² で播種し、以下の 2 通りの条件で培養し、それぞれ脂肪細胞への分化を試みる。1 つめの条件では、

プレコンフルエントに増殖後、分化誘導培地 (AIM 培地。イソブチルメチルキサンチン、インドメタシン、デキサメタゾン、インシュリン含有) に交換し 3 日毎に培地交換しながら 18 日間培養する。2 つめの条件では、プレコンフルエントに増殖後、分化誘導培地に交換し 3 日間培養後、分化維持培地 (インシュリン含有) に交換し 3 日間培養する、といった計 6 日間の培養操作を計 3 回 (18 日間) 繰り返す。18 日間の分化誘導培養後、脂肪分化マーカーである PPAR の発現を定量する。

(4) 時計遺伝子が分化に及ぼす影響の検討

MSC を 35 ディッシュに播種・培養し、培地交換により長期間の *per2-luc* 同期培養を行う。この同期培養と非同期培養を同時に並行して行い、両方にサイトカインを添加して軟骨細胞への分化を誘導する。そして、1~数日間隔で経時的に軟骨マーカー遺伝子発現を定量し、分化度合および分化速度を比較する。

MSC の長期間の *per2-luc* 同期培養を行う。この同期培養にサイトカインを添加して軟骨細胞への分化を誘導する。その際、サイトカイン含有培地を X 日間隔で培地交換する条件、および サイトカイン不含培地で ((X-1) 日+Y 時間) 培養した後に、サイトカイン濃厚液を添加して (24-Y) 時間培養するサイクルの繰り返し条件 (X=1, 4, ; Y=1, 2, 4, 6) を行い、1~数日間隔で経時的に軟骨マーカー遺伝子発現を定量し、分化度合および分化速度を比較する。

4. 研究成果

(1) 研究に使用する幹細胞の分離・保存

per2-luc トランスジェニックラットをサクリファイし、下肢骨の骨髓を培地でフラッシュし、骨髓液を採取した。有核細胞数をカウントし、細胞密度 6×10^5 cells/cm² で、10% FCS DMEM 培地を用いて 100 ディッシュに播種した。播種 1 d 後に PBS 洗浄と培地交換を行い、2 d 後および 9 d 後にも培地交換を行った。再播種後、接着細胞がコンフルエントになったら、細胞 (MSC) を剥離し、アンプルに分注し液体窒素中で凍結保存した。

保存した MSC を解凍し、35 ディッシュに、播種密度 1×10^4 cells/cm² で播種し、数日間培養しコンフルエントにした。PBS 洗浄後、ルシフェリン (10 μM) 添加した 10% FCS DMEM 培地に交換し、ルミノメーター付インキュベーター (37) に入れて培養するとともに、10 分間隔で発光強度を測定した。この結果から、発光強度が時間経過に応じて振動すること、振動周期が約 25 時間であること、振動が減衰するまでの振動持続時間を確

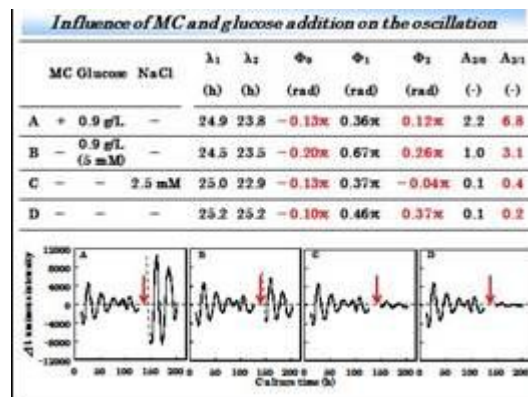
認した。次に、振動が減衰する所に再度培地交換を行い、振動がさらに持続すること、

何回も培地交換を繰り返すことによって最長何時間まで振動を持続できるか、などを調べた。なお、古い培地を取り出して、その培地を培養器に戻す、といった単純な操作では再度の振動は見られず、再振動には培地成分濃度の変化が必要であると考えられた。

(2) 時計遺伝子の振動の制御方法の検討

per2-luc トランスジェニックラットの MSC 様細胞を 35 ディッシュに高密度で播種して接着させた。その後、ルシフェリン含有 (100 μM) 10% FBS+DMEM-LG 培地に交換して、10 分毎にルシフェラーゼ発光を測定した。はじめの 5 日間で発光強度の振動が減衰した後に以下の各種操作を行い、さらに約 3 日間測定した。

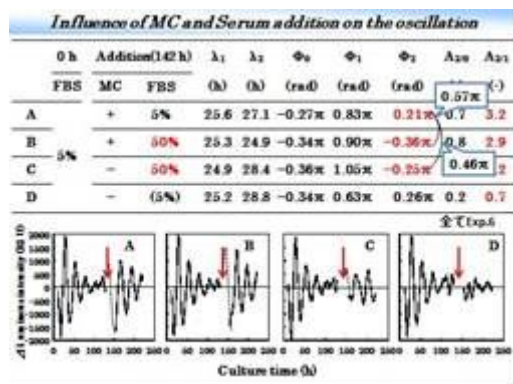
振動が減衰した後に培地交換 (グルコース終濃度 0.9 g/L) グルコース (0.9 g/L, 5 mM) 添加または NaCl (2.5 mM) 添加などの操作を行ったところ、操作後の位相は全て 0.0 ~ 0.4 rad、周期は 22.9~25.2 時間と操作前とほぼ同じだった。一方、振幅は操作直前と比較して培地交換とグルコース添加では各々 6.8 倍、3.1 倍と大きくなったが、NaCl 添加では振幅は大きくならなかった。(図 2) さらに、減衰後に添加するグルコース濃度を 0.9~0.023 g/L の範囲内で変化させたところ、いずれの濃度でも再振動が見られた。グルコース添加でも、培地交換よりも振幅は小さいが *Per2* 発現が再振動すると考えられた。また、0.023 g/L の低濃度グルコース添加でも、再振動が起こり得ると考えられた。



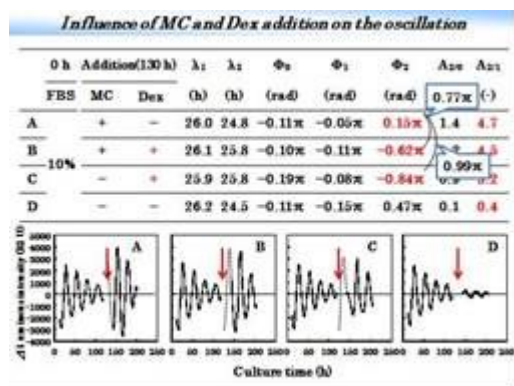
【図 2】

振動が減衰した後に培地交換や血清ショック、デキサメタゾン添加などの操作を行うと発光が約 25 時間周期で再振動した。しかし、振動のピーク位相を 0 (rad) とすると、これらの各操作直後の位相は、各々約 0.21、-0.36、-0.84 (rad) と異なっていた。(図 3、図 4) したがって、再振動操

作の手法を変えることで再振動の開始位相を任意にコントロールすることができる可能性が考えられた。また、血清ショックとデキサメタゾン添加による再振動の振幅の増幅率は、培地交換を行うよりも小さくなった。



【図 3】



【図 4】

(3) 本幹細胞の分化方法の確立

本幹細胞をセルカルチャーインサート(CCI)およびTGF 3 10 ng/ml、IGF1 100 ng/ml 添加培地を用いてシート培養した結果、シートが形成されず、軟骨特有の細胞外マトリックスであるアグリカンおよびII型コラーゲンの遺伝子発現も認められなかった。

さらに、2通りの条件で培養し脂肪細胞への分化を試みたが、脂肪分化マーカーであるPPARの発現は認められなかった。

すなわち、本幹細胞の軟骨細胞および脂肪細胞への分化は成功しなかった。

(4) 時計遺伝子が分化に及ぼす影響の検討

本幹細胞の軟骨細胞および脂肪細胞への分化は成功しなかったため、「時計遺伝子が分化に及ぼす影響の検討」は断念した。

【研究成果のまとめ】

「分化に対する時計遺伝子の関与」という当初の課題は、分化系を確立できなかったことにより断念したが、種々の培養操作が時計遺伝子発現の再振動に与える影響を、振幅や位相の面から定量的に捉えることができた。特に、培地交換やグルコース添加、高濃度血清添加、デキサメタゾン添加といった種々の操作により再振動を起こすことができるが、操作の種類により再振動開始時の振動位相が異なることは新しい知見であり、再振動開始メカニズム研究に今後資することが期待されるとともに、「随意的振動の制御」に道を拓くものとしても期待される。

「分化に対する時計遺伝子の関与」という当初の課題は、分化系の確立が困難だったために断念した。そこで、今後は、細胞の活性のうちでもっと定量化し易い指標として細胞増殖を選択し、「増殖に対する時計遺伝子の関与」という課題に取り組みたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山道愛菜、切明研人、藤原政司、本間さと、本間研一、西出真也、高木睦、ラットMSC様細胞における時計遺伝子振動に与える培地交換の影響、日本生物工学会年会広島大会、2013年9月19日、広島国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 睦 (TAKAGI, Mutsumi)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：20263212

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

藤原 政司 (FUJIWARA, Masashi)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：30229075

本間 研一 (HONMA, Ken-ichi)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：40113625

西出 真也 (NISHIDE, Shinya)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40451398