

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670146

研究課題名(和文) アクアポリンの発現と超急速凍結による神経幹細胞の選別と残存未分化iPS細胞の除去

研究課題名(英文) " Selection of differentiated neural stem cells from iPS cells and removal of undifferentiated cells by using ultra-quick freezing with aquaporin expression "

研究代表者

安井 正人 (Yasui, Masato)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90246637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン4(AQP4)を発現した細胞は、超急速凍結に対して耐性となる。今回我々は、iPS細胞からの分化誘導により、AQP4を発現している神経幹細胞を超急速凍結法で選別・濃縮すると同時に、残存する未分化iPS細胞の除去について検討した。2つの異なるヒトiPS細胞株から神経幹細胞への分化誘導を試みたが、有意なAQP4の発現誘導を導くことはできなかった。また、超急速凍結で未分化細胞を除去し、AQP4発現細胞を若干濃縮することはできたが、マウスを用いた腫瘍化の有無を調べる実験では明らかな差を見出すことはできなかった。今後の臨床応用に向けて、さらなる詳細な条件検討が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：Based on the finding that membrane damage caused by ultra-quick freezing is rescued by the expression of AQP4, we proposed a novel cell-selection method using ultra-quick freezing combined with AQP expression. In this project, we examined if the residual undifferentiated cells can be removed during differentiation from iPS cells to neural stem cells by the ultra-quick freezing since AQP4 expression is induced in neural stem cells. As expected, AQP4 positive cells were slightly concentrated. However, there was no difference, before and after the ultra-quick freezing, in terms of tumor formation after transferring of the neural stem cells into mouse testis tissues. Further optimal conditioning of AQP4 expression is required in neural stem cells for clinical application.

研究分野：薬理学

キーワード：アクアポリン4 iPS細胞 神経幹細胞 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はアクアポリン4 (AQP4) を発現した細胞が超急速凍結に対して耐性となることを発見した。また、未分化マウス ES 細胞 (AQP4-) の神経幹細胞への分化に伴って AQP4 発現が誘導されてくることを確認し、分化細胞の超急速凍結後の生存率が未分化細胞に対して著しく上昇することも明らかにした。そこで、本申請研究では超急速凍結・融解法を最適化することで、iPS 細胞から分化した神経幹細胞を選別すると同時に残存する未分化 iPS 細胞の除去について検証する。

2. 研究の目的

- (1) iPS 細胞分化誘導における AQP 発現パターンと超急速凍結融解後の生存率の検討
- (2) iPS 細胞分化誘導による神経幹細胞の選別と未分化細胞除去の最適化
- (3) *in vivo* における腫瘍化の検証

3. 研究の方法

本実験で使用する iPS 細胞 (MEF38C2/D2 株) の提供ならびに実験手技については、慶應義塾大学医学部生理学教室から供与して頂いた。また、使用した試薬・機器の詳細については、実験医学部冊 ES・iPS 細胞実験スタンダード「中辻憲夫 / 監 末盛博文 / 編」(羊土社)を参照した。

各々の iPS 細胞株は、MMC 処理したフィーダー細胞上で継代培養を行った。分化誘導を行うために、フィーダーフリー培養皿に移して、胚葉体 (EB) 形成用培地 MEM 培地 (10%FBS, 0.1 μ M 2-ME) 入りの培地にて EB 形成を行った。また、EB 形成 2 日目にレチノイン酸 (RA, 終濃度 10⁻⁶M) を加えて神経系への分化誘導を行った。さらに、ニューロスフェア (NS) を形成させるために、神経幹細胞用培地 MHM (Media Hormone Mix) に 20ng/mL bFGF、B27 サプリメントを添加し、形成と継代を繰り返した。三継代目の NS 形成 4 日目の細胞を、BICELL (日本フリーザー株式会社) による緩慢凍結もしくは液体窒素による超

急速凍結を行った。なお、凍結に際して、一般的な凍結保護液として用いられるジメチルスルホキシド (DMSO) を 10% 混合した溶液で凍結した。その後、細胞を融解し、目的に応じた検証を行った。細胞の耐凍性については、トリパンブルー染色によって、凍結・融解前後の生細胞数から、細胞生存率を算出した。

iPS 細胞株を神経系に分化誘導した際に発現する遺伝子の解析を行うため、iPS、EB、1st, 2nd, 3rd NS から RNA を抽出。通法に従って cDNA を合成、未分化マーカー nanog プライマー (*Stem Cells*, 26:3086-3098, 2008) 及び耐凍性マーカー aqp4 プライマー (*Placenta*, 28:431-428, 2007) を用いて発現を比較した。

超急速凍結による細胞選別が、残存する未分化細胞除去に有効であるか *in vivo* で検証した。検証に用いる細胞は、超急速凍結融解前後に得られたニューロスフェアを 4x10⁴ cell 個になるように調整した細胞懸濁液を作成し、NOD/SCID マウスの精巣に移植した。移植した組織を 4 週後に摘出し、4%PFA で固定後、凍結包埋し、切片を作製した。ヘマトキシリン & エオシン染色によって腫瘍化形成の有無を検証した。また、この細胞は、nestin 遺伝子第 2 イントロン内のエンハンサー下に enhanced green fluorescence protein (EGFP) という蛍光を発するタンパク質を発現するトランスジェニックマウス由来の iPS 細胞であるため、神経幹細胞特異的に強く蛍光を発する。よって、フローサイトメトリーを用いることで、残存する未分化細胞の割合を算出することが可能である。また同時に、抗 AQP4 細胞外ドメイン抗体 (*J. Neuroimmunology*, 260:107-116, 2013) を用いることで、凍結前後の生細胞の細胞膜に発現する AQP4 陽性細胞数をフローサイトメトリーによって計測した。

これらの実験は、慶應義塾大学遺伝子組換

え実験ならびに動物実験の手順に従い申請を行い、遺伝子組換え実験は、「アクアポリンの生理的機能解析」、「アクアポリンの構造及び機能に関する研究」及び「アクアポリン4ノックアウトマウス作製のためのベクター構築」という課題名平成24年8月28日付け(受付番号20-002-17)、平成24年8月28日付け(受付番号18-16-10)及び平成24年4月13日付け(受付番号19-038-2)で承認されている。動物実験計画書についても「多能性幹細胞を用いた細胞分化と組織再生の制御機構の解析」承認番号09169-(3)を得ている。

4. 研究成果

(1)【iPS細胞分化誘導後のAQP発現ならびに残存する未分化細胞の推移】

樹立したマウスiPS細胞株(MEF38C2/D2)は、先に示した方法に従って神経系に分化誘導を行い、胚葉体(EB)を経てニューロスフェア(NS)を形成させた。最初にRT-PCRを用いて、耐凍性に関与するAQP4ならびに未分化の指標となるnanogの発現を検証した。尚、各々の遺伝子発現の割合は、b-actinの発現をノーマライズの基準として定量化した。その結果、耐凍性に関与するAQP4の発現は、iPS細胞からEB、1st NS、2nd NS形成に至る過程において、MEF38C2・D2株のいずれもの場合も、AQP4発現は見られなかった(MEF38C2株のiPS:0.31±0.14, EB:0.30±0.11, 1st NS:0.32±0.07, 2nd NS:0.48±0.22)(MEF38D2株のiPS:0.49±0.25, 1st NS:0.61±0.24, 2nd NS:0.48±0.20)。3rd NS形成時には、AQP4発現が検出されたが、大幅な発現上昇は見られなかったMEF38C2の3rd NS:0.61±0.41(図1)(MEF38D2株の3rd NS:0.60±0.35)(図2)。一方、未分化細胞の指標となるnanogの発現は、iPSおよびEB形成時に最大となった(MEF38C2のiPS:0.72±0.55, EB:0.91±0.65)(MEF38D2株のiPS:1.06±0.92, EB:1.13±0.78)、NS形成の継代

が進むとともに、nanogの発現は、MEF38C2株においては速やかに減少したが(EB:0.91, 1st NS:0.42, 2nd NS:0.63, 3rd NS:0.31)(図1)、MEF38D2株においては緩やかな減少であった(EB:1.13±0.78, 1st NS:0.75±0.65, 2nd NS:0.94±1.14, 3rd NS:0.43±0.26)。

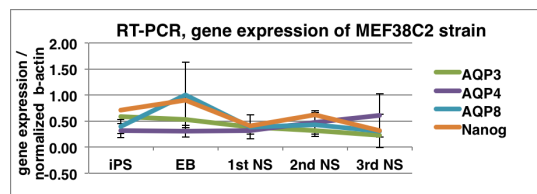


図1: RT-PCR、MRF38C2株

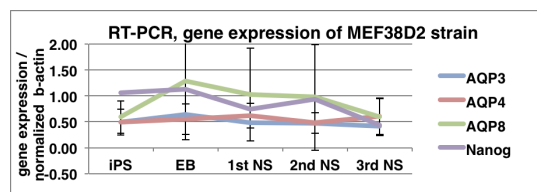


図2: RT-PCR、MRF38D2株

また、AQP3とAQP8の発現レベルにも特徴的な発現パターンがあることが明らかになった。一般的にAQPファミリーは、細胞接着、細胞運動、細胞分裂にも関与している。本研究において、iPS細胞から神経系への分化の際に、未分化なiPS細胞やEB形成時においてAQP3、AQP8が高い発現がみられ、3rd NS形成時にAQP4が分化度に応じて発現する特徴的な発現様式が見られた。AQP3,4,8以外のアクアポリンについては、このような特徴だった発現が見られないことから、AQP3,4,8は分化度に応じて変化する代謝状況を反映しているものと思われる。特にEB形成時に発現するAQP8は、PI3Kのシグナル応答に伴う細胞膜へのトラフィッキング制御(*Biol. Cell* 97, 831-836, 2005)、卵巣の顆粒膜細胞における卵胞成熟(*IUBMB Life*, 62, 852-857, 2014)への関与が示唆される。残存する未分化細胞の多いiPS細胞株では、AQP3の発現も高い、これは、細胞初期化に伴う未分化細胞の維持にIKK-NF-κBが関与することが明らかされており、AQP3がそのシグナルの一端を担っていると思われる。また、AQP4ノックアウトマウ

スにおいて、NS 形成時の増殖・分化に影響が遅延するとした Hui Long らの結果とも相関している (*J. Cell Science*, 121:4029-4036, 2008)。これらの発現の意義の詳細については、今後の検討課題である。

さて、AQP4 発現による耐凍能の獲得には、細胞膜表面に AQP4 が局在している事が要となる。そこで、フローサイトメトリーを用いて、細胞膜表面に局在する AQP4 発現の割合を検証した。その結果、3rd NS 形成時における細胞膜表面に存在する AQP4 の割合は、 1×10^4 個あたり、MEF38C2 株では $9.24 \pm 6.49\%$ 、MEF38D2 株では $1.87 \pm 1.86\%$ であった。iPS 細胞株によって細胞膜に局在する AQP4 の割合は異なり、MEF38C2 株の方が、MEF38D2 株よりも高い発現であった (図 3)。

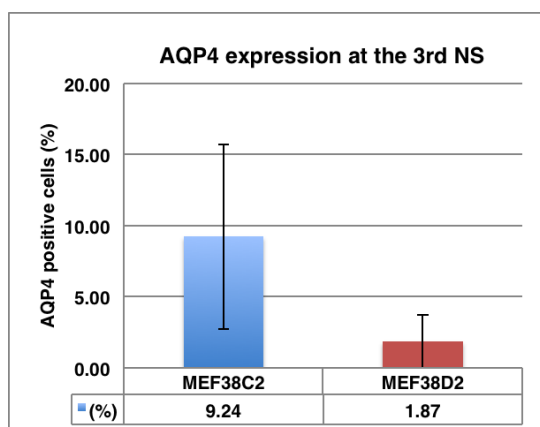


図 3 : 細胞膜発現する AQP4 の割合 (%)

また、残存する未分化細胞マーカー-nanog-EGFP の割合を、それぞれの株で比較検討した。その結果、テラトーム形成率の低い MEF38C2 株は 0.11%、テラトーム形成率の高い MEF38D2 株は 4.62%と残存する未分化細胞マーカー-nanog-EGFP の割合が異なっていた (図 4)。

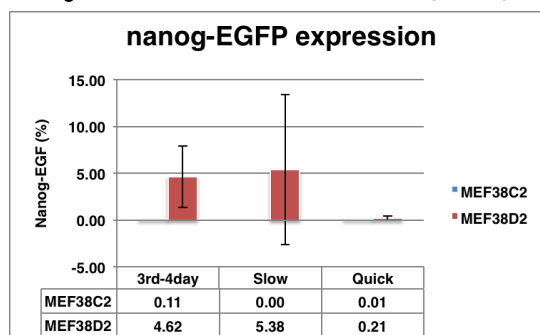


図 4 : 残存する nano-EGFP の割合 (%)

つまり、未分化細胞マーカーの残存率が低い MEF38C2 株は、分化が進み AQP4 発現も上昇。一方、未分化細胞のマーカーとなる nanog の残存率が高い MEF38D2 株は、分化が進んでいないため、AQP4 発現も低いことが示唆された。このことは、先行論文で示された、MEF38C2 株は、未分化細胞残存がなく、腫瘍化形成が起きないとする結果と一致している (*Nat Biotechnol*, 27:743-745, 2009)。

(2) 【凍結速度の違いによる未分化細胞の残存率と分化能への影響】

さらに、凍結速度 (緩慢、急速) の違いによる未分化細胞 (nanog-EGFP) の残存率について、比較検討した。

MEMEF38C2 株においては、凍結する前の段階で、残存する未分化細胞の割合が $0.11 \pm 0.23\%$ と低水準であった。また、凍結融解後の残存する未分化細胞の割合は、緩慢凍結で、 $0.00 \pm 0.00\%$ 、急速凍結で $0.01 \pm 0.02\%$ といずれも検出限界に近かった。つまり、凍結速度の違いによる未分化細胞の除去率に差は見られなかった (図 4)。一方、MEF38D2 株においては、(図 2) で示した通り、分化速度が遅く、細胞膜表面に局在する AQP4 の割合も $1.87 \pm 1.86\%$ と低かった。そこで、凍結融解後に生存した細胞について、残存する未分化細胞の割合を緩慢と急速凍結とで比較した。その結果、緩慢凍結後には $5.38 \pm 8.01\%$ と凍結前と変化が見られなかったが、急速凍結後には $0.21 \pm 0.21\%$ と減少した。つまり、急速凍結は、未分化細胞の除去に有効であることが示された。

そこで、凍結速度 (緩慢、急速) が細胞の分化能に与える影響について検証した。評価法として、異なる凍結速度で凍結した細胞を融解後、スライドガラスに接着培養させ、神経系に分化誘導される否か、神経細胞のマーカーとして (b-tubulin) を用いた抗体組織染色法によって評価した。凍結速度 (緩慢・

急速)に関わらず、耐凍性を獲得したNSは、接着後ニューロンに分化誘導しながら、放射線状に広がる様子を観察した。凍結速度(緩慢・急速)に関わらず、分化能への影響の差は、MEF38C2株とMEF38D2株の両株とも形態学的な差は見受けられなかった(図5)。一方、凍結速度が急速の場合、緩慢と比較して、神経細胞の拡散する様子は、減少していた(図5)。これは、AQP4ノックアウトマウスにおいて、NS形成時の増殖・分化に影響が遅延するとしたHui Longらの結果と一致している(*J. Cell Science*, 121:4029-4036, 2008)。

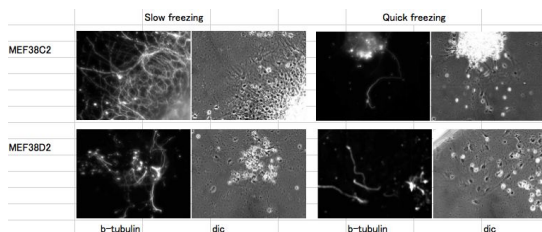


図5：緩慢・急速凍結後の分化細胞

(3)【*in vivo*における腫瘍化の検証】

腫瘍化形成率の高いMEF38D2株の急速凍結による腫瘍化形成の抑制について、免疫不全マウス(NOD/SCID)の精巣に移植して検証した。移植した細胞は、3rd NS形成した細胞魂を一度、緩慢凍結もしくは急速凍結させ、融解培養後、再度NSを形成させて移植し、腫瘍化の検証を行った。移植するNSの細胞数を同一数にするため、緩慢もしくは急速凍結融解培養後に形成したNSの細胞魂の一部を酵素処理でバラバラに剥離、生細胞数が、 4×10^4 個になるように調整して精巣に移植した。4週間後に組織を採取し、腫瘍化の有無を確認するため、組織を採取、凍結切片を製作後、HE染色によって確認した(図6)。

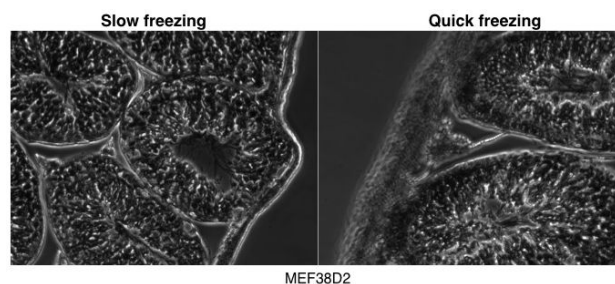


図6：細胞移植後の組織切片

その結果、MEF38D2株は、緩慢もしくは急速凍結のいずれの場合も、腫瘍形成は観察されなかった。しかし、緩慢凍結細胞を移植した際に、腫瘍化が見られないことから、移植する細胞数ならびに移植方法について、再度検討する必要がある。一方、MEF38C2株は、凍結する前の段階で、未分化細胞の割合が0.11%と検出限界以下の低水準であった(図4)。また、先行論文(*Nat Biotechnol*, 27:743-745, 2009)において、未分化細胞残存による腫瘍化の可能性がないことが示される。そのため、移植による検証は行わなかった。現状では、細胞膜に発現するAQP4の割合が低いために、凍結融解後に生存する細胞が大幅に減少し、形成されるニューロスフェアの細胞数も減少した。そのため、移植実験に用いる細胞数も、 4×10^4 個と少なく、腫瘍化が形成されにくい結果となった(*PLoS ONE*, 4:e33544, 2012)。

今後の課題として、細胞膜でのAQP4発現を誘導する小分子や物質が同定されれば、分化効率を改善し、質の高い細胞を選別することに有効であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

加藤靖浩、阿部陽一郎、安井正人、水チャネル(アクアポリン)の耐凍性を活用した生物学、発達腎研究会誌、査読無し、23巻1号、2015年、23-27頁
<http://jglobal.jst.go.jp/public/2009042/201502235758267438>

〔学会発表〕(計2件)

1. 加藤靖浩、細胞選別を目的とした超急速凍結法 “アクアポリン x iPS細胞”、超異分野学会、2015年3月8日、アステラス製薬旧本社ビル（東京都中央区）

2. 加藤靖浩、Bioengineering technique by the freeze tolerance of water channel aquaporin、ISTNR、2015年6月12日、マタラム（インドネシア）

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 正人（YASUI, Masato）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90246637

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡田 洋平（OKADA, Yohei）

愛知医科大学・医学部・准教授（特任）

研究者番号：30383714

加藤 靖浩（KATO, Yasuhiro）

北京大学・医学部（天士力微循環研究センター）・室長

研究者番号：40398780