

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22360344

研究課題名(和文) ヒト細胞の活性状態を規定する工学パラメータの策定と細胞寿命評価

研究課題名(英文) Formulation of parameters for quantitative definition of the vitality of human cells and evaluation of their life-span

研究代表者

田谷 正仁 (Taya, Masahito)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：60144127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円、(間接経費) 3,750,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト正常細胞に関して、工学的パラメータに基づいた細胞寿命評価手法の構築とその生理的な裏付けを行った。まずヒト角化細胞は細胞寿命に近づく際に、残り分裂回数がある一定以下に到達すると、外的指標である細胞面積の増大と内的指標である抗酸化酵素の発現量の増大が相関した形で引き起こされることを明らかにした。次に、核内分裂が生じることで核と細胞質の巨大化が進行し、やがて細胞死に至るヒト細胞の巨核球分化を対象とし、酸化ストレス因子である過酸化水素を添加すると寿命の短縮と巨核球分化の促進が引き起こされ、内的指標である遺伝子発現レベルにおいて酸化ストレス応答が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We formulated parameters for defining quantitatively the vitality of human cells and evaluated their life-span. First, passage cultures of human keratinocytes showed that the addition of hydrogen peroxide shortened the life-span of human keratinocytes. The drastic increases of average cell area and gene expression were observed when the remaining number of population doublings reached a specified value. Next, we focused on the megakaryocytic(MK) differentiation of human cells, which is the development of polyploidy cells via endomitosis. We revealed that the progression of committed MK cells to the endomitotic phase of differentiation depended on the reactive oxygen species (ROS) level. These results provide an evidence showing the importance of oxidative stress to MK differentiation.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学，生物機能・バイオプロセス

キーワード：ヒト細胞 細胞寿命 酸化ストレス 細胞活性 細胞面積 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ヒト正常細胞の *in vitro* 培養では、培養経過とともに細胞分裂能力が減少し、やがて細胞分裂が停止して寿命に達する。寿命は培養条件に左右され、酸化ストレスの負荷や増殖因子の添加など様々な要因により短縮する一方、低酸素濃度下や抗酸化物質の存在下では寿命は延長する。このように、哺乳類細胞の寿命に影響を与える要因の解明は、再生医療をはじめとしたヒト細胞培養における培養指針となるだけでなく、好氣的代謝を行う生物の寿命について重要な知見を与える、先駆的かつ創造的な内容であると考えられ、創薬や化学物質の毒性評価といった様々な分野に寄与しうるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、工学的パラメータに基づいた細胞寿命評価手法の構築とその生理学的裏づけである。現状では、細胞寿命は細胞内の酸化状態や細胞の遊走速度に關与することが予備的に検証されている。したがって本研究は、寿命は細胞が保持する細胞余命ポテンシャルに依存し、その減衰により寿命に到達するという考えに基づき、細胞余命ポテンシャルの評価指標の確立を目的とする。同時に、遺伝子発現解析や免疫染色を用いた細胞骨格細胞解析、細胞内 ROS 含量の測定などにより生理学的評価を行い、寿命の短縮・延長に関するメカニズムの裏づけを行う。ヒト細胞の寿命に影響を与える要因の解明を行うことで、*in vitro* 培養における細胞分化誘導などの培養プロセスに指針を与えることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト角化細胞の細胞寿命の進行に伴う細胞状態の評価

使用細胞として、新生児包皮組織から単離したヒト角化細胞を用いた。継代培養を行い、通常条件と $60 \mu\text{M}$ H_2O_2 添加条件における累積分裂回数 PD の経時変化に対し、修正 Gompertz 式を適用して最大分裂回数 PD_m を決定した。さらに、継代数 $N_0 = 3$ より継代毎に全細胞および増殖性細胞の核数を評価した。全細胞の核および増殖性細胞を、それぞれ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、抗 Ki67 抗体で二重染色した後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。増殖性細胞比率 R_p は、DAPI 陽性核数に対する Ki67 陽性細胞数の比率として定義した。同時に mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を行い、*cat*、*sod2*、*sod3* の3つの遺伝子発現量を解析した。

(2) ヒト造血幹細胞ならびにその細胞株の巨核球分化の評価

造血幹細胞の *in vitro* 培養における血小板産生は、トロンボポイエチン (TPO) と呼

ばれるサイトカインを添加することで、細胞質分裂を伴わず細胞内核分裂のみが進行する巨核球分化が誘導され、約1週間程度で細胞寿命に達し細胞質が崩壊することで行われる。この巨核球分化には、培養として汎用性の高い細胞株が存在し、ヒト由来の K562 株などが巨核球分化機構解明のために研究されている。K562 は、多能性幹細胞的性質を有しており、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) により巨核球系細胞へと分化する。造血系幹細胞の巨核球分化に関しては、酸化ストレスが重要なシグナルとして働くことが報告されているため、PMA により分化誘導させた K562 細胞に非致死的な濃度の過酸化水素を添加することで、巨核球系分化に与える影響を確認した。

細胞株 K562 は、PMA (10 ng/ml) を添加することで巨核球系分化を誘導し、 H_2O_2 (60 $\square\text{M}$) 添加の有無の条件下で3日おきに培地交換を行い、11日間培養した。また、培養1日後から2日おきに、細胞生存率、アポトーシス、倍数性をフローサイトメトリーにより測定した。加えて、培養1日後の細胞内活性酸素 (ROS) 量と、BrdU の取込みを同じくフローサイトメトリーにより求めた。一方、造血幹細胞に関しては、PMA のかわりに TPO (100 ng/ml) を添加し、同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト角化細胞の細胞寿命の進行に伴う細胞状態の評価

(1)-1 継代回数ならびに過酸化水素の添加が及ぼす細胞寿命と細胞面積への影響

過酸化水素添加の有無の条件下で、ヒト角化細胞の一連の継代培養を実施した。典型的な培養における累積分裂回数 PD および平均細胞面積 \bar{A}_c の経時変化を図1に示す。過酸化水素無添加条件において継代培養した角化細胞は、累積培養時間が約600時間前後で増殖が停止していることが確認された。一方、 $N_0 = 3$ より過酸化水素を添加した条件においては、約450時間付近で増殖が緩慢となることが分かり、過酸化水素の添加により角化細胞の寿命が短縮することが示された。また \bar{A}_c に関しては、両培養条件において培養約300時間までは $\bar{A}_c \cong 1 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ を維持していたが、通常条件では約400時間から平均細胞面積の顕著な増加が確認され、培養終了時には $\bar{A}_c \cong 4 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ となった。一方、過酸化水素添加条件では300時間後から増加し始め、培養終了時で $\bar{A}_c \cong 5 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ となり、通常条件と同様に角化細胞が寿命に近づくにつれ面積が増加することが確認された。

次に、上記の培養条件においてそれぞれ3回実施した継代培養のデータに対して、最大分裂回数 PD_m を決定した。通常条件では、最大分裂回数は $PD_m = 15.6 \pm 0.5$ 、過酸化水素添加条件では、 $PD_m = 12.8 \pm 0.7$ となり、後者の条件下では PD_m 値の低下が確認された。

ここで、得られたパラメータ値から各培養時間における微分係数 r_{PD} を求めた。通常条件では時間経過につれて比較的ゆるやかに r_{PD} 値が減少するのに対し、過酸化水素を添加した場合、添加を開始した直後から培養 300 時間までの r_{PD} 値の減少が大きいことがわかった。本研究では、両培養条件で $r_{PD} = 2.0 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ を与える時間、すなわち、通常条件で $t = 371 \text{ h}$ 、過酸化水素添加条件で $t = 304 \text{ h}$ において、平均細胞面積の増加が認められたことから (図 1)、この微分係数の値を細胞挙動に影響を与える境界点とみなした。

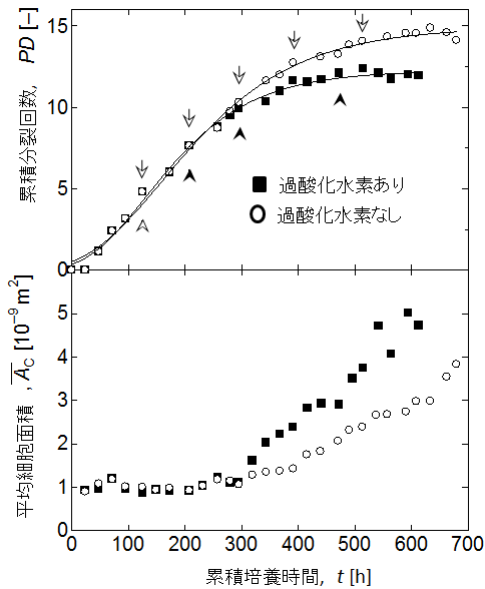


図 1 過酸化水素の有無の条件において、ヒト角化細胞を継代した際の平均細胞面積と累積分裂回数の経時変化。図中の矢印は、過酸化水素を加えた時点。

(1)-2 残り分裂回数と細胞面積および増殖性細胞比率の関係

各培養条件下における平均細胞面積 \bar{A}_c と増殖性細胞比率 R_p を、最大分裂回数から培養時間 t における累積分裂回数を引いた残り分裂回数 $PD_m - PD$ に対して整理した。それぞれの条件についての培養データをまとめたものを図 2 に示す。平均細胞面積 \bar{A}_c は、残り分裂回数が少なくなるにつれ指数関数的に増加し、過酸化水素添加の有無に関わらずデータ点は良く重なることが分かった。一方、増殖性細胞比率 R_p に関しても平均細胞面積と同様に両培養条件の傾向が一致し、残り分裂回数の減少とともに低下していることから、細胞が寿命に近づいていることの裏付けとなった。ここで図中の斜線部は、すべての培養において $r_{PD} = 2.0 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ をとる時間での累積分裂回数 PD^* より算出した残り分裂回数であり、角化細胞の固有値 $PD_m - PD^* = 2.7 \pm 0.3$ となった。また、培養条件の違いから生じる最大分裂回数の変化によらず、平均細胞面積、増殖性細胞比率ともに $PD_m - PD^*$ 値を境に変化していることから、この $PD_m - PD^*$

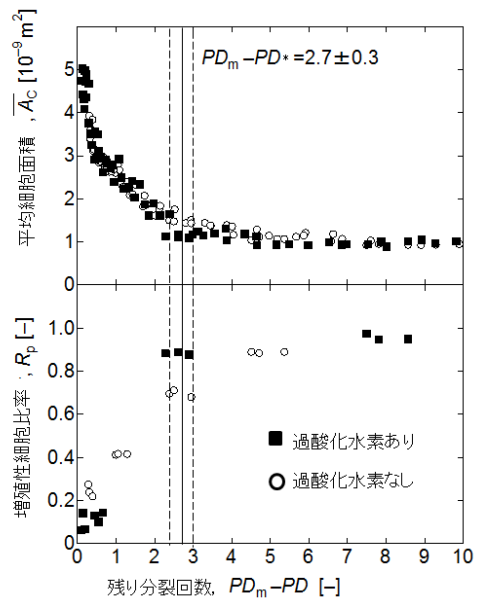


図 2 過酸化水素の有無の条件において、ヒト角化細胞を継代した際の平均細胞面積と増殖性細胞を残り分裂回数で整理したプロット。図中の実線は、細胞挙動に影響を与える境界点。

は細胞寿命に関する共通パラメータとして有効であると考えられる。また以上の結果から、平均細胞面積 \bar{A}_c は最大分裂回数で整理されるヒト培養細胞の寿命と相関性をもつ外的指標となると考えられる。

(1)-3 細胞寿命と酸化ストレス応答遺伝子の相関

ヒト培養細胞において、カタラーゼの発現量が過酸化水素の添加濃度に依存して増大することが報告されている。さらに、本研究においても、過酸化水素の添加により寿命が短縮したことをから、細胞の寿命と細胞内指標としての酸化ストレス応答の相関性を検討した。ここでは、カタラーゼをコードする遺伝子 *cat* および代表的な抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) をコードする遺伝子 *sod3* に着目した。

残り分裂回数に対して各遺伝子の発現

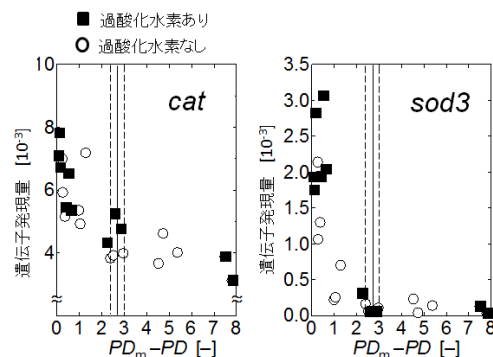


図 3 過酸化水素の有無の条件において、残り分裂回数に対するヒト角化細胞の遺伝子発現量のプロット。図中の実線は、細胞挙動に影響を与える境界点。

量を整理した結果を図 3 に示す。cat 遺伝子は、過酸化水素の添加の有無に関わらず、残り分裂回数の減少に伴い徐々に発現量が増加し、特に残り分裂回数が閾値 ($PD_m - PD^* = 2.7 \pm 0.3$) 以下になってからその傾向が強くなることが確認された。カタラーゼ活性に関しては、阻害剤により活性を低下させることでヒト培養細胞の老化が進行すると報告されており、細胞の老化における重要な役割をもっていると考えられる。次に、sod3 遺伝子に関しても、両培養条件において残り分裂回数が閾値を超えてから急激な発現量の増加が確認された。以上の結果より、cat や sod3 遺伝子の発現量が、最大分裂回数で整理されるヒト培養細胞の寿命と相関性をもつ内的評価指標となることが示唆された。

得られた結果は新規性の高い内容として国内学会および雑誌論文において発表した。

(2) ヒト造血幹細胞ならびに細胞株の細胞寿命と巨核球分化の評価

(2)-1 細胞株 K562 を用いた評価

図 4 に、PMA により分化させた K562 細胞の細胞生存率、アポトーシス割合、高倍数性 ($\geq 8N$) 割合を示す。細胞生存率に関しては、 H_2O_2 添加の有無に関わらず、培養 1 日後では 90% 以上を保っているが、培養 3 日後に約 60% 前後まで大きく低下した。その後、 H_2O_2 を添加していない条件では緩やかに回復するが、 H_2O_2 を添加した条件では、ほぼ横ばいとなっていた。この結果から、 H_2O_2 の添加は、PMA 分化に付随する生存細胞率の低下を促進さ

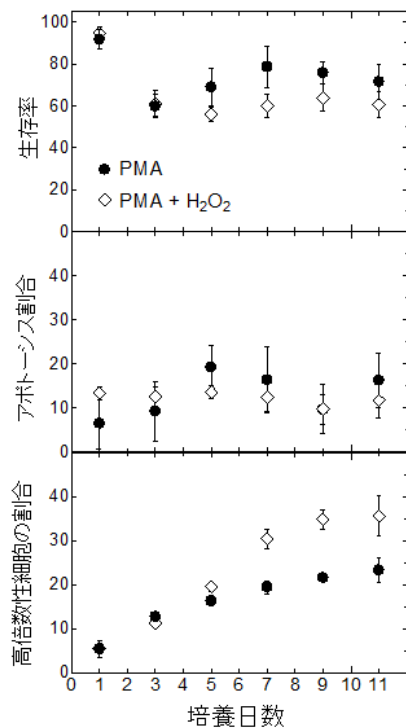


図 4 K562 細胞の細胞生存率、アポトーシス割合、高倍数性 ($\geq 8N$) 割合

せることがわかった。一方、細胞死誘導を示すアポトーシスの割合は、 H_2O_2 添加の有無によらず培養期間中 10% から 20% の間の値をとることがわかり、 H_2O_2 添加による細胞生存率の低下はアポトーシスの誘導によるものではないことがわかった。また巨核球系細胞への分化の指標となる細胞の倍数性に関しては、培養 3 日後までは H_2O_2 添加による影響は確認されなかったが、培養 5 日後から H_2O_2 添加条件において、倍数性が 8N 以上の高倍数性の細胞割合が増加し始め、培養 9 日後では H_2O_2 添加条件で $34.8 \pm 2.3\%$ 、 H_2O_2 非添加条件で $21.5 \pm 0.8\%$ となり、 H_2O_2 の添加により倍数性の増加が大幅に促進されることがわかった。 H_2O_2 の添加が倍数性を増加させた原因として、PMA を添加することで、K562 細胞の細胞内 ROS 含量が約 4 倍増加し、さらに H_2O_2 を添加することで約 7 倍に増加することが確認された (データ省略)。この結果から、K562 細胞の PMA 分化においても活性酸素が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、 H_2O_2 を添加した場合、培養 1 日後の 2N の割合が約半分に低下していることがわかり、BrdU の取込みにより細胞分裂を確認したところ、表 1 に示すように H_2O_2 を添加すると、BrdU 陽性の 4N 細胞が約 10% 増加し、BrdU 陽性の 2N 細胞がほとんど存在しないことが判明した。よって、 H_2O_2 の添加は、細胞内 ROS を増加させ細胞分裂を抑制することで、高倍数性を促進していると結論付けられた。

表 1 培養 12 時間後において、BrdU を取込んだ (陽性) もしくは取込んでいない (陰性) 細胞の割合 [%]

BrdU	H_2O_2 無添加	H_2O_2 60 μ M 添加
陽性 4N	58.7 ± 2.1	68.8 ± 0.4
陰性 4N	8.4 ± 0.2	8.3 ± 1.0
陽性 2N	10.4 ± 0.6	0.8 ± 0.1
陰性 2N	22.5 ± 1.5	22.1 ± 0.6

(2)-2 造血幹細胞を用いた評価

これまで、K562 細胞の巨核球分化に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることを明らかにし、外因性の過酸化水素を添加することで分化が促進されることを報告した。

そこで、得られた知見を基にヒト初代造血幹細胞を用いて、巨核球分化における酸化ストレスの影響を確認した。ヒト初代造血幹細胞に酸化ストレスとして過酸化水素を、また一方で抗酸化剤として *N*-acetylcysteine (NAC) を添加すると、特に未成熟な巨核球細胞において NAC による分化の抑制が見られた。さらにこの時の細胞の遺伝子発現量を解析したところ、抗酸化酵素であるカタラーゼの発現が巨核球分化の誘引により抑制されることを発見し、内在的 ROS を増加させる要因

であると推測された。以上の結果から、ヒト初代造血幹細胞の巨核球分化では、特に誘導初期において酸化ストレスが重要であることが明らかになった。

得られた結果は新規性の高い内容として国内外学会および雑誌論文において発表した。

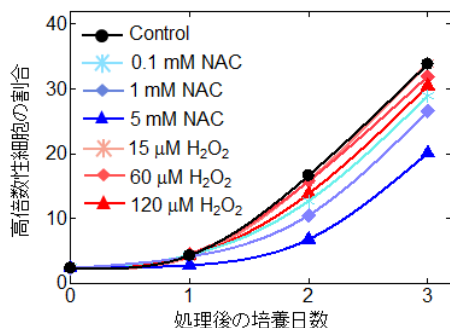


図 5 K562 細胞の細胞生存率，アポトーシス割合，高倍数性(≥8N)割合

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)

Tomoaki Ashida, Yoshihiro Ojima, Shinji Sakai, Makiko Sakka, Kazuo Sakka, Koei Kawakami, Masahito Taya, Designing of fusion protein with carbohydrate-binding module with affinity to enzymatically gellable carboxymethylcellulose derivative hydrogel, J Chem Eng Jpn, 査読有, 印刷中

Yoshihiro Ojima, Mark T Duncan, Retno W Nurhayati, Masahito Taya, William M Miller, Synergistic effect of hydrogen peroxide on polyploidization during the megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells by PMA, Exp Cell Res, 査読有, Vol. 319, No. 14, 2013, 2205-2215 DOI: org/10.1016/j.yexcr.2013.06.002
尾島由紘, 芦田知亮, 楠田綾子, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, ヒト角化細胞の細胞寿命の進行に伴う細胞状態の評価指標, 化学工学論文集, 査読有, Vol.37, No.4, 2011, pp.351-355

DOI:10.1252/kakoronbunshu.37.351
Mee-Hae Kim, Naoki Tsubakino, Shogo Kagita, Masahito Taya, Masahiro Kino-oka, Characterization of spatial cell distribution in multilayer sheet of human keratinocytes through a stereoscopic cell imaging system, J Biosci Bioeng, 査読有, Vol.112, No.3, 2011, pp.289-291
DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.05.015
Masrina Mohd Nadzir, Masahiro Kino-oka,

Nao Maruyama, Yasuyuki Sato, Mee-Hae Kim Katsura Sugawara, Masahito Taya, Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of chondrocytes during passage culture, J Biosci Bioeng, 査読有, Vol.112, No.4, 2011, pp.395-401

DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.06.005

Shohreh Mashayekhan, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Jun-ichi Miyazaki, Masahito Taya, Embryonic stem cells maintain an undifferentiated state on dendrimer-immobilized surface with D-glucose display, Polymers, Vol.3, No.4, 2011, pp.2078-2087

DOI:10.3390/polym3042078

Masahiro Kino-oka, Shogo Kagita, Masrina Mohd Nadzir, Hirofumi Inoue, Masahito Taya, Direct measurement of oxygen concentration inside cultured cartilage for relating to spatial growth of rabbit chondrocytes, J Biosci Bioeng, 査読有, Vol.110, No.3, 2010, pp.363-366
DOI:10.1016/j.jbiosc.2010.03.009

Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Nao Maruyama, Atsuhiko Saito, Yoshiki Sawa, Masahito Taya, Cardiomyogenic induction of human mesenchymal stem cells by altered Rho family GTPase expression on dendrimer-immobilized surface with D-glucose display, Biomaterials, 査読有, Vol.31, No.30, pp.7666-7677
DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.06.034

DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.06.034

[学会発表](計 11 件)

Retno W Nurhayati, Naoki Nomura, Yoshihiro Ojima, Masahito Taya, The promotion of Megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress generated by black light irradiation, Molecular Life Sciences 2013, October 4 2013, Frankfurt(Germany),

尾島由紘, Duncan Mark, Nurhayati Retno, Miller William, 田谷正仁, 巨核球分化中の高倍数性化における酸化ストレスの役割, 日本生物工学会大会平成 25 年度大会, 2013 年 9 月 18 日, 広島国際会議場(広島)
野村 直希, Nurhayati W. Retno, 尾島由紘, 田谷正仁, 種々のストレス負荷が K562 細胞の巨核球系分化に与える効果, 化学工学会第 78 年会, 2013 年 3 月 19 日, 大阪大学(大阪)

Retno Nurhayati, Yoshihiro Ojima, Mark Duncan, William Miller, Masahito Taya, The role of oxidative stress in the megakaryocytic differentiation of K562 cells, 日本生物工学会平成 24 年度大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸国際会議場(神戸)

尾島由紘, 小林昇平, Nurhayati Retno, 原口徳子, 田谷正仁, K562 細胞の巨核球系分化における培養面への一過性接着の重要性, 日本生物工学会平成 24 年度大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸国際会議場(神戸) 芦田知亮, 尾島由紘, 境 慎司, 粟冠 真紀子, 粟冠和郎, 川上幸衛, 田谷正仁, セルロース結合ドメインを介した CMC 誘導体ヒドロゲル培養基材の機能修飾, 化学工学会第 77 回年会, 2012 年 3 月 15 日, 工学院大学(東京)

Tomoaki Ahida, Yoshihiro Ojima, Shinji Sakai, Makiko Sakka, Kazuo Sakka, Koei Kawakami, Masahito Taya, Designing functional cellulose derivative hydrogel with proteins for biomedical applications, IUMRS-ICYRAM 2012, July 5 2012. Singapore (Singapore)

尾島由紘, Duncan Mark, Miller William, 過酸化水素による白血球細胞株 K562 の巨核球系細胞分化の促進, 第 4 回化学工学 3 支部合同福井大会, 2011 年 10 月 9 日, ホテルフジタ福井(福井)

Yoshihiro Ojima, Mark T Duncan, William M Miller, Hydrogen peroxide increases the polyploidisation of PMA-differentiated K562 cells, The 17th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2011), October 8 2011, Incheon (Korea) Masrina Mohd Nadzir, Masahito Taya, Masahiro Kino-oka, Architecture of chondrocyte aggregates embedded in collagen gel, International Conference on Biofabrication 2011, 2011 年 10 月 7 日, Toyama(Japan)

尾島由紘, 芦田知亮, 楠田綾子, 紀ノ岡 正博, 田谷正仁, ヒト角化細胞の継代培養における細胞寿命と細胞特性の相関, 日本生物工学会平成 22 年度大会, 2010 年 10 月 29 日, ワールドコンベンションセンターサミット フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎)

〔図書〕(計 1 件)

Masahito Taya, Masahiro Kino-oka et al., Elsevier, Comprehensive Biotechnology 2nd Edition, 2011, pp.135-169

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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.cheng.es.osaka-u.ac.jp/taya/abo/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田谷 正仁 (TAYA, Masahito)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号: 60144127

(2) 研究分担者

尾島 由紘 (OJIMA, Yoshihiro)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 20546957

(3) 連携研究者

倉岡 功 (KURAOKA, Isao)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 60335396