

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656524

研究課題名(和文)ES細胞の脱核とその利用による多能性幹細胞の作製

研究課題名(英文)A study of the enucleation of embryonic stem cells and the effective induction of the pluripotent stem cells by the use of the enucleated embryonic stem cells

研究代表者

川本 卓男 (KAWAMOTO, Takuo)

京都大学・放射性同位元素総合センター・教授

研究者番号：10231276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：安全で効率のよいiPS細胞の誘導法を開発が、注目されている。そこで、本研究では、脱核したES細胞を利用して体細胞核由来の多能性幹細胞を作製する新規で安全な方法を開発するため、まずは、ES細胞を脱核し得られる細胞質体(cytoplasm)や、体細胞の核体(karyoplast)を、純度よく効率的に得る方法を検討した。その結果、サイトカラシンBによる処理とFicollを用いた密度勾配遠心法とを組み合わせた方法が有望であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：World-wide attention has been focused on the development of the efficient methods for induction of safe iPS cells. Therefore, the method to obtain the pure cytoplasm prepared from the enucleated ES cells and karyoplast prepared from somatic cells was at first examined in order to develop the efficient methods for induction of the pluripotent stem cells by the use of the enucleated ES cells. As a result, it was found that the combination of the density gradient centrifugation method using Ficoll and the treatment with cytochalasin B was promising.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ES細胞 多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 世界中の研究者が、安全で効率の良い人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞の誘導法を開発しようとしのぎを削っている。しかし、そのほとんどが、体細胞に導入する遺伝子の種類や数、その導入法の改良、あるいは化学物質の利用といった観点からの研究であった。

(2) クローン胚を作成する際、核を除いた未受精卵に体細胞核を核移植する方法が用いられ、未受精卵の細胞質が体細胞核を初期化することは良く知られていた。そして、多田らは、胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞と体細胞を細胞融合することで4倍体化したES細胞様の細胞を誘導し、ES細胞にも体細胞核を初期化する能力があることを示した。しかし、この多田らの方法では、融合後の細胞においてES細胞の核の影響が残ることが、免疫拒絶反応を回避する上でも大きな障害となっていた。

(3) ES細胞は、接着性の細胞で未受精卵に比べ小さいため、未受精卵において使われている核を物理的に取り除く核移植の技術そのままES細胞に適用することは困難である。これらの事情もあってか、ES細胞の細胞質の利用は着目されてこなかった。

(4) 本研究代表者は、ウイスコンシン大トムソン研究室にてヒトES細胞の未分化維持因子を探索する研究をしていた関係上、これらの状況や結果に非常に興味を持ち、ES細胞の持つ初期化能を利用し、かつES細胞の核の影響を防ぐ方法として、ES細胞を脱核して用いる方法を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

安全で効率のよいiPS細胞の誘導法を開発が、注目されているが、そのほとんどが、体細胞に導入する遺伝子の種類や数、その導入法の改良、あるいは化学物質の利用といった観点からの研究である。本研究では、それらとは違った観点から、ES細胞の持つ初期化能を利用して体細胞核由来の多能性幹細胞を作製する新規で安全な方法を検討する。

まずは、ES細胞を脱核することによって得られる細胞質体 (cytoplasm) や、体細胞由来の核体 (karyoplast あるいは mini-cell) を、純度よく効率的に得る方法を確立し、その結果、ES細胞由来の細胞質体を得ることができれば、得られたES細胞由来の細胞質体、体細胞や体細胞由来の核体と組み合わせて利用することで、体細胞由来の核を初期化し、体細胞核由来の多能性幹細胞の作製を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 体細胞株

今回、体細胞としては、ヒト胎児由来腎臓

細胞 (HEK細胞) を用いた。

HEK細胞の培養は、ウシ胎児血清 (FBS) 10%、ペニシリン/スプレプトマイシン混合液 1% を含む D-MEM (High Glucose) を基本培地とした。

### (2) ES細胞株

ES細胞株としては、EB5株、CGR8株 (DSファーマバイオメディカル株式会社) を用いた。

純度の高いES細胞を得るために、培養は、フィーダー細胞を用いないフィーダーレス培養 (図1) とし、培養皿をゼラチンコートして用いた。培養に用いる培地は、10% KSR (knockout serum replacement)、1% NEAA (非必須アミノ酸)、0.1mM ピルビン酸ナトリウム、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2000 U/mL LIF (leukemia Inhibitory Factor) を含む GMEM (Glasgow's minimum essential medium) を基本培地とした。

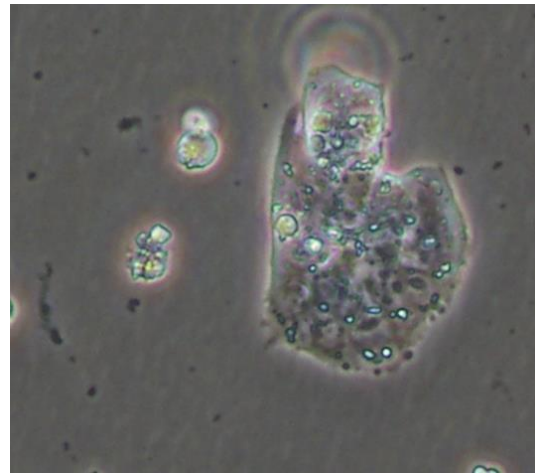


図1 フィーダーレス培養したES細胞のコロニーの例

ゼラチンコートした培養皿を用い、フィーダー細胞なしで、ES細胞を播種し、37°Cで培養後、顕微鏡を用いて写真撮影をした。

### (3) 細胞の脱核と、細胞質体および核体の分画の方法

10  $\mu$ g/mL の濃度のサイトカラシン B (図2) で細胞を処理することによって、細胞と核の入った袋とが細い細胞膜の橋でつながったような形になり、これを機械的に切断するか、遠心操作によって分断することによって、無核の細胞が得られることがあるということが知られている。そこで、細胞を脱核し核体と細胞質体に分けるためには、サイトカラシン B を利用することにした (方法の詳細は、4. 研究成果の項を参照)。

遠心操作による場合には、Ficoll を用いた密度勾配遠心法を用いた。各濃度に調整した

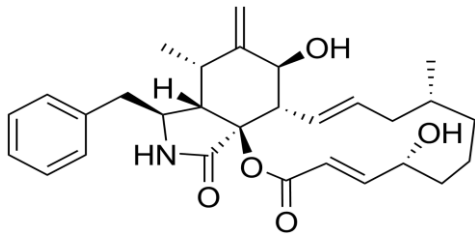


図2 サイトカラシンB

Ficoll を図3に示すように重層した遠沈管を用い、遠心後、各濃度に対応する画分を分取し、解析した。

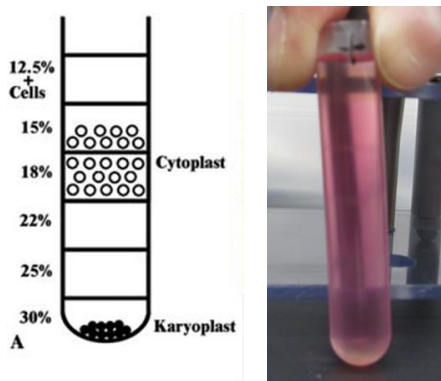


図3 Ficoll を用いた密度勾配遠心法

左の図Aは各濃度のFicollを重層した遠沈管における遠心後の分画の様子を示すモデル図。右の図は、実際に遠心操作を行った時の遠沈管の様子例。

#### 4. 研究成果

(1) サイトカラシンBが細胞に与える影響の検討

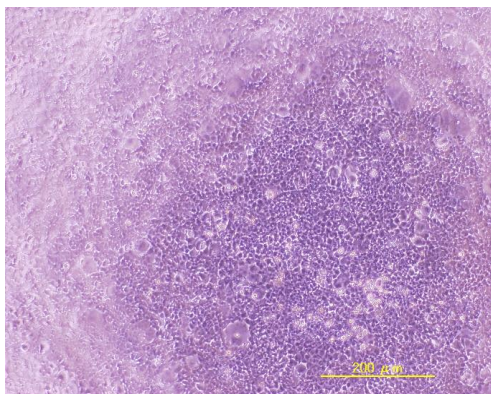


図4 サイトカラシンBの添加なしで24時間培養したHEK細胞

まず、サイトカラシンBが、細胞に与える影響を、培養皿を用いて接着培養したHEK細胞に、 $1\mu\text{g/mL}$ ~ $50\mu\text{g/mL}$ の各濃度に調整したサイトカラシンBを加え、検討した。サイトカラシンBは $1\text{mg/mL}$  DMSO水溶液に溶解して用いた。

その結果、比較的低濃度でも細胞がはがれ

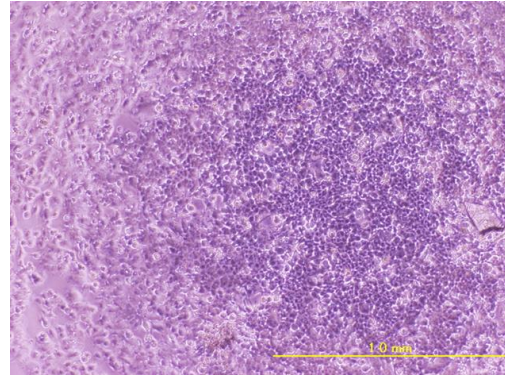


図5  $1\mu\text{g/mL}$ のサイトカラシンBを添加し24時間培養したHEK細胞

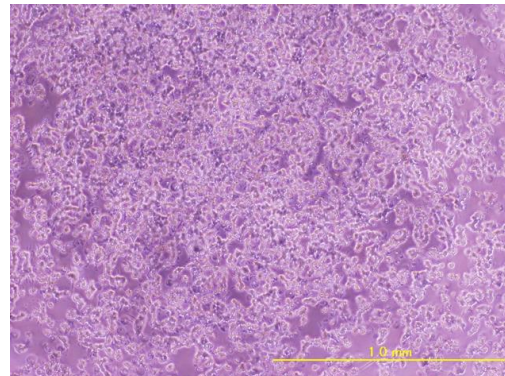


図6  $5\mu\text{g/mL}$ のサイトカラシンBを添加し24時間培養したHEK細胞

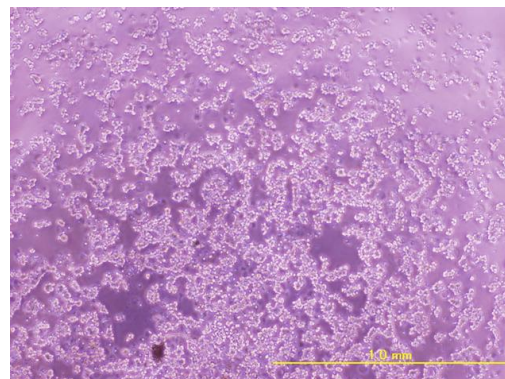


図7  $10\mu\text{g/mL}$ のサイトカラシンBを添加し24時間培養したHEK細胞

てしまうなどして大きなダメージを受けている様子が観察された (図 4~7)。そこで、サイトカラシン B を無添加で 24 時間培養した場合 (図 4) 生細胞数を 1 として、各濃度のサイトカラシン B を添加し 24 時間後の生細胞数を評価したところ、1、5、10、30、50  $\mu\text{g/mL}$  の濃度に対して、それぞれ、0.22、0.09、0.07、0.05、0.00 となり (表 1)、1  $\mu\text{g/mL}$  でも、比較的大きなダメージを受けていることが確認された。

表 1 サイトカラシン B の影響

CB濃度( $\mu\text{g/mL}$ )	1	5	10	30	50
細胞数相対評価	0.22	0.09	0.07	0.05	0.00

CB: サイトカラシン B

10  $\mu\text{g/mL}$  のサイトカラシン B で細胞を処理することによって無核の細胞が得られるとの報告もあるが、HEK 細胞では、サイトカラシン B によるダメージが大きすぎることを示唆された。

#### (2) ES 細胞の脱核と細胞質体や核体の分画

ES 細胞を、サイトカラシン B による処理と Ficoll を用いた密度勾配遠心法を利用して脱核し、細胞質体と核体を分画する方法を検討した。

用いる Ficoll の濃度や、遠心時間、遠心操作中の温度などを検討したところ、ES 細胞を、4.8  $\mu\text{g/mL}$  のサイトカラシン B を含む培地を用いて培養後、サイトカラシン B を 10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で含む状態で、3. 研究の方法で示したように Ficoll を重層した遠沈管を用いて、37°C で 30 分間遠心することで、18% 画分あたりに脱核された細胞質体 (図 8~10) が、一番下の 30% 画分には核を含む状態のもの (図 11~13) が存在しており、細胞質体や核体の分画できる可能性があることを見出すことができた。

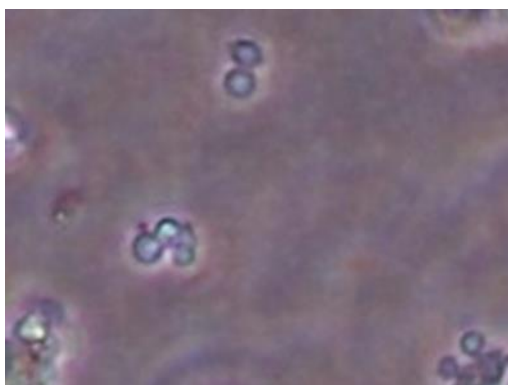


図 8 18%画分の顕微鏡写真 (明視野)

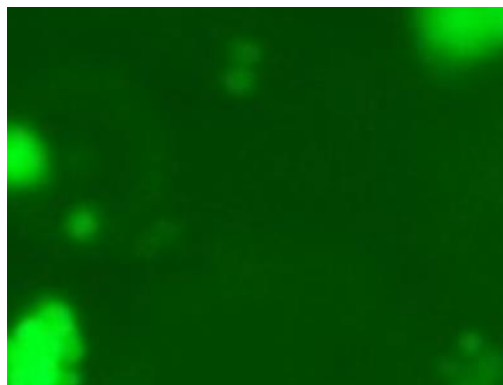


図 9 Calcein で染色した 18%画分の顕微鏡写真

生細胞を染色する Calcein に染まる部分が確認された。



図 10 Hoechst 33342 により染色した 18%画分

図 9 と比較し、核を染色する色素である Hoechst 33342 で染まる部分がほとんどない。このことから、18%画分には細胞質体が存在する可能性があると考えられる。

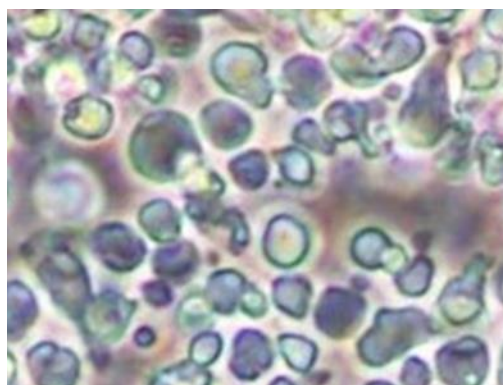


図 11 核を含む状態のものが存在すると考えられる一番下の 30%画分の顕微鏡写真 (明視野)

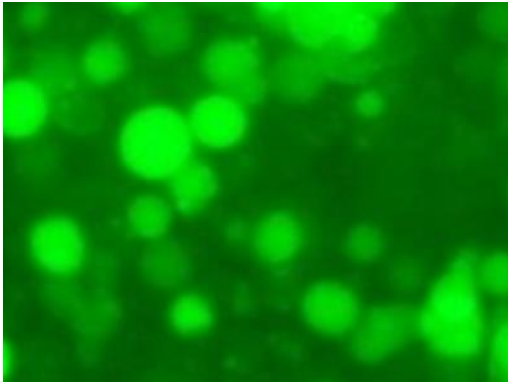


図 12 Calcein で染色した 30%画分の顕微鏡写真  
生細胞がいくつか存在することが確認できた。

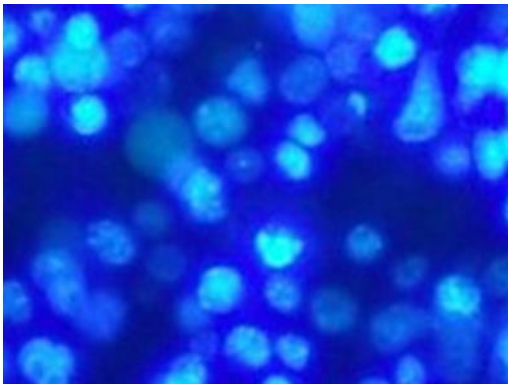


図 13 Hoechst 33342 により染色した 30%画分  
染色される部分が多く、この画分は核を含む状態のものが多く存在することが確認できた。

本研究によって、ES 細胞を脱核し ES 細胞の細胞質体を得るのに、サイトカラシン B による処理と Ficoll を用いた密度勾配遠心法を組み合わせた方法が有望であることを見出した。しかしながら、得られる ES 細胞の細胞質体を用いて、体細胞の初期化に利用するためには、純度や収率などが、まだまだ不十分で、今後のさらに条件等を検討することが必要と考えられた。

#### 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 0 件)

[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

川本 卓男 (KAWAMOTO, Takuo)

京都大学・放射性同位元素総合センター・教授

研究者番号：10231276