

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659840

研究課題名（和文） 人工万能細胞を用いた細胞の若返り法の開発

研究課題名（英文） Research on cell rejuvenation by pluripotent cells

研究代表者 大河内 仁志 (OKOCHI HITOSHI)

国立国際医療研究センター 研究所 細胞組織再生医学研究部 部長

研究者番号：30185235

研究成果の概要（和文）：多能性をもつES細胞またはiPS細胞を活用して、目的とする培養細胞の老化を防止し、細胞の若返りを目指した。毛乳頭細胞は培養すると毛包誘導能が低下することが知られているので、マウスの毛乳頭細胞とES/iPS細胞を共培養したが、毛包誘導能は維持できなかった。次に、ES細胞と毛乳頭細胞を融合させたところ、ES細胞培地では融合した細胞はES細胞の性質を保持した。毛乳頭細胞培地では毛乳頭細胞の一部の遺伝子発現が維持されることを確認したが、毛包誘導能の回復は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：As cultured dermal papilla cells (DPC) lose hair-inducing ability, we co-cultured mouse DPC with mouse ES cells or iPS cells. We could not keep hair-inducing ability by these methods. Then we fused DPC with mouse ES cells. While fused cells behaved ES-like cells in ES media, they maintained some DPC specific gene expression in DPC culture media.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、形成外科

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

発生初期の細胞に近い能力をもつ ES 細胞や iPS 細胞が周囲の細胞を胎生期の環境に近くと認識させるような液性因子を放出してくれれば、人工的に胎生期に近い環境を作り出せることになり、epigenetic な変化も期待できて、細胞が‘若返る’ことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は培養細胞の機能維持のために ES 細胞や iPS 細胞を feeder 細胞として用いることにより、細胞機能が維持されていることを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス毛乳頭細胞は培養すると毛包誘導能が低下することが知られているので、毛包誘導能を指標にして、若返り具合を検討した。4-6 週齢の B6 マウスのほおひげから毛乳頭を単離し、培養皿にのせて毛乳頭細胞の初代培養を行った。2 週間後に継代し、適宜培養を継続した。毛包誘導用の角化細胞は新生児マウスの表皮から調製した。

まずセンダイウイルスで独自に樹立したヒト iPS 細胞を用いて、マイトマイシン C 添加により、iPS 細胞の増殖を抑制して feeder 細胞として使えるかを検討した。次にマウス毛乳頭細胞をマウス ES 細胞または iPS 細胞と種々の割合で混合培養したのち、毛乳頭細胞の遺伝子発現と移植による毛包誘導能を検討した。移植方法は角化細胞と毛乳頭細胞を混合して、マウス皮下に注入するパッチアッセイ法を採用した。

さらにマウス ES 細胞と毛乳頭細胞をポリエチレングリコールまたはセンダイウイルスを用いて強制的に細胞融合させて、増殖促進や毛包誘導能の維持が認められるか検討した。またフローサイトメーターで DNA 含有量を指標にして融合率を検討した。培養液の検討ならびに毛乳頭細胞に特異的に発現する遺伝子の解析と毛包誘導の細胞移植実験を行った。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞は継代時に細胞をばらばらにすると細胞の接着力が低下してしまい、ROCK 阻害剤を加えることである程度克服はできたが、細胞数を揃えて定量性を持たせることが困難であった。またマイトマイシン C の添加により、iPS 細胞の増殖を抑制してマウス毛乳頭細胞と共培養したが、毛乳頭細胞の増殖促進作用は認められず、移植実験においても毛包誘導能を確認できなかった。したがっ

て iPS 細胞をフィーダー細胞として利用することは難しいと判断した。

そこでポリエチレングリコール法やセンダイウイルス法を用いて ES 細胞と毛乳頭細胞を強制的に細胞融合させた。フローサイトメーターで DNA 含有量を指標にして 4 倍体の割合を測定し、融合率を検討すると、前者では融合率が 10% 以下で、後者の方が 50% 以上であった。細胞融合後に ES 細胞の培地すると融合した細胞は ES 細胞の未分化マーカーの発現が維持されて、ES 細胞の機能が維持されていた。一方毛乳頭細胞の培養条件 (DMEM+10%FBS +FGF2) にすると、融合した細胞は元の毛乳頭細胞と比較して、明らかな増殖促進作用は認められなかったが、細胞融合後にバーシカンなどの毛乳頭細胞に発現する遺伝子発現が維持されることを確認した。角化細胞と混合した細胞移植による発毛実験においては明らかな毛包誘導能の維持を示唆する所見は得られなかった。

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 2 件)

1. Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H. Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain. *J Biotechnol.* 154:298-303, 2011
2. Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(16):6412-7, 2013

[学会発表] (計 1 件)

大河内仁志, 真皮の細胞を用いた再生医学,
第20回日本形成外科学会基礎学術集会,
2011年10月6日、東京

〔図書〕(計2件)

1. Hitoshi Okochi Adult Stem Cell: Sources and Characterization Tissue Engineering- From lab to Clinic. edited by Norbert Pallua and Christoph V. Suschek Springer p83-92, 2011
2. 大河内仁志 組織幹細胞 「再生医療叢書 1 幹細胞」 山中伸弥、中内啓光編 朝倉書店 p30-48, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 仁志 (OKOCHI HITOSHI)

国立国際医療研究センター 研究所 細胞組織再生医学研究部 部長

研究者番号 : 30185235