

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670754

研究課題名(和文)非接着培養で形成される凝集塊の未分化性獲得機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism to obtain undifferentiated ability by making aggregate

研究代表者

貴志 和生 (Kazuo, Kishi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40224919

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)：細胞凝集塊形成による未分化性獲得のメカニズムに迫ることを目的とした。マウス線維芽細胞凝集塊形成により、未分化マーカーの上昇を認めた。しかしこれらは、作成したクローンの中でバラツキがあり、単一の細胞から分裂した線維芽細胞であっても、細胞塊を形成する段階で、周囲環境の違いにより、さまざまな未分化マーカーの発現の差異を生じることが判明した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to find out the mechanism of getting undifferentiated ability by making aggregates. In mouse fibroblasts, undifferentiated markers were upregulated by making aggregates. The levels of undifferentiated markers were, however, differs in between each clones. Surrounding conditions were thought to affect the expression levels of these undifferentiated markers.

研究分野：形成外科

キーワード：再生 皮膚 未分化

1. 研究開始当初の背景

われわれは、線維芽細胞を非接着性培養皿で無血清培地による培養を行い、細胞凝集塊を形成させることで、毛包誘導能が消失した細胞や、本来毛包誘導能を有していない細胞が、毛包誘導能を回復ないし獲得するという現象を発見した。われわれは、線維芽細胞を非接着性培養皿で無血清培地による培養を行い、細胞凝集塊を形成させることで、毛包誘導能が消失した細胞や、本来毛包誘導能を有していない細胞が、毛包誘導能を回復ないし獲得するという現象を発見した (Shimizu et.al. Exp. Dermatol.2011)。また、細胞が凝集塊を形成すると細胞が増殖しなくなり、かつ長期の生存が可能な細胞の冬眠という状態になり、さらにさまざまな幹細胞特異的に働いている膜表面マーカーや転写因子が著しく上昇することを発見した。これは生体内では種々の幹細胞に認められる現象である。これらのことは、間葉系細胞が細胞凝集塊を形成することで、in vitro で未分化性を有するように変化ということの意味する。このように線維芽細胞が、細胞凝集塊を形成することで未分化性を有する細胞に変化する理由として、ふたつの仮説が考えられる。ひとつは、さまざまな種類の細胞が混在した線維芽細胞の中から、凝集塊を形成することで、本来未分化な細胞が生き残り分裂することで未分化な細胞集団となるという仮説 (エリート仮説) で、もう一方は凝集塊を形成することで、分化した細胞が未分化な細胞に脱分化するという仮説 (脱分化仮説) である。これは、体細胞の全てが山中 4 因子を加えても iPS 細胞に変化することはないという報告や、体細胞の中に存在する幹細胞と考えられる multilineage-differentiating stress enduring (muse)細胞は、高率に iPS 細胞に変化するという報告 (Wakao S.et.al., Proc Natl Acad Sci U S A.2011 108(24):9875-80.) から、近年活発に議論されているところである。

2. 研究の目的

われわれは、線維芽細胞を非接着培養皿を用いて培養し細胞凝集塊を形成すると、細胞がある程度未分化な状態に変化し、移植後に毛包誘導能を獲得することを示した。しかし線維芽細胞は、さまざまな細胞種が混在した細胞集団であり、細胞凝集塊を形成させることで、分化した細胞が未熟な細胞に戻るのか、あるいは、もともと未熟な細胞が細胞凝集塊を形成することで、濃縮し増殖するののかについては不明であった。そこで本研究では、マウス由来の線維芽細胞からクローンを作成し、均一化した細胞を用いることで、それぞれのクローンが未分化性や毛包誘導能を有するか否かを検討した。われわれはこれまでの研究から、線維芽細胞が凝集塊を形成すると、本来毛包再生能を有していない細胞が毛包誘導能を獲得し、未分化性を獲得する現象

を観察している。しかし、この現象がさまざまな細胞集団が混在した線維芽細胞が、凝集塊を形成することで未分化な細胞集団が生き残って分裂することで未分化な細胞集団となるのか (エリート仮説) あるいは凝集塊を形成することで分化した細胞が未分化な細胞に脱分化するのか (脱分化仮説) については証明できていない。Muse 細胞は前者のエリート仮説の立場を取るが、われわれはこれまで行ってきた研究から、細胞凝集塊による未分化性の獲得には、後者の脱分化仮説が少なくともある程度寄与しているという証拠を得ている。これは、1) 2 次元接着培養で発現される SMA などの分化マーカーが凝集塊を形成すると消失する、2) CD133, Sox-2 などの未分化細胞で発現して因子が、細胞凝集塊を形成すると著しく上昇する、3) 細胞凝集塊を形成すると細胞はほとんど分裂しなくなる、などである。本研究は、これまでわれわれが行ってきた、細胞凝集塊の形成により未分化性を保持する現象が、エリート仮説によるものなのか、脱分化仮説によるものなのかを検証する位置づけであった。細胞生物学の根幹を担う可能性のある研究であるが、われわれが開発した独自のモデルを用いている点で斬新であり、独創的な研究であったと思われる。

3. 研究の方法

C57bl 由来のマウス皮膚線維芽細胞を培養しその後、酵素処理により細胞凝集塊を単一の細胞にまで分離したのち、単一の細胞を分離した後に、二次元接着培養を行いクローンを増殖させた。十分に細胞を増殖させた後に、非接着培養皿で培養し、細胞凝集塊を形成させた。各クローンの 2 次元培養の細胞と、細胞凝集塊を形成した後の細胞を、未分化細胞で発現しているタンパク、RNA の発現の変化や局在を観察した。その後、各々のクローンから作成した細胞凝集塊を用いて毛包誘導能を獲得するか否かを観察を行った。また、Oct-4 GFP マウスを用いて同様の実験を行った。生後 6 週令のオスの C57bl/6J マウスの背部の真皮を採取し、真皮間葉系細胞を 10%FBS 含有の DMEM 培地で接着培養を行い、10 継代目の細胞をトリプシン処理により細胞を浮遊させ、単一の細胞を単離し、培養を開始した。その中からクローンを形成する細胞 10 種類を無作為に選択し、2 次元接着培養を継続し、細胞を増殖させる。十分に増殖させた細胞を用いて、EGF, bFGF, B27 を添加した DMEM/F12 混合培地を用いて、寒天でコーティングしたディッシュの上に細胞を播種し、細胞凝集塊を形成させた。培養開始後 3 週で細胞を回収し、4%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定し、一部は whole mount で免疫染色を行い、一部はパラフィン包埋し、4 μm の切片を作成し、ともにこれまで未分化マーカーとして報告されているさまざまな因子につき免疫染色を行った。具

体的には、胚性幹細胞で発現している、SSEA-1,Oct-3,SOX2,STAT3,Nanog,Klf4,c-Myc, 神経幹細胞で発現している Notch1,2,3,CD133,CXCR4,p75,Nestin,間葉系幹細胞で発現している CXCR4,CD133,CD105,CD73,CD90 などにつき、免疫多重染色を行った。その後、コンフォーカルマイクロスコープで、細胞凝集塊の中で各タンパクの発現部位の差異について検討した。またこれらの因子につき、real time RTPCR を用いて、凝集塊総量の遺伝子発現の変化について定量的に観察した。同様に細胞凝集塊を形成させたのちに、トリプシン処理により単一の細胞に再び分解し、免疫染色で同様の因子について発現している細胞が存在するか否かを確認した。さらに、それぞれのクローンから作成した細胞凝集塊と新生仔マウス表皮細胞とを免疫不全マウス背部皮膚全層欠損創に混合移植し、毛包誘導能の有無について検討した。体細胞の中に、muse 細胞と呼ばれる特殊な未分化な細胞が存在することが報告されており、ES 細胞で発現される SSEA-1 を発現している細胞とされている。iPS 細胞は、メチル化の関係からすべての線維芽細胞を山中 4 因子で iPS 細胞に変化させることはできないとされており、muse 細胞は山中 4 因子の遺伝子導入で効率に iPS に変わりうるとされている。非常に未分化な細胞で発現している Oct-4 が発現したときにのみ GFP を発色する Oct 4-GFP マウスの皮膚を、コラゲナーゼを用いて単一の細胞に分解した。その後 Oct-4 を発現している細胞を回収し、同様にクローンを作成を試みた。また、これらを発現していない細胞からも同様にクローンを作成を試みた。各々の細胞を増殖させた後に、非接着培養皿を用いて、同様に細胞凝集塊を形成させる計画をした。Oct-4 GFP マウスは、胚性幹細胞でのみ発現しているとされる Oct-4 が発現した時のみ GFP が発現するようにデザインされているため、非常に未分化な細胞とそうではない細胞を、遺伝子レベルで分離することが可能であり、Oct-4 GFP マウスで、Oct-4 を発現していない細胞から、Oct-4 を発現する細胞が得られれば、培養方法のみで、iPS と同等の細胞に脱分化をさせることが可能と考えられた。

4. 研究成果

(1) C57bl/6j マウス皮膚由来線維芽細胞を用いた検討

マウス線維芽細胞凝集塊形成により、SSEA-1,Oct-3,4,SOX2,STAT3,Nanog,Klf4,c-Myc,Notch1,2,3,CD133,CXCR4,p75,Nestin,CXCR4,CD133,CD105,CD73,CD90 の中で、免疫組織学的に発現が増強していたのは、Oct-4,SOX2,Nanog,Klf4,c-Myc,CD133,CXCR4 であった。しかしこれらは、作成したクローンの中でバラツキがあり、同一のクローンから作成したものの中でも、継代を加える

と、発現に差が生じた。興味深いことにクローン間で、形成された細胞凝集塊の大きさに差異が生じ、細胞凝集塊の大きさの違いにより未分化性が制御されている可能性も考えられた。これらのことから、たとえ単一の細胞から分裂した線維芽細胞であっても、細胞塊を形成する段階で、周囲環境の違いにより、さまざまな未分化マーカーの発現の差異を生じることが判明した。細胞培養の条件によって、未分化マーカーの発現に差異を生じるため、これらの変化にはエピジェネティックな変化が寄与する可能性も考えられた。これらのことから、未分化性の高い細胞が、継代を行い、細胞を増殖させても、すべての細胞でその性質が維持されるわけではないことが示された。また、単純にエリート仮説と脱分化仮説に二極化される問題ではなく、単一の細胞を継代を重ねる段階で、未分化な細胞と分化した細胞というように二分されず、未分化性を有する者から、分化した状態を示すもの間で、いくつかの群のようなものが存在する可能性が示唆された。

(2) Oct-4GFP マウス皮膚由来の線維芽細胞を用いた検討

非常に未分化な細胞で発現している Oct-4 が発現したときにのみ GFP を発色する Oct4-GFP マウスの皮膚の中に、GFP 陽性の細胞の有無を検討したが、皮膚に関しては、胎生 13 日以降、成獣の皮膚の中には、GFP 陽性の細胞は存在しなかった。そこで、新生仔 Oct4-GFP マウスの皮膚を細切し、explant 法で真皮線維芽細胞を培養し、2次元培養後に同様にクローンを作成した。2次元培養後の線維芽細胞も蛍光顕微鏡による観察ではすべて GFP 陰性であった。その後非接着培養皿を用いて、同様に細胞凝集塊を形成させた。細胞凝集塊形成後、最長で3ヶ月間の観察を行ったが、いずれのクローンからも GFP 陽性の細胞の出現は観察されなかった。また、細胞をクローンとせず、初代培養後にすぐに細胞凝集塊の形成を行っても、GFP 陽性の細胞を観察することはできなかった。これらの結果から、細胞凝集塊の形成により、未分化マーカーとされているもののうち一部は陽性になるが、非常に未分化な状態で発現している Oct4 は、遺伝子改変マウスの観察では、発現が認められず、細胞凝集塊を形成しても、ES や iPS に相当する細胞を獲得することは困難であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔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）

〔その他〕

なし。

6．研究組織

(1)研究代表者

貴志 和生（Kishi Kazuo）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40224919

(2)研究分担者

荒牧 典子（Aramaki Noriko）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80365311

林 瑠加（Hayashi Ruka）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50445392

(3)連携研究者

なし。