

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：35409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640139

研究課題名(和文) 哺乳類ひげ毛根細胞の凍結保存・iPS細胞化・生殖細胞分化・体外受精

研究課題名(英文) Culture and Freeze-Stock of Normal Cells from Hair Roots of Mammals

研究代表者

山口 泰典 (YAMAGUCHI, Yasunori)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：60191243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物から非侵襲的または極低侵襲的に培養細胞を入手し、凍結保存できることを示すことが目的である。結果、極低侵襲的に抜去した毛根(まゆ毛、ひげ、体毛)に由来する細胞を、採取した6種類の哺乳動物(ヒト：成人男女のボランティア7人、マウス、アカネズミ、シリアンハムスター、ジャンガリアンハムスター、ハリネズミ)の全ての場合において、正常細胞の培養と凍結保存に成功した。得られた培養細胞の形態は、繊維芽細胞様、上皮細胞様、間葉細胞様、神経芽細胞様など多様であった。つぎに、ヒト及びハリネズミ由来の細胞に初期化を誘導するエピソーマルベクターを導入したところ、アルカリフォスファターゼ陽性の細胞集団が得られた。

研究成果の概要(英文)：Using the eyebrow hair roots that could be easily removed by 7 adult volunteers themselves under informed consent, fibroblast-like normal cells were obtained with regardless of age or gender. By the same method, normal cells of other 5 species were cultured and stocked. To obtain normal cells as bio-resource from whisker or body hair of other mammals, we examined mouse, djungarian hamster and Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*), syrian hamster and four toed hedgehog as model animals, then most of cultured cells were fibroblastic shape, but some morphological variation were observed. We also clarified the most suitable condition to obtain normal cells of these mammals. We cultured and freeze-stocked normal cells by a simple and minimally invasive way from the hair root of 6 species of mammals. These stocked normal cells will be deposited to the cell bank as valuable bio-resources.

研究分野：動物細胞工学

キーワード：毛根 哺乳動物 細胞培養 凍結保存 初期化 エピソーマルベクター 分化誘導 ノアの箱舟

## 1. 研究開始当初の背景

動物の培養正常細胞は多様な研究の材料として有用であるが、近年 iPS 細胞の作製技術が確立されるに至り、バイオリソースとしての重要性が増している。特に、種々の遺伝的背景を有する培養正常細胞のライブラリーは、難病の原因解明や治療法の開発に貢献するものと期待されている。これらの培養正常細胞は、主に侵襲的に得られた皮膚組織を材料とすることが多い。しかし、この方法は多少とも苦痛が伴うので、ヒトが対象である場合はボランティアの確保と事前の十分なインフォームドコンセントの実施が容易ではない。実験動物についても、動物福祉の観点から苦痛を伴う侵襲的な組織採取は極力避けるべきである。毛は成長と脱落をくり返すが、毛包中には幹細胞を含む種々の細胞が存在しており、毛包を皮膚組織とともに採取して培養することによって、色々な特性を持った培養細胞が得られ、その中には分化多能性を有して神経細胞などに分化できるものがあることが知られている。毛包由来細胞の採取も、当初は毛包を含む皮膚を侵襲的に採取して培養する方法が行われたが、後に極めて低侵襲的な手技で得られる抜去毛を用いてもケラチノサイトを主とする正常培養細胞が得られることが示された。この場合、ヒト後頭部の毛髪を抜去して Dispase で処理後に、ケラチノサイト用の無血清培地で培養する方法が用いられている。そこで我々は、老若男女誰でもが自分自身で抜去しやすいまゆ毛を対象として、培養正常細胞を得ることを試みた。また、ケラチノサイトではなく、培養正常細胞の中で最も培養しやすく、iPS 細胞培養の際の支持細胞層としても頻用される繊維芽細胞の培養を目指した。

さらに、上記の成果を生かして、哺乳動物のひげや体毛を材料として培養正常細胞を得ることを着想した。現在、日本だけでも 80 種以上の哺乳動物がレッドリストに記載されているという危機的な状態にある。種々の保全対策が必要であるが、万一絶滅してしまった場合のことも考えておく必要がある。そこで、それらの動物の正常細胞を凍結保存しておくという戦略が考えられる。しかし、絶滅が危惧される希少哺乳動物については、皮膚や血液を侵襲的に採取することは現実的ではないので、容易に採取可能なひげや体毛を採取し、毛根由来の培養正常細胞を凍結保存しておく。将来その動物が絶滅した場合には、凍結保存してあった正常細胞を解凍して培養後に初期化し、「未来の最先端技術」で生殖細胞に分化させ、体外受精及び近縁動物種の子宮への移植を経て、絶滅した哺乳動物を復活させるという提案である。万一の絶滅を想定して、受精卵を凍結保存しておくこと

は有効な方法であるが、絶滅危惧動物から受精卵を採取することは困難である。また、仮に受精卵を凍結保存できても、少数の個体から得た受精卵では、遺伝的多様性の確保が不十分であると想定されるので、未来の絶滅動物復活プロジェクトに寄与するには心許ない。ひげや体毛であれば同じ動物種であっても遺伝的背景が多様な多数の個体から正常細胞を容易に確保できる。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、まゆ毛を用いて、毛根由来細胞の培養条件の最適化を種々検討した上で、野生哺乳動物のモデルとしてアカネズミを用い、そのひげと体毛を材料にして細胞培養を試み、培養条件の最適化を探索した。アカネズミは、日本の固有種であるが、北海道から九州まで分布しており、福山大学敷地内やその周辺でも実習や研究用に比較的容易に採取されているので、ひげや体毛を採取するには好適な野生動物である。これらの研究の成果を、畜養動物のモデルとして、マウス、ジャンガリアンハムスター、シリアンハムスター、ユツクビハリネズミにも適応することとした。また、得られた正常培養細胞は凍結保存するとともに、エピソーマルベクターを導入することで、初期化することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1)毛の抜去 60%イソプロパノールを含んだ脱脂綿で、抜去する部分の毛を逆立てるように消毒する。クリーンベンチ内で、滅菌した毛抜きを用いて抜去し、標準の 5 倍濃度の抗生物質-抗真菌剤混合溶液と FBS10%を含む HBSS に投入する。この際、長い毛は滅菌したハサミで 5mm 程度に切断する。予め FBS20%添加 DMEM 培養液を 1 ウエル当たり 150  $\mu$ L ずつ分注してある滅菌済みコラーゲンタイプ コート 12 ウエルプレートへ、毛根部分が底面につくように滅菌したピンセットで移す。この上から、滅菌した 18mm 丸形スライドガラスを被せる。

(2)細胞培養 2日ごとに、各ウエルの古い培養液を除去し、新鮮な FBS20%添加 DMEM 培養液又は DEF-CS などの培養液を 150  $\mu$ L ずつ添加する操作を繰り返す。適宜、顕微鏡観察して毛根部分から細胞の増殖・遊出が認められたら、培養液を 150  $\mu$ L ずつ毎日添加する。ウエル中の培養液の量が 1mL 程度になったら、2日ごとに、古い培養液を半量除去し、同量の新鮮な培養液を加える。細胞がウエル底面の 1/2 以上まで増殖したら、剥離して滅菌済みコラーゲンタイプ 1 コートシャーレ (60mm) へ移す。細胞の剥離は、以下の手順で行う。細胞が十分増殖したシャーレ又はウエ

ルの培養液を除き、0.02%EDTA 含有 DPBS - でリンスする。TrypLE 溶液を加えて 37、3 分間、80rpm で振盪後、ピペティングして剥離した細胞を遠心管へ移してから遠心分離で細胞を回収し、沈殿した細胞を新しい培養液と混和してシャーレ又はウエルに播種する。

(3)凍結保存 細胞がコンフルエントになる直前のシャーレを選んで細胞を剥離後、遠心分離して細胞を回収する。2~5×10<sup>5</sup>個/mL になるように凍結保護液に懸濁し、凍結保存チューブに 1mL ずつ分注する。これを、-80 フリーザー中の発泡スチロール容器に移して徐冷凍結したのち、液体窒素中の冷凍保存コンテナへ入れる。

(4)初期化 5×10<sup>5</sup> 個の細胞をエピソーマルベクターを含む反応液 107.5 μL に懸濁し、Nucleofector プログラム U-023 で電圧ポレーション後、FBS20%添加 DMEM 培養液で培養する。その後、DEF-CS 培地を 2 日ごとに交換して培養する。コロニーが形成されたら、アルカリフォスファターゼ生細胞染色を行い、陽性細胞集団を検出する。

#### 4. 研究成果

(1)まゆ毛由来正常細胞の作製 インフォームドコンセントされたボランティア 7 人からまゆげ毛根由来細胞 (MUG 細胞) が得られた (図 1)。12 ウエルプレートで培養したまゆ毛から、細胞が増殖・遊出する割合は、1/12(8.3%) ~ 11/22(50.0%) であり、平均の遊出率は 26.2% であった。また、適切な培養条件を種々検討して OPTIPRO SFM と WME 又は ASF104N を等量混合した場合が、MUG 細胞の無血清培養に最も適していることが明らかとなった。

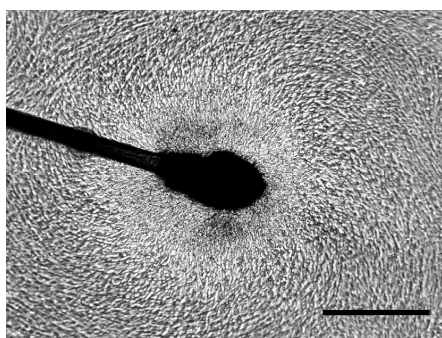


図 1 まゆ毛から増殖した細胞 (スケールバーは、500 μm)

(2)野生及び畜養哺乳動物の毛根由来正常細胞の作製 ヒトの場合と同様の方法を適用し、野生動物のモデルとしてアカネズミ (図 2)、畜養動物のモデルとしてマウス、ジ

ャンガリアンハムスター、シリアンハムスター、ヨツユビハリネズミのひげ及び体毛由来の正常細胞を得た。培養条件については、無血清培養液である DEF-CS 培養液を用いて 5% O<sub>2</sub> の環境で培養する場合が最も良く、約 10% の毛根から正常培養細胞の増殖・遊出が認められた。

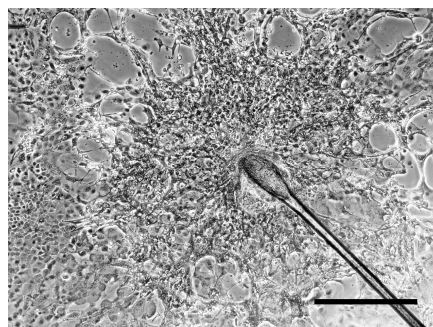


図 2 アカネズミのひげから増殖した細胞 (スケールバーは、500 μm)

(3)MUG 細胞の特性 MUG/1 細胞 (59 歳男性由来) 及び MUG/5 細胞 (21 歳男性由来) をコラーゲンコートシャーレに 5 × 10<sup>4</sup> 個播種し、コンフルエント状態に増殖したら剥離して希釈し、改めて 5 × 10<sup>4</sup> 個で播種するという継代培養を繰り返した。継代ごとに、集団倍加時間 Td を算出した結果を図 3 に示す。継代数 8 までは MUG/1 細胞と MUG/5 細胞で Td 値にほとんど差は見られない。しかし、継代数 9 になると、MUG/1 細胞の Td 値が急激に大きくなって増殖が悪くなり、これ以上の継代培養ができなくなった。一方、MUG/5 細胞では継代数 10 でも、徐々に Td 値が増加しているのみである。

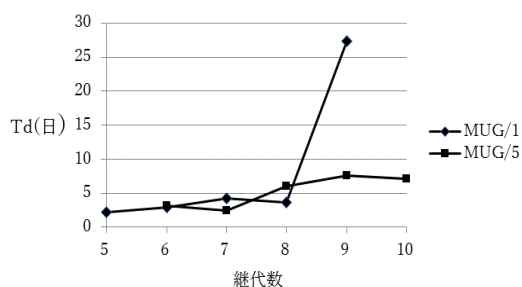


図 3 MUG 細胞の継代数と集団倍化時間

この結果から、MUG 細胞は有限増殖性を示す正常細胞であり、細胞増殖の限界は、由来するボランティアの年齢に依存することが示唆された。

(4)初期化 MUG 細胞細胞に、iPS 細胞作製のエピソーマルベクターを Nucreofector を用いた電圧ポレーション法で導入したところ、既知の iPS 細胞の形態に類似し

たアルカリフォスファターゼ陽性の細胞集団が得られた。また、ヨツユビハリネズミ毛根由来細胞に同じエピソーマルベクターを同様に導入したところ、小型のドーム状でアルカリフォスファターゼ陽性の細胞集団が得られた。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Jun J. Sato, Yurina Tasaka, Ryoya Tasaka, Kentaro Gunji, Yuya Yamamoto, Yasushi Takada, Yasushi Uematsu, Eiichi Sakai, Takashi Tateishi and Yasunori Yamaguchi, Effects of Isolation by Continental Islands in the Seto Inland Sea, Japan, on Genetic Diversity of the Large Japanese Field Mouse, *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae), Inferred from the mitochondrial D-loop Region, *Zoological Science*, 査読有, Vol.34, No.2, 2017, pp.112-121  
Yasunori Yamaguchi, Naoyuki Koshi, and Chiaki Tage, Culture of hair Root-derived normal cells from human and Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*, *Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol.*, Fukuyama Univ. 査読無 Vol.14, 2015, pp.1-12

〔学会発表〕(計4件)

壺内 優里、山口 泰典、動物細胞培養用接着基質の評価、日本動物学会中四国支部広島県例会、2017年3月9日、広島大学(広島県・東広島市)

山口 泰典、古志 直之、田下 智亜紀、壺内 優里、毛根由来正常細胞の凍結保存、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Culture of Normal Cells from Hair Root of Human, Mouse, Djungarian Hamster and Japanese Field Mouse, *Apodemus speciosus*. Yasunori Yamaguchi, Naoyuki Koshi, Chiaki Tage and Yuri Tsubouchi, The 29<sup>th</sup> Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 2016年11月9日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

山口 泰典、古志 直之、田下 智亜紀、毛根由来正常細胞の培養～現代版ノアの箱舟を目指して～、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月3日、神戸

ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔産業財産権〕  
出願状況(計2件)

名称:細胞培養基材およびそれを用いた細胞培養方法、細胞培養器、並びに機材としての使用

発明者:山口 泰典、安藤 晴菜、飯田 慎  
権利者:三菱瓦斯株式会社

種類:特許

番号:PCT/JP2016/078125

出願年月日:2016年9月23日

国内外の別:国外

名称:細胞培養基材およびそれを用いた細胞培養方法、細胞培養器、並びに機材としての使用

発明者:山口 泰典、安藤 晴菜、飯田 慎  
権利者:三菱瓦斯株式会社

種類:特許

番号:PCT/JP2016/078126

出願年月日:2016年9月23日

国内外の別:国外

〔その他〕

ホームページ等

現代版・ノアの箱舟プラン 山口 泰典  
<http://www.fukuyama-u.ac.jp/biological-eng/facultyMember/yamaguchi-yasunori.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 泰典(YAMAGUCHI, Yasunori)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号:60191243