

杉本浩司 論文内容の要旨

主 論 文

Effects of Hypoxia on Pluripotency in Murine iPS Cells

(マウス iPS 細胞の多能性に対する低酸素の効果)

杉本浩司、吉澤祐、山田志津香、井川一成、林善彦、石崎秀隆

Microscopy Research and Technique in press, 2013

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：林 善彦教授)

緒 言

近年、再生医療を目的とし、4 遺伝子 (Sox2, c-Myc ,Oct3/4, Klf4) を導入した iPS 細胞の樹立された。現在、癌遺伝子である c-Myc を除く Oct3/4, Klf4, Sox2 の 3 遺伝子の導入で iPS 細胞の樹立も成功している。また、低酸素培養による iPS 細胞樹立の効率化の改善も報告されている。そこで、本研究では 4 遺伝子と 3 遺伝子導入マウス iPS 細胞を用いた低酸素培養下での、細胞増殖・分化動態、骨芽細胞誘導時への影響、HIFs(hypoxia inducible factors)の働きを検討した。

対象と方法

実験には理研 CELL BANK より購入した 4 遺伝子導入マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17)と 3 遺伝子導入マウス iPS 細胞(iPS-MEF-Ng-178B-5)を用いた。

MEF を播種した 100mmDish 上に iPS 細胞を播種し、維持培地で培養し、継代後 5% および 20%O₂ の条件下で 7 日間培養した。培養 3、5、7 日目に形態学的観察に加え、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。また、未分化マーカーとして Nanog、Sox2、Oct4 の mRNA 発現量の比較を行った。

また、3 遺伝子、4 遺伝子導入マウスを、5%および 20%O₂ の条件下で骨分化誘導培地および維持培地で 14 日間培養した。3、7、14 日目に、それぞれ Alizarin red S 染色を行った。また、培養 5、7、14 日目で Runx2、Osteocalcin の mRNA 発現量

についても比較した。

siRNA をトランスフェクションした 3 遺伝子導入マウス iPS 細胞を 5%O₂ 下で 2 日間培養し、HIF1 α 、HIF2 α 、HIF3 α をノックダウンした。siRNA 導入 48 時間後に細胞を回収し、HIF1 α 、HIF2 α 、HIF3 α をノックダウンした場合の Nanog、Sox2、Oct4 の mRNA 発現量ならびにタンパク発現量を比較した。

結 果

3、4 遺伝子導入 iPS 細胞を 5% および 20% O₂ の条件下で 7 日間培養行ったところ、20% O₂ 下では培養 7 日目にコロニー辺縁から細胞質の大きな分化の進んだ細胞が見られるようになった。一方で、5% O₂ 下のコロニーは、類円形を保ち、辺縁がスムーズな未分化な正常コロニーの特徴を有していた。4 遺伝子と 3 因子導入マウス iPS 細胞どちらにおいても、5% O₂ 下では 20% O₂ 下より細胞増殖が有意に速いことがわかった。

3、4 遺伝子導入マウス iPS 細胞での未分化マーカーの発現は、5% O₂ と 20% O₂ 下において、7 日目では 5% O₂ 下の方で mRNA 発現量が高く、より未分化状態を維持している細胞が多いことが分かった。

骨芽細胞分化誘導において、3 遺伝子、4 遺伝子導入マウス iPS 細胞ともに 20% O₂ 下で培養した実験群は、培養 14 日目で Alizarin red S により染色された。5% O₂ 下で培養した実験群では Alizarin red S による染色は見られなかった。Osteocalcin、Runx2 の発現は、5% O₂ 下で培養したものは 20% O₂ 下に比べ、抑制されていた。siRNA を導入し、HIF1 α 、HIF 3 α をダウンしたものは、対照群と同様に iPS 細胞様のコロニーを形成した。しかし、HIF2 α をノックダウンしたものでは、コロニーは形成するもののコロニーサイズが明らかに減少していた。

HIF1 α をノックダウンしたものでは、未分化マーカーである Nanog、Sox2、Oct4 の mRNA、タンパク質発現量は対照群と有意差は認めなかった。一方で、HIF2 α をノックダウンしたものでは、対照群と比較して、Nanog、Sox2、Oct4 の発現量は有意に減少していた。また、HIF3 α をノックダウンしたのも、対照群と比較して、Nanog、Sox2、Oct4 の発現量は有意に減少していた。

考 察

4 遺伝子と 3 遺伝子導入マウス iPS 細胞を比較して、低酸素条件下での培養で増殖・分化に有意差はないことが明らかとなった。骨芽細胞分化誘導時においても、4 遺伝子と 3 遺伝子導入での差はないことがわかった。これらのことから、3 遺伝子導入の有用性が明らかとなった。HIFs(hypoxia inducible factors)の働きについては、低酸素下でのコロニー形成に関しては、HIF2 α の関与を証明できた。未分化マーカーの発現に関しては、HIF2 α 、HIF3 α の働きが示唆され、特に HIF2 α によって iPS 細胞の多能性が調節されていると考えられる。