

電気穿孔法による細胞初期化過程の細胞周期依存性の解明

産業機械工学科 03-100254 林 由花子

iPS細胞とは、4つの遺伝子；山中因子を導入することで体細胞を初期化して得られる、分化万能性を再獲得した細胞のことである。iPS細胞の作製方法にはさまざまな手法が存在する。最も簡便な方法の一つが、エピソーマルプラスミドといわれる、染色体とは独立に存在可能なゲノムDNAを遺伝子を担体に、エレクトロポレーション（電気穿孔法）で細胞内導入する手法である。iPS細胞はその作製効率の低さが実用化への妨げの一つとなっているが、この効率の低さの原因として細胞ごとの遺伝子発現のや細胞周期に依存する細胞内部状態のばらつきが指摘されている。特に細胞周期S期のDNAは他の細胞周期とは異なり凝縮が解かれた状態にあるため、山中因子による初期化との深い関連が示唆される。

したがって本研究では、細胞周期可視化プローブFucciを用いて細胞周期を可視化した細胞に対して、オリフィスシートを用いた電界集中型エレクトロポレーションで山中因子導入を行い、その細胞をタイムラプス観察することによって、山中因子が細胞周期にどんな影響を与えるのか明らかにすることを目的においた。

当研究室で開発された電界集中型エレクトロポレーション法は従来型エレクトロポレーション法と比較し、細胞が接着状態のまま物質導入が出来るので細胞観察・同定が容易に出来る点、細胞核への直接導入が可能なので導入から数十分程度でプラスミドが発現する点が本研究にの使用目的により適している。したがって、本研究ではこれを物質導入の手段として用いた。

山中因子の導入実験においては、山中因子の導入成否の確認をとるために山中因子とGFPプラスミドを混合し、HeLa/Fucci細胞に導入した。こうして得られたGFP蛍光発現細胞をタイムラプス観察した結果(図2)、周期が停止している細胞が多く見られた(図3-a)。この周期停止細胞の周期内訳を調べたところ、S期-G2期-M期が多かった(図3-b)。このような細胞の数は山中因子を導入していない細胞に比べて有意に多いという結果であった。

次に、山中因子の導入成否状況の確認をとるため、山中/GFPプラスミド導入細胞に対してOct3/4の抗体染色を行った。約70%の細胞でGFP発現とOct3/4発現が一致しているという結果が得られた(図4-a, b)。

これらの実験結果より、S期-G2期-M期での細胞周期停止は山中因子の導入・発現により誘発されたものであるらしいと分かった。

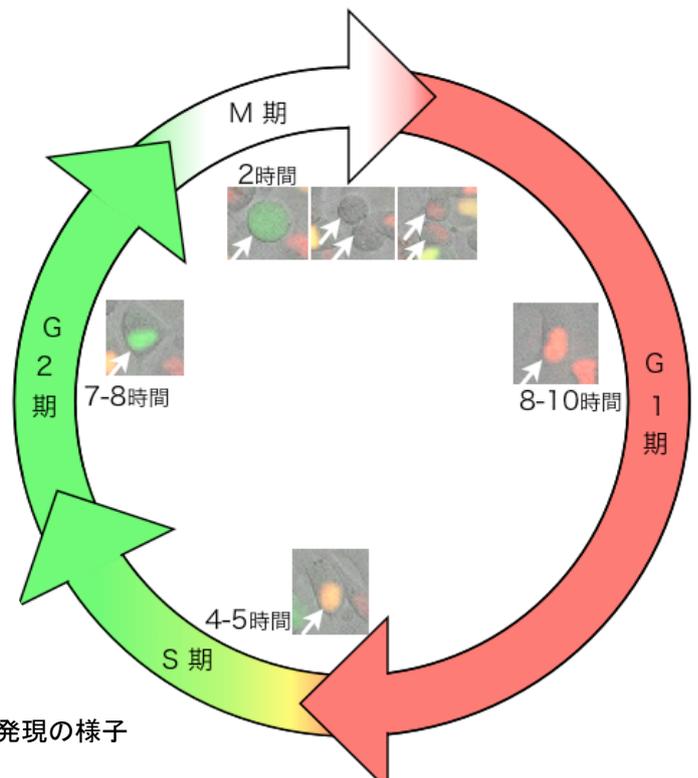


図1 Fucciの発現の様子

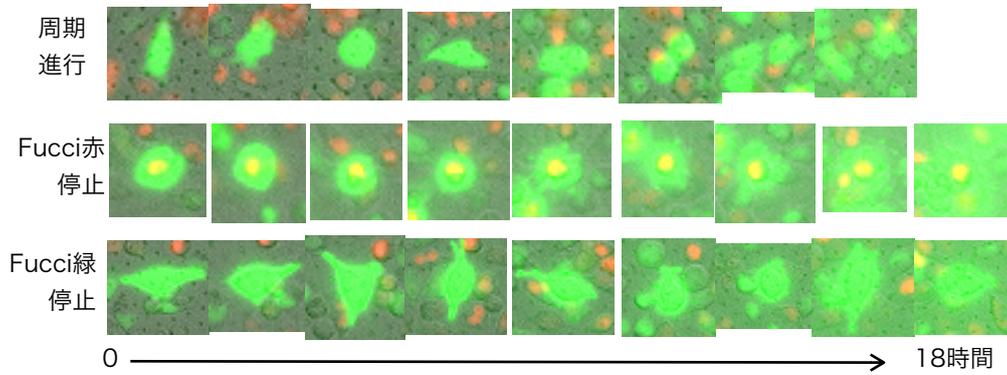


図2 山中+GFPプラスミド導入細胞の細胞周期観察結果

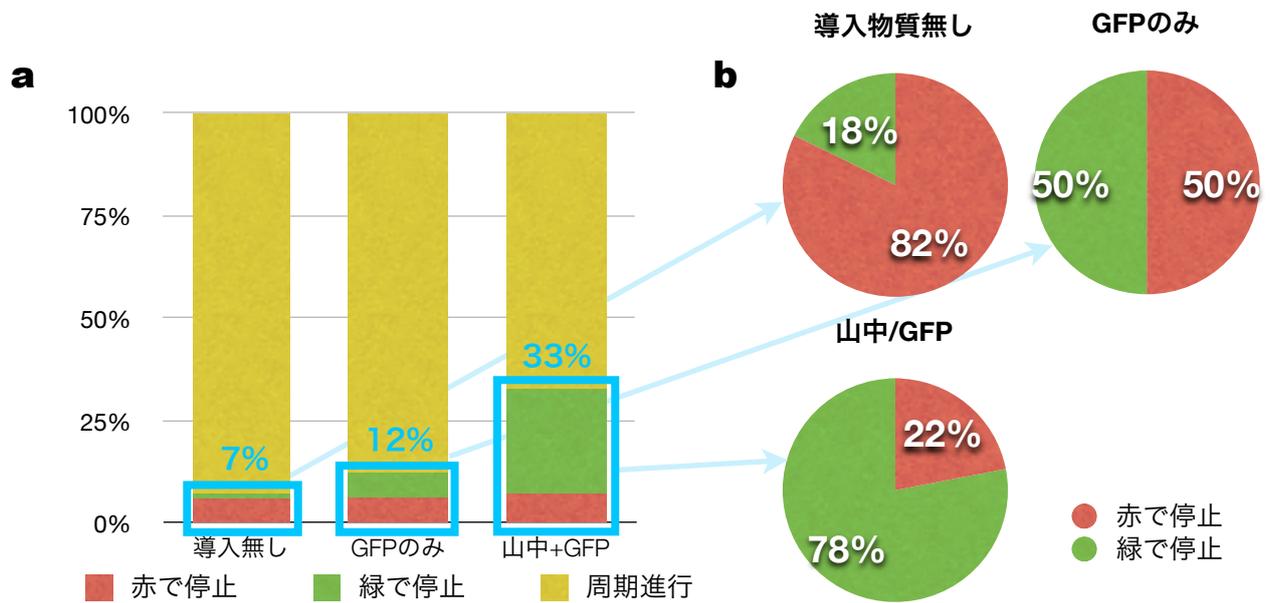


図3 山中+GFPプラスミド導入細胞での周期停止細胞の割合
a: 物質導入後の周期停止細胞の割合, b: 周期停止細胞の周期割合内訳

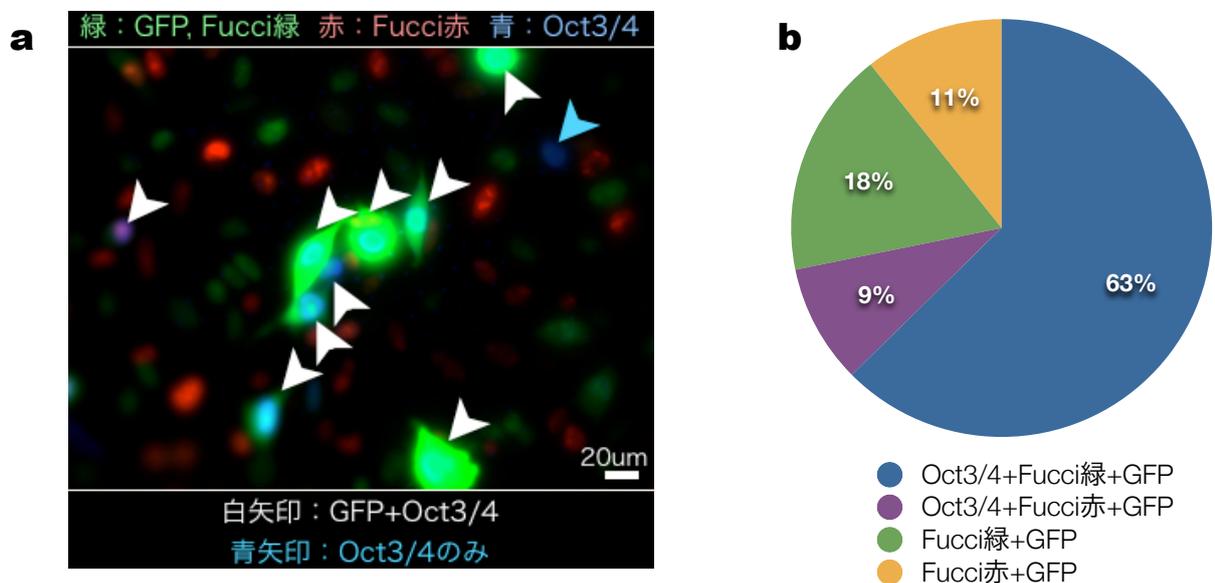


図4 細胞染色時のFucci・GFP・Oct3/4の発現状態
a: HeLa/Fucci細胞に山中/GFPプラスミドを導入後Oct3/4を染色した結果
b: GFP発現細胞の染色時のFucci 蛍光とOct3/4有無