

平成 24 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目： 若手共同

研究課題名： 血小板生産の高効率化を目指した造血幹細胞の巨核球分化誘導メカニズムの理解
ラボ長

所属：物質創成専攻 化学工学領域

氏名：尾島 由紘

研究成果（800 字程度．図表可）：

本研究は、工学的な手法を得意とする研究者と、細胞生物学的な手法を得意とする研究者が学際的研究組織を形成し多方面から多角的に解析することで、造血幹細胞から巨核球へ人為的に分化を誘導するのに必要な条件を明らかにすることを目的とする．特に、分化の際に見られる個々の細胞挙動の違い（ヘテロ性）に注目し、分化に真に重要な変化を明らかにすることを目指す．

平成 24 年度は、以下の項目に関して研究を行った．

1) 巨核球の分化誘導効率において各操作変数が与える影響の定量解析

ヒト造血幹細胞のモデル細胞株である K562 細胞は、生理活性物質である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を培地中へと添加することで、巨核球へと分化させることができる．巨核球分化では、本来浮遊系の細胞である K562 が培養面へと付着・伸展し、核内分裂が生じることで核と細胞質の巨大化が進行することがこれまでに報告されている．

本研究における検討により、K562 細胞の PMA 分化において酸化ストレス応答の増加が重要であることを遺伝子発現レベルで明らかにした．そこで操作変数として、酸化ストレス因子である過酸化水素を添加したところ、図 1 に示すように巨核球分化の指標である高倍数性細胞の割合の増加が引き起こされた．以上の研究成果は、新規性の高い内容として学会発表ならびに学術論文への投稿を行った．さらに、得られた成果の展開を図るため、実際の造血幹細胞を用いた実験を現在進行中である．

一方で、外因性の酸化ストレスである過酸化水素の添加以外にも、K562 細胞に近紫外光を照射することで巨核化が進行することを発見した．この際に巨核化が進行する原因として、近紫外光の照射により内在性の酸化ストレスが誘因されることを明らかにした．この研究成果に関しても、3 月に学会発表する予定である．

一方、外因性の酸化ストレスである過酸化水素の添加以外にも、K562 細胞に近紫外光を照射することで巨核化が進行することを発見した．この際に巨核化が進行する原因として、近紫外光の照射により内在性の酸化ストレスが誘因されることを明らかにした．この研究成果に関しても、3 月に学会発表する予定である．

2) 長期間のライブセルイメージング法の確立

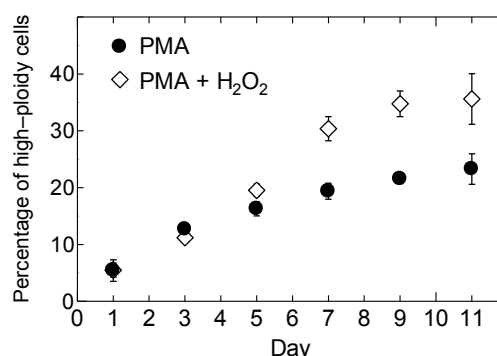


図 1 酸化ストレスが巨核球分化の進行に及ぼす影響

巨核球分化過程における個々の細胞の挙動を調べるためには、分化の全過程(約10日間)を通してライブセルイメージングを行うための手法の確立が必須である。そこで、K562 細胞に対して PMA を添加した後、ヘキスト 33342 を用いて細胞核を染色し、様々な実験条件下で観察を行った。その結果、ミネラルオイルの重層添加による培養液の蒸発防止と、HEPES の添加による pH 変動の抑制とを併用することにより、細胞死を誘導することなく長期間の蛍光ライブセルイメージングが可能であることを明らかにした。この方法を用いてこれまでに、巨核化に先立って K562 細胞の培養面への接着が見られること、巨核化は細胞分裂の失敗に起因すること、巨核化した細胞は培養面から浮遊することが分かった。これらの結果から、一過的な培養面への細胞接着が K562 細胞の巨核球分化において重要である可能性が示唆された。本成果に関しても学会発表を行った。来年度は、造血幹細胞を用いた長期間のライブセルイメージングへと展開していく予定である。

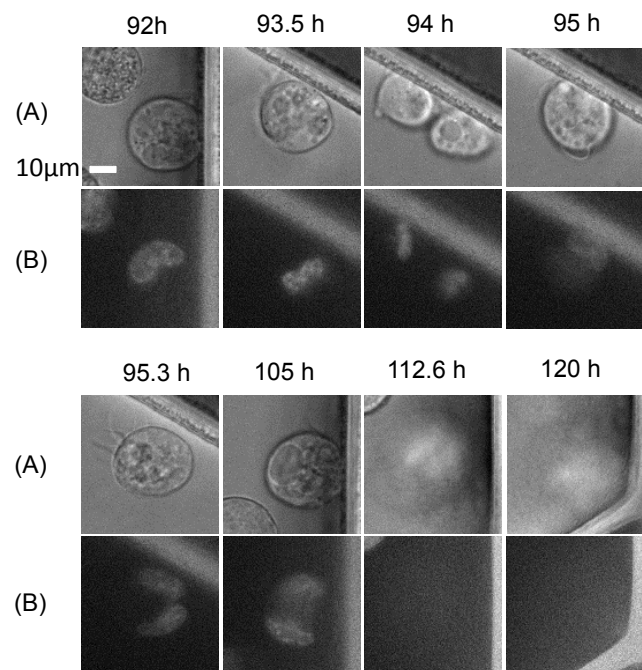


図 2 分化誘導処理した K562 細胞の長時間ライブセルイメージング。(A)は位相差像、(B)はヘキスト 33342 による細胞核の染色像。数字は PMA 添加からの経過時間を示す。

キーワード：造血幹細胞，巨核球分化，細胞挙動，個別細胞評価，血小板生産

研究経費（H24 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
926,100 円	1,055,890 円	18,010 円	0 円	0 円	2,000,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

小林 昇平・(独) 情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・主任研究員

袴田 和巳・大阪大学大学院基礎工学研究科・助教

Mark T. Duncan・アメリカ，ノースウエスタン大学化学生物工学研究科

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

平成 24 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

Retno W. Nurhayati・大阪大学大学院基礎工学研究科・博士後期課程・D1

野村 直希・大阪大学大学院基礎工学部・学部学生・B4

発表論文等（平成 24 年 3 月 31 日現在）

〔雑誌論文〕

Yoshihiro Ojima, Mark T. Duncan, Retno W. Nurhayati, Masahito Taya, William M. Miller:
Synergistic effect of hydrogen peroxide on polyploidization during the megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells. *Submitted* (Under revision)

〔著書〕

なし

〔学会発表〕

1. 尾島由紘, 小林昇平, Nurhayati Retno, 原口徳子, 田谷正仁「K562 細胞の巨核球系分化における培養面への一過性接着の重要性」 日本生物工学会平成 24 年度大会, 3Bp20, 神戸, 2012 年 10 月 (口頭発表)
2. Retno Nurhayati, Yoshihiro Ojima, Mark Duncan, William Miller 「The role of oxidative stress in the megakaryocytic differentiation of K562 cells」 日本生物工学会平成 24 年度大会, 3Bp21, 神戸, 2012 年 10 月 (口頭発表)
3. 野村直希, Retno W. Nurhayati, 尾島由紘, 田谷正仁「種々のストレス負荷が K562 細胞の巨核球系分化に与える効果」 化学工学会年会, K318, 大阪, 2013 年 3 月 (口頭発表)

〔その他〕

なし

参考となる H P 等

なし