

¥ 生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
(分担) 研究報告書

iPS 細胞等の代謝解析

研究分担者 竹森 洋

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨 細胞のエネルギー獲得方法は主に2つあり、1つは解糖系でもう1つはミトコンドリア内での酸化的リン酸化反応である。前者は酸素を利用せず、後者は利用する。iPS細胞は急速に増殖するためのエネルギーを主に解糖系から得ているが、一部分化してしまったiPS細胞集団のエネルギー代謝がいかなるものかは詳細には調べられていない。本年度は、細胞内エネルギー代謝を可視化することで、iPS細胞集団の質を評価するための方法を開発した。

A. 研究目的

質の良いiPS細胞は急速に増殖するために、解糖系を主に利用して生体エネルギーであるATPを合成している。解糖系の一部は核酸合成やグルタチオン合成とも連動しており、細胞増殖に適している。一方、解糖系で合成できるATPは僅かであるという欠点を有する。反対に、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化は、大量のATPを合成できる反面、酸素を必要とし有害な活性酸素の発生原因となりうる。そのため、iPS細胞におけるミトコンドリアの活性化はDNA等の損傷に繋がる可能性もあり、質に影響を及ぼす要因となりうる。本研究では、解糖系を利用して増殖するヒトiPS細胞のエネルギー産生能をATP合成以外も含めて評価することで、ヒトiPS細胞の品質管理基準作成に役立つ項目を選出することを目的とする。本年度は特にヒトiPS細胞内のエネルギー代謝変化を定性的に評価を行うことを試みた。

B. 研究方法

ミトコンドリアの膜電位の測定にはJC-1

(Invitrogen社)で染色した。JC-1色素は水溶液中での凝集性が高いため、使用1時間前に直接培地に希釈し、遠心後に上清を細胞に添加した。染色時間は30分とし、培地交換で取り込まれなかった試薬を除去した。

染色後は、そのまま観察する場合と4%パラホルムアルデヒドで固定して、OCT3/4抗体(サンタクルーズ社)との2重染色を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトiPS細胞の利用は医薬基盤研究所倫理委員会の承認の元で行った。

C. 研究結果

昨年度は、細胞生存を測定するkitを活用して、ATP、細胞質NADH、ミトコンドリアNADHを簡便に測定する系を構築した。また、細胞外酸素消費計及び培地酸性度評価を活用して、ミトコンドリアでのATP産生に伴う酸素消費量と解糖系からのATP産生を予測した。その結果、ヒトiPS細胞は、解糖系を主要なATP産生源として利用していることが示唆された。一方で、継代が重なり、

質が低下していると予想される細胞は、ミトコンドリア利用度が高まってことが予想された。

また、マウスの肝臓由来の癌細胞を活用して、ミトコンドリアの機能を可視化する試薬をスクリーニングすることも行っていた。その結果、細胞死（アポトーシス）を判定するための試薬 JC-1 を低濃度で利用すると、ミトコンドリアの膜電位にのみ反応して蛍光を発することが示唆された。元々JC-1は、ミトコンドリアに集積する傾向があるが、過剰な JC-1 は、再度細胞質へ拡散する。ミトコンドリアへの蓄積は、ミトコンドリアの膜電位により JC-1 が凝集し、その凝集により赤色を発する非水溶性沈着物の集積を発生させた結果である。ミトコンドリアが酸素を利用するために膜電離を上昇させていると、JC-1 の凝集が増す

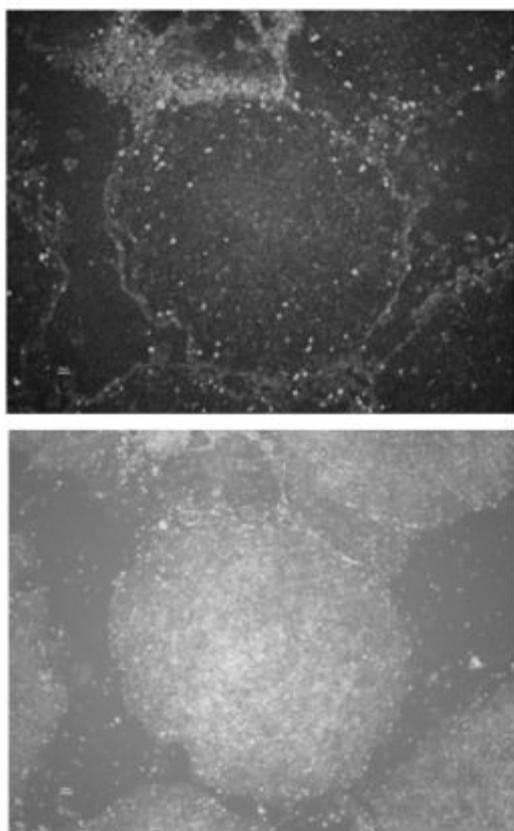


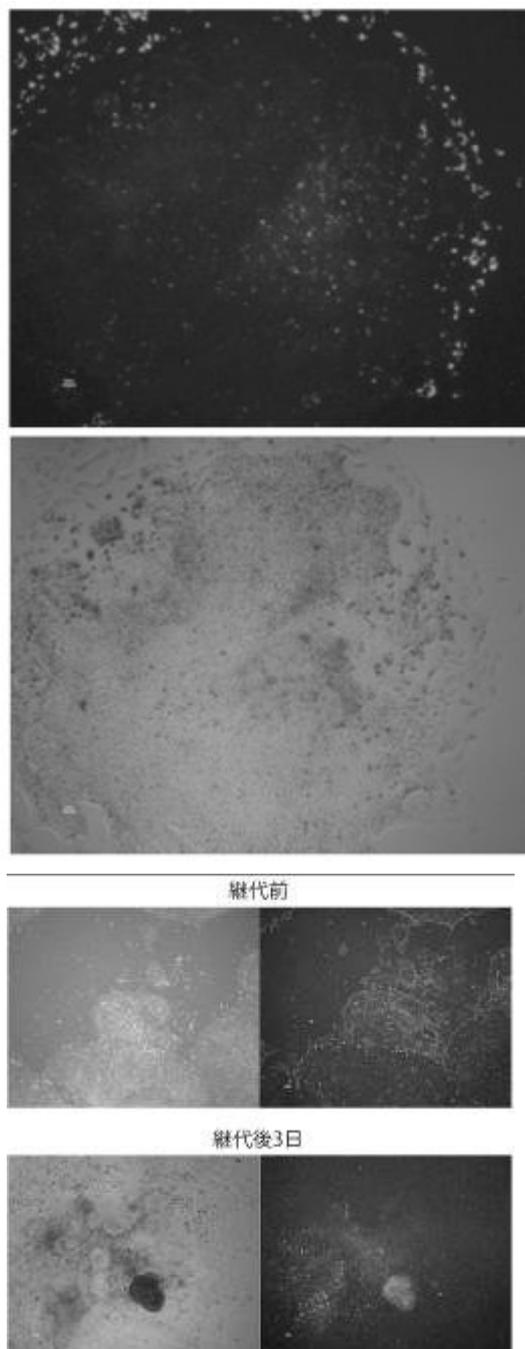
図1 ヒト iPS 細胞の JC-1 染色(上)と、位相差像(下)

が、解糖系が亢進しているためにミトコン

ドリアを利用していない細胞や死んでいる細胞は、JC-1 の細胞質側への拡散で終わり、赤色蛍光を発生しない。

そこで本年度は、JC-1 を活用してヒト iPS 細胞で、個別の細胞でのミトコンドリア利用度を予測することにした。図1に JC-1 で染色したヒト iPS 細胞の状態を示す。細胞集団の外層が良く染まっている。また、細胞集団の外に広がる細胞も強染色された。

次に、JC-1 で染色した細胞集団を別のプレートに移し継代した(図2)。JC-1 での染色が継代培養を経ても同一細胞に残ることを利用しての判定である。継代前に JC-1 で染色された細胞は、細胞集団の外に位置する傾向が観察された。



JC-1 の染色と Oct3/4 との染色を比較すると、JC-1 陽性は必ずしも、Oct3/4 陰性ということは無いようであるが、JC-1 強陽性区画には、Oct3/4 陰性細胞が存在していた（図 4）。また、JC-1 陽性細胞の細胞核は陰性細胞に比較して大きいようである。

最後に、JC-1 強陽性が細胞集団の周辺に位置することから、単なる JC-1 色素の取り込み効率の差から来た可能性も示唆される。そこで、細胞集団の内部でも JC-1 強陽性となる部位を特定することにした（図 5）。

### 図 3 JC-1 強染色の細胞集団の継代

続いて、JC-1 での染色が強い細胞集団の継代を行った（図 3）。JC-1 染色強度の強い細胞集団は、継代後に色素沈着のある細胞塊を形成し、質の低下が伺われる。

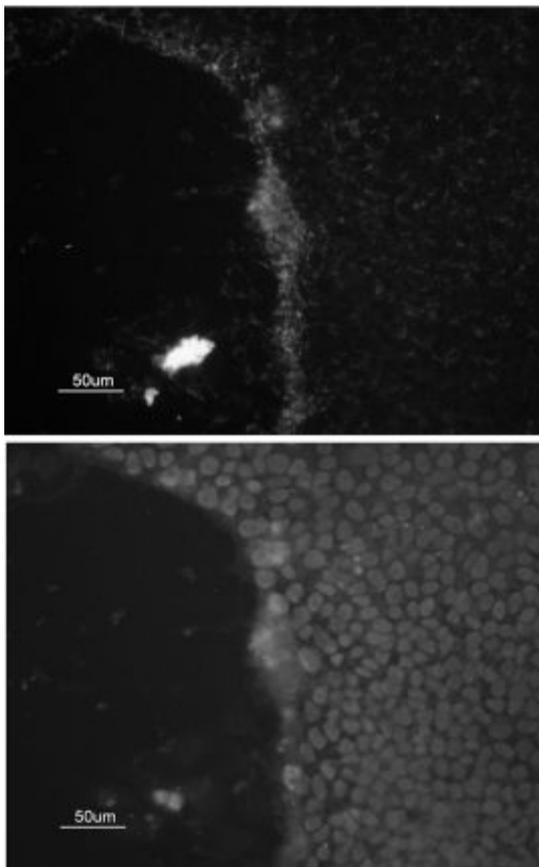


図 4 JC-1 染色(上)と OCT3/4 染色(下)

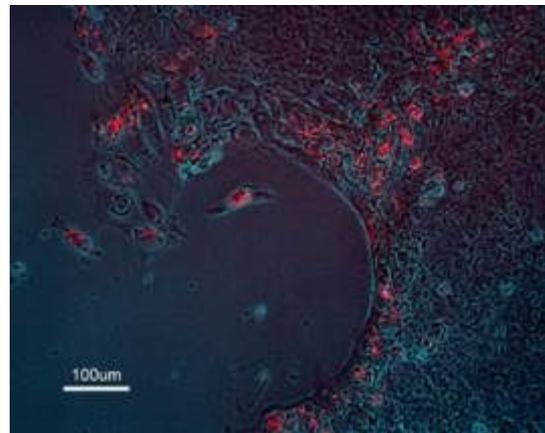


図 5 ヒト iPS 細胞集団における内部での JC-1 強陽性領域

図 5 は 2 つの iPS 細胞集団がぶつかった部位を示している。上方から 1 つの集団が、右から 1 つの集団が増殖しぶつかった場所（右上から左下への線）である。2 つの集団の境界は細胞の大きさも大きく異常が伺える。その細胞は JC-1 強陽性となった。単一の離れた細胞は JC-1 染色部位が核に見えてはいるが、これはミトコンドリアが核に近傍に多く位置するためである。

#### D. 考察

本年度は、ヒト iPS 細胞の質を細胞内エネルギー代謝（ミトコンドリア利用度）で比較評価できないか検討を行った。特に、個別の細胞での評価方法を検討し、JC-1 による染色がヒト iPS 細胞の質との相関の一部を反映している可能性が示唆された。ま

た、JC-1 が細胞を生きのまま染色できる点や、継代後も染色時の細胞内エネルギー代謝を記憶している点が興味深い。今後は、他の指標も組み入れて、細胞内エネルギー代謝がヒト iPS 細胞の質を議論できるプローブとして利用できるのかを検討する必要がある。

#### E. 結論

ヒト iPS 細胞の品質管理に細胞内エネルギー代謝の指標として JC-1 染色が有効であることが示唆された。

## F. 参考文献

1) Lee J, Tong T, Takemori H, Jefcoate C. Stimulation of StAR expression by cAMP is controlled by inhibition of highly inducible SIK1 via CRT2, a co-activator of CREB. *Mol Cell Endocrinol.* (2015) in press.

2) Popov S\*, Takemori H\*, Tokudome T, Mao Y, Otani K, Mochizuki N, Pires N, Pinho MJ, Franco-Cereceda A, Torielli L, Ferrandi M, Hamsten A, Eriksson P, Bertorello AM, Brion L. (\* equally contributed)

Lack of SIK2 prevents the development of cardiac hypertrophy in response to chronic high-salt intake

*PLoS ONE* (2014) 9:e95771

3) Sontag JM, Sontag E, Tesone-Coelho C, Takemori H, Zwiller J, Dierrich JB. Cocaine Regulates the Salt-Inducible Kinase (SIK1) by Inducing Protein Phosphatase-2A Expression in Rat Brain. *J Drug Alcohol Res* (2014) 3: ID 235854.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice. *Immunology* (2015) in press

2) Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes* (2014) 5: 1095-1114.

3) 熊谷彩子、竹森 洋. 薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用 薬用植物・生薬の開発と今後の展望 ~資源確保、品質評価、製品開発. **シーエムシー出版** 川原信夫編集 (2015)

pp114-120

### 2. 学会発表

1) Alfredi A, Zhang Z, Mao W, Wang Y, Takemori H, Lu Z, Bast RC, Vankayalapati H. Highly potent and orally available SIK2 inhibitors block growth of human ovarian cancer cells in culture and xenografts *Cancer Res* (2014) 74(19 Suppl): Abstract nr 749

2) Tang HM, Gao WW, Chan CP, Siu YT, Wong CM, Kok KH, Ching YP, Takemori H, Jin DY

Metformin inhibits human T-cell leukemia virus type 1 transcription through activation of LKB1 and salt-inducible kinases *RETROVIROLOGY* (2014) 11(Suppl 1) P112

3) 熊谷彩子、伊東祐美、賀川舞、松田潤一郎、佐々木勉、田端俊英、竹森 洋. GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である  
第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

4) 竹森 洋、伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、賀川舞、竹本大策、佐々木勉. 簡便な培養細胞 beta-酸化評価法について  
第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

5) 佐々木勉、竹森 洋、渡辺彰弘、由上登志郎、北川一夫、望月秀樹. 脳虚血における CRT2-PGC-1 $\alpha$  シグナルの動態についての検討

第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

6) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫、土居純子、太田美穂

フラビ Pteroin B の ATP 産生抑制作用  
第 68 回日本栄養・食糧学会 (札幌) 2014 年 5 月 30 日

7) 佐野坂 真人、伊東 祐美、藤本 穰、大河原 知治、仲 哲治、竹森 洋. 塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリー欠損マウスの LPS 感受性に関する研究  
第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

8. 黒井 梓、伊東祐美、淵野裕之、山原 年、川原信夫、竹森 洋

ワラビ成分 Pterosin B の皮膚炎症疾患への応用

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

9. 賀川 舞、杉村康司、飯田 修、淵野裕之、黒井 梓、熊谷彩子、山原 年、川原信夫、竹森 洋

メラニン産生制御効果のある植物エキスの網羅的解析

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

10. 熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、佐々木 勉、田端 俊英、竹森 洋

GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

11. 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、淵野裕之、川原信夫、竹森 洋

肝糖新生における LKB1 下流因子 AMPK と SIK3 の重要性について

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

## G. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許出願

1) 特願 2014-234698「メラニン生成抑制剤、化粧品、医薬組成物、及びメラニン生成抑制剤の製造方法」竹森 洋、熊谷彩子、賀川舞、伊東祐美、川原信夫、淵野裕之、杉村康司、黒井梓（独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館）国内

2) 特願 2014-130876「プテロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤」妻木範行、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫（国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所）

(国内優先権主張)、米国

### 3. 実用新案

該当せず

### 4. その他

無し

