慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	超急速凍結とアクアポリン発現による幹細胞の選択・濃縮
Sub Title	Cryopreservation for the cell selection using water channels AQPs combination with ultra-quick freezing
Author	加藤, 靖浩(Kato, Yasuhiro)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究によって, 耐凍性を獲得したアクアポリン発現細胞のみ超急速凍結(液体窒素)によって選択されることを明らかにした(PLOS ONE [Feb 2014, vol19]。つまり, AQP4発現による耐凍性をマーカーとした新しい凍結方法を確立することで, 癌化が危惧される幹細胞の排除ならびに雑多な細胞集団から特定のアクアポリン細胞のみを選択できるシンプルな方法である。この方法は, 従来のマーカー染色やソーティング作業を必要としない。 Here we show that membrane damage caused by ultra-quick freezing is rescued by the expression of AQP4. We next examine if the expression of AQP4 combined with ultra-quick freezing can bes used to select cells efficiently under freezing conditions where most cells are died. Finally we propose that this simple but efficient and safe method may be applicable to the selection of mammalian cells for applications in regenerative medicine as well as cell-based functional assays or drug screening protocols.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2012 ~ 2014 課題番号 : 24792152 研究分野 : 生化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24792152seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４７９２１５２

研究課題名（和文）超急速凍結とアクアポリン発現による幹細胞の選択・濃縮

研究課題名（英文）Cryopreservation for The Cell Selection Using Water Channels AQPs Combination with Ultra-quick Freezing

研究代表者

加藤　靖浩（Yasuhiro, Kato）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：４０３９８７８０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究によって、耐凍性を獲得したアクアポリン発現細胞のみ超急速凍結（液体窒素）によって選択されることを明らかにした（PLOS ONE [Feb 2014, vol19]。つまり、AQP4発現による耐凍性をマーカーとした新しい凍結方法を確立することで、癌化が危惧される幹細胞の排除ならびに雑多な細胞集団から特定のアクアポリン細胞のみを選択できるシンプルな方法である。この方法は、従来のマーカー染色やソーティング作業を必要としない。

研究成果の概要（英文）：Here we show that membrane damage caused by ultra-quick freezing is rescued by the expression of AQP4. We next examine if the expression of AQP4 combined with ultra-quick freezing can bes used to select cells efficiently under freezing conditions where most cells are died. Finally we propose that this simple but efficient and safe method may be applicable to the selection of mammalian cells for applications in regenerative medicine as well as cell-based functional assays or drug screening protocols.

研究分野：　生化学

キーワード：　幹細胞　アクアポリン　凍結

１．研究開始当初の背景

従来型の CO_2 インキュベータによる単一ガス濃度環境下での培養は、様々な細胞が混在して培養され、その集団の中からマーカー抗体を用いて目的の細胞を回収する必要があるため、特定の性質を持った細胞の培養効率や細胞回収率の低下、さらには癌化の問題など安全性が危惧されていた。

２．研究の目的

本研究は、幹細胞の選択を従来型インキュベータならびにマーカー染色に頼ることなく、１）個別培養システムを用いて幹細胞に特化した選択的培養環境の構築。２）超急速凍結による幹細胞の選択・濃縮（アクアポリンの関与）。３）超急速凍結による幹細胞の性質・機能への影響を評価。これらを通して、幹細胞の選択・濃縮ならびに長期保存を達成する事を目的とする。

３．研究の方法

AQP4 の耐凍性獲得への関与を示すために、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）にマウス AQP4 を安定発現させた細胞株（AQP4）と AQP が発現していない細胞株（-）を作製した。得られた細胞は Ham’s F12 培養液（10%血清、1%抗生物質）を用いて培養を行った。細胞凍結は、酵素処理によって細胞を剥離した後、$1x10^6$ 個の細胞懸濁液に対し 10% DMSO 溶液となるように凍結チューブ内で混合し、プログラムフリーザー（-1、-30、-50℃/min）ならびに液体窒素（-120℃/min）によって凍結させた（液体窒素による凍結速度は、凍結チューブにセンサーを挿入して計測した実測値）。凍結融解直後の細胞生存率は、トリパンブルー染色法によって評価した。

総数 $1x10^4$ 個の細胞集団における個々の細胞膜傷害に対する凍結速度の影響を評価するために、初期の細胞膜傷害により細胞外に露出するホスファチジルセリンと結合する AnnexinV および後期の細胞膜傷害や細胞死によって、細胞外に放出される DNA 断片を検出する 7-amini-actinomycin D を指標とするフローサイトメトリーを行った。

形態学的な評価については、急速凍結前後のマウス AQP4 を安定発現させた細胞株（AQP4）と AQP が発現していない CHO 細胞株（-）を 2.5%グルタルアルデヒド、1%オスミニウム固定後、エタノール脱水を行い、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

AQP4 発現による耐凍性獲得を利用した細胞選択性について評価するために、AQP4 未発現 CHO 細胞(-)と AQP4 安定発現 CHO 細胞（AQP4）とを単独もしくは異なる割合で混合した細胞集団について急速凍結融解後、数日間培養したのち、生存・増殖した細胞を回収し、抗 AQP4 細胞外ドメイン抗体（Miyazaki K, et al., 2013）を用いて AQP4 陽性細胞および陰性細胞数をフローサイトメトリーにより測定した。

分化に伴って発現する内在性の AQP4 による耐凍性獲得を評価するために、Tet-off システムを備えた ES 細胞を用いた。分化誘導を行う前の ES 細胞はフィーダ細胞上に播種し、Leukemia inhibitory factor (LIF)と Doxycyxline (Dox)を添加した培地で培養することにより未分化能を維持した。神経系へ分化誘導は、フィーダー細胞ならびに LIF、Dox を除き、Achaete-scute homology1 (*Asc11*)を添加したαMEM 培地に交換する事により行い、誘導開始後 3 日目の細胞を分化細胞とした。内在性 AQP4 発現の有無は、RT-PCR 法を用いて確認した。耐凍性については、凍結保存液に添加する DMSO 濃度を 10、5、3%に低減することにより浸透圧格差を 1,794mOsm から 782mOs に是正させた場合の細胞生存率をトリパンブルー染色法によって評価した。

４．研究成果

アクアポリン安定発現による耐凍性と凍結速度

凍結融解直後の細胞生存率を AQP4 安定発現細胞（AQP4）と未発現細胞(-)とでトリパンブルー染色法により比較した所、凍結速度が比較的緩慢な場合（-1、-30、-50℃/分）においては、生存率は、101%から 65%で凍結速度依存的に推移し、AQP4 発現の有無による差は見られなかった。しかし、急速凍結（-120℃/分）した場合は、AQP4 発現による生存率（60.56±16.7%、図１実線）は、未発現細胞（2.46±1.4%、図１点線）と比較して有意に高く、AQP4 発現による耐凍性の獲得が哺乳類細胞において確認された。

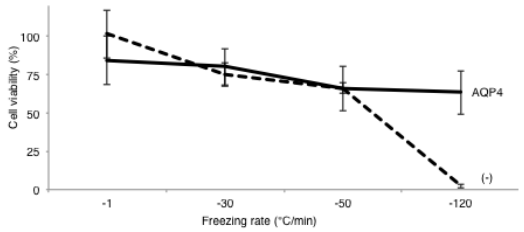

図1 AQP4発現有無による生存率と凍結速度

また、フローサイトメトリーにより初期アポトーシス指標 AnnexinV、後期アポトーシス指標 7-AAD を用いて個々の細胞膜傷害・細胞死を評価したところ、未発現細胞(-)は、凍結速度に応じて生細胞数が減少し、重度の細胞膜障害や細胞死が増加したが、AQP4 安定発現細胞（AQP4）は、凍結速度に関わらず生細胞数は一定であり、急速凍結（-120℃/分）においても、細胞死は抑制された（図 2）。

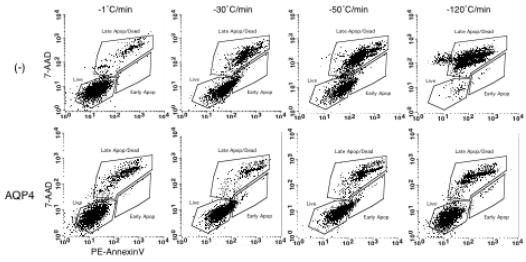

図2 AQP4発現有無による細胞膜障害と凍結速度

急速凍結前後の形態評価

凍結前後の細胞の形態を走査型電子顕微鏡により評価したところ、凍結前は、AQP4 安定発現細胞（AQP4）、未発現細胞(-)ともに、球体を保持し AQP4 発現の有無による形態相違は観察されなかった（図３上）。一方 AQP4 安定発現細胞（AQP4）は、急速凍結誘拐後も凍結前と同様の形態が観察されたのに対し、未発現細胞(-)は、健全な球体の細胞が観察されず、細胞膜破壊によって細胞がフラットになっていた（図３下）。

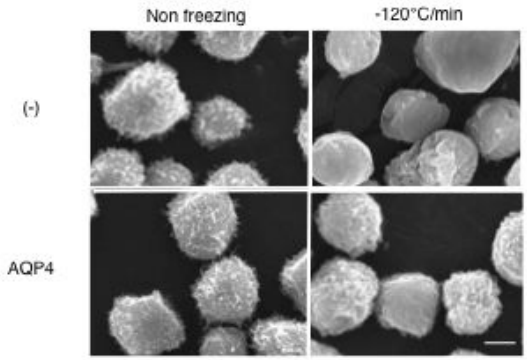

図3 AQP4発現有無による凍結前後の形態評価

急速凍結による細胞の選択性

哺乳類細胞において、AQP4 発現により細胞膜傷害が回避され、耐凍性が獲得されることが明らかになったことから、この耐凍性獲得が細胞選択の指標として活用できるか検討した。

具体的には、AQP4 発現細胞（AQP4）と未発現細胞(-)とを単独、もしくは異なる割合で混合した細胞集団について、急速凍結後生存した細胞中の AQP4 発現細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いて評価した。その結果、急速凍結融解後 AQP4 発現細胞のみが選択的に生存・増殖し、$1x10^4$ 個細胞に含まれる AQP4 細胞の割合は、99%以上に達した（図４）。

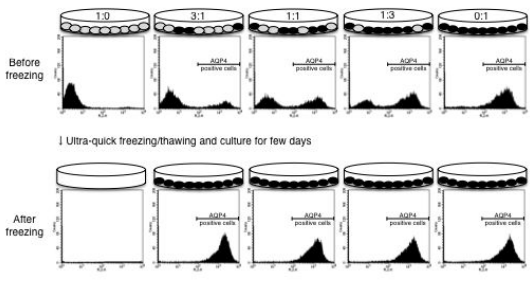

図4 AQP4発現による細胞選択性

つまり、AQP4 遺伝子の発現によって耐凍性を獲得した細胞に対し、急速凍結を行う事に

より細胞の選択が可能となる。この方法により、従来のような細胞毒性を示す薬剤を使用するリスク、手間、コストが削減される。

ES 細胞のアクアポリン発現と耐凍性

未分化の胚（ES 細胞)から発生・分化過程に従って発現する内在性 AQP ファミリーについて、遺伝子発現プロファイルと多変量解析によって検討したところ、aqp4 の発現が、神経分化過程に伴って上昇し、神経幹細胞（NS）で発現が最大になることを見いだした（図 5)。

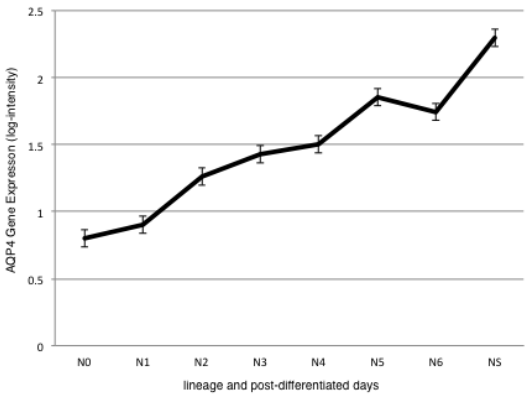

図5 神経系への分化に伴うaqp4の発現推移

そこで、テトラサイクイリン発現誘導システムを備えた ES 細胞を用いて、未分化維持に関与する Dox ならびに LIF を除いた培地に置換、Achaete-scute homology1 (*Asc1l*)を添加によってニューロンへの分化誘導を行い、RT-PCR を用いて、AQP4 発現を確認した。その結果、未分化な ES 細胞からニューロンへの分化誘導開始後 3 日目に AQP4 の発現が確認された（図６)。

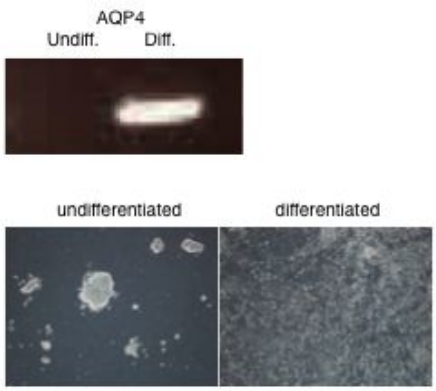

図6 ES細胞の未分化/分化細胞におけるAQP4発現

また、未分化な ES 細胞とニューロンに分化誘導した細胞について急速凍結融解時の生存率を評価した。その際、凍結保護剤として用いる DMSO 濃度を 10%、5%、3%にした場合の生存率を算出した。未分化な ES 細胞の生存率は、それぞれ 6.8±2.1%、7.5±7.8%、1.0±1.4%であった。一方、分化誘導された神経細胞の生存率は、それぞれ 38.0±12.6%、49.0±17.0%、25.5±2.1%であった（図７)。

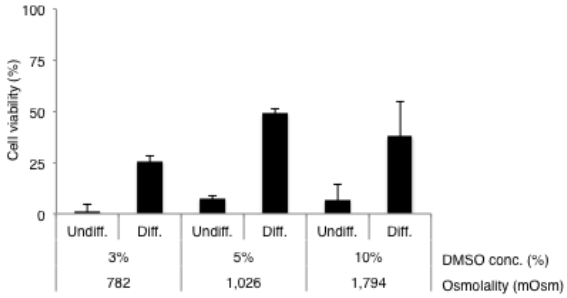

図7 ES細胞の未分化・分化細胞における生存率とDMSO濃度

すなわち、AQP4 の発現が無い ES 細胞では、DMSO 濃度低減による浸透圧格差の是正によって細胞内の脱水が阻害されたため、生存率が 1%まで低下したが、神経系に分化した ES 細胞においては、AQP4 の発現により細胞内の脱水が温度非依存的に速やかに行われるために、DMSO 濃度が低下しても生存率の低下は限定的であったと考えられる。

これらの成果により、再生医療分野において、AQP4 を発現する神経や筋肉など特異的細胞選択法として活用が期待される。また、iPS 細胞から分化誘導した際に残存する未分化細胞の除去法としての効果も期待される。本研究によって、アクアポリンの耐凍性を活用した生物工学へのさらなる発展のための礎を築くことができた。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計３件）

(1) J Kato, Y Takai, M K Hayashi, Y Kato, M Tanaka, Y Soma, Y Abe, M Yasui Expression

and localization of aquaporin-4 in sensory ganglia
*Biochemical and Biophysical Research Communications(BBRC)*451(4):562-7 (2014)、査読有、doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.026

(2) Y Kato, T Miyauchi, Y Abe, Kojić, M Tanaka, N Chikazawa, Y Nakatake, S. B. H. Ko, D Kobayashi, A Hazama, S Fujiwara, T Uchida and M Yasui Unprecedented Cell-Selection Using Ultra-Quick Freezing Combined with Aquaporin Expression
PLoS ONE 9(2): e87644, (2014) 、査読有、doi:10.1371/journal.pone.0087644

(3) K Miyazaki, Y Abe, H Iwanari, Y Suzuki, T Kikuchi, T Ito, J Kato, O Kusano-Arai, T Takahashi, S Nishiyama, H Ikeshima-kataoka, T Tsuji, T Arimitsu, Y Kato, T Sakihama, Y Toyama, K Fujihara, T Hamakubo, M Yasui Establishment of Monoclonal Antibodies Against the Extracellular Domain That Block Binding of NMO-IgG to AQP4.
Journal of Neuroimmunology 260:107-116. (2013) 、査読有、
doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.03.003

〔学会発表〕（計６件）

(1) 加藤靖浩、水分子を制御するアクアポリン発現と超急速凍結による細胞選択、第23回発達腎研究会、慶應義塾大学（東京都新宿区）
(2) 加藤靖浩、細胞選別を目的とした超急速凍結法、第87回日本生化学会、H26.10.18、国立京都国際会館（京都府京都市）
(3) 加藤靖浩、Cryopreservation for The Cell Selection Using Water Channels AQPs Combination with Ultra-quick Freezing、Biotechnology、H26.6.26、スペイン（バレンシア）
(4) 加藤靖浩、Investigated freezing methods from water dynamics by Aquaporin、第87回日本薬理学会、H26.3.19、仙台国際センター（宮城県仙台市）
(5) 加藤靖浩、水分子動態を制御するアクアポリンから探る凍結法、第85回日本生化学会、H24.12.15、マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）
(6) 加藤靖浩、Investigated freezing methods from water dynamics by Aquaporin、FEBS2012、H24.9.3、スペイン（セビリア）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1)研究代表者
加藤靖浩（Kato Yasuhiro）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40398780