

# 小核法を用いたマウス胚性幹細胞染色体の安定性評価

金城 康人\* 宮崎 則幸\*

Evaluation of chromosomal stability in murine embryonic stem cells by using the cytokinesis-block micronucleus technique

Yasuhito Kinjo\*, Noriyuki Miyazaki\*

キーワード：マウス ES 細胞，染色体安定性，線照射，小核法

Keywords：murine ES cells, chromosomal stability, gamma irradiation, micronucleus technique

## 1. はじめに

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell; 以下 ES 細胞) とは、胚盤胞 (受精後マウスで4日, ヒトで6日程度の初期胚) の内部細胞塊から体外培養により樹立された細胞である。すでに分化した組織細胞の初代培養の場合とは異なり, この細胞は培養系で半永久的な増殖が可能であり, さらに条件次第では, ほぼどのような組織の細胞にも分化するという特性 分化多能性 を有することから, 事故や病気で機能が失われた臓器・組織を再生する細胞資源の切り札として期待されてきた<sup>(1)</sup>。しかしながら, ES 細胞を採取するためには, 本来一個の個体に発生しうる胚 (生命の萌芽) を破壊してこれを犠牲にするという倫理的な問題に加え, 癌化のリスクをはじめとする安全性についても, 実用化にあたってクリアすべき問題点として指摘されている<sup>(2)</sup>。

ところで細胞の癌化には, 染色体の数や構造の変化, すなわち不安定化が深く関与することが近年の研究で明らかにされている。本研究では, 染色体の不安定化の結果, 分裂間期の細胞質内に出現する小核に着目し, マウス ES 細胞に, 染色体不安定化をもたらすストレス要因の一つとして 線照射を照射した後その出現頻度を調べたので, その結果について報告する。

## 2. 材料と方法

**2.1 細胞培養** ES 細胞は樹立・市販されているマウス 129SV を用いた。また対照として用いた細胞はマウスの胎児皮膚繊維芽細胞由来の m5S (京都大学, 立花 章博士より分与) である。m5S 細胞は株細胞としては珍しく, 染色体構成が安定的に維持され, また動物に移植しても造腫瘍性を示さないことが報告されている<sup>(3)</sup>。129SV 細胞は, 完全合成培地である Carticell (大日本住友製薬) に  $10^3$  単位/ml の分化阻害因子である LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加した培地で, また m5S 細胞は, 10% ウシ胎児血清, 2.2g/l-NaHCO<sub>3</sub> および 100U/ml-ペニシリン G カリウム / 100  $\mu$ g/ml 硫酸ストレプトマイシン添加 MEM- 培地で, 共に

5% 炭酸ガス - 95% 空气中, 37 °C の条件で培養した。図 1 に活発な増殖を示す両細胞の顕微鏡写真を示す。共に生育状態のきわめて良好な, 典型的な所見である。

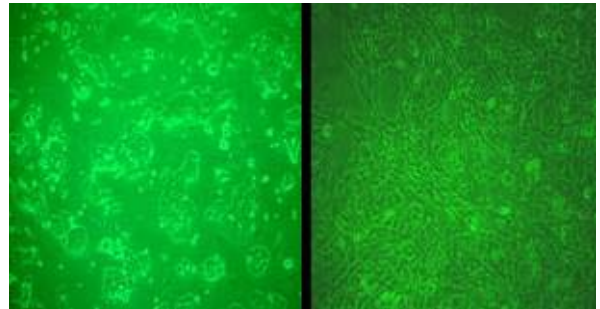


図 1. 増殖中の 129SV 細胞 (左) および m5S 細胞 (右)

**2.2 コロニー形成法による放射線感受性テスト** ES (129SV) 細胞と対照 (m5S) 細胞との間の, 放射線に対する致死感受性の差異に関し, 平均致死線量 ( $D_0$ : 照射した細胞に平均 1 個の致死損傷をもたらす線量) の比較による検討を行った (m5S 細胞の  $D_0$  については文献値<sup>(3)</sup>を採用)。放射線による小核の誘発に際し, 両細胞間で同一の線量域での比較が可能か否かを確認するためである。129SV 細胞を 0.25% トリプシン - EDTA で 37 °C, 2 分間処理して培養フラスコの器壁から剥がし, ピペティングにより分散させてクライオチューブに分注した後, <sup>60</sup>Co 線源 (129TBq) の 線を室温下 0.33 ~ 2.03Gy/分の線量率で 1 ~ 6.7Gy 照射した。照射後, 線量区ごとにフラスコあたり 258 ~ 66800 個の細胞を蒔いて培養 2 週間後, 生じたコロニーを 10% ホルマリン固定, 3% ギムザ染色後, 目視計数した。

**2.3 小核テスト**<sup>(4)-(7)</sup> 放射線感受性テストで決定した線量域の 線を照射した細胞に, 2 核細胞 (細胞分裂はできずに核分裂のみした細胞) を誘導するためのサイトカラシン B を 3  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。15 時間培養後, 0.075M-KCl で 37 °C, 5 分低張処理, メタノール - 酢酸 (3:1) 混液で固定したものをスライドガラス上に滴下し, ギムザ染色を施してプレパラートを作製した。光学顕微鏡下, 線

\* ライフサイエンスグループ

量区ごとに 1000 個の 2 核細胞を計数し、その細胞質中に小核を内包するものの頻度を求めた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 線照射後の 129SV 細胞と m5S 細胞の生残率

図 2 は 線照射後の 129SV 細胞の線量 - 生残率曲線である。横軸は線量、縦軸は生残率（コロニー数 / 播種細胞数）を片対数で示してある。

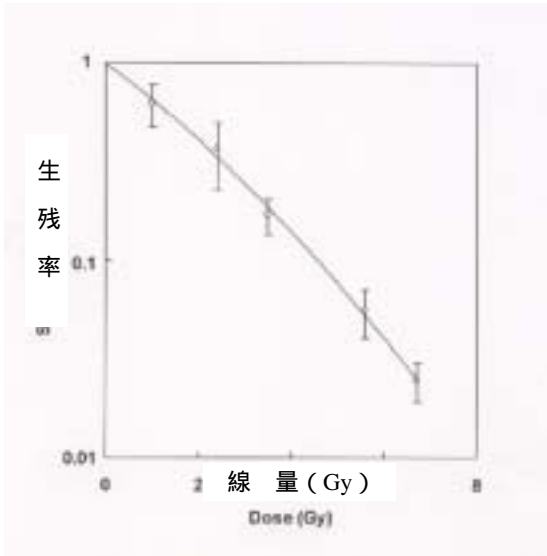


図 2 . 129SV 細胞の 線に対する線量 生残率曲線

この曲線から細胞の一般的な放射線感受性の指標である平均致死線量 ( $D_0$ ) を求めたところ、約 1.6Gy と推定された。一方 m5S 細胞の  $D_0$  については、文献値<sup>(3)</sup>では 2Gy としている。従って 129SV 細胞の方が致死感受性はやや高い傾向とみられるが大差ではなく、小核テストは同一の線量域で行えると判断した。

3.2 線照射後の小核テスト 図 3 に、線照射後にサイトカラシン B で処理した細胞の顕微鏡観察例を示す。この例では、分裂を経由していないか、またはサイトカラシン B の影響を受けなかった単核細胞、小核を含まない 2 核細胞、小核を含む 2 核細胞のそれぞれが見えている。

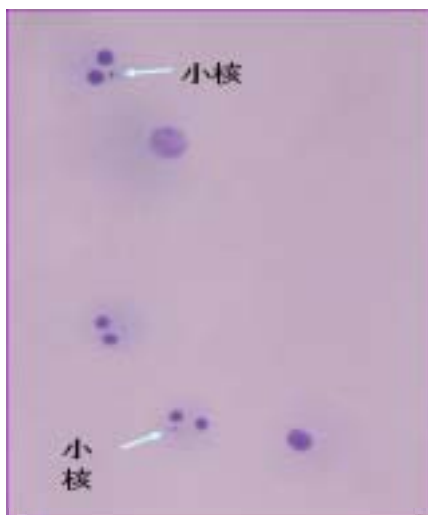


図 3 . 線照射後サイトカラシン B で処理した細胞

このような像から、2 核細胞のうち、小核を含むものの頻度を定量した。厚生労働省のガイドラインでは食品添加物や環境汚染物質など、化学物質の影響を小核テストで評価する場合には、被検物質が細胞増殖の 50% 以上を抑制する用量を最高用量として用いることを推奨している<sup>(7)</sup>が、本実験では図 2 の 50% 生残率を与える線量 (1.6Gy、また m5S は 2Gy でいずれも偶然  $D_0$  にほぼ一致) を挟む線量域を非照射区以外に 3 点選び、各線量区で、1000 個の 2 核細胞中、小核を含むものを計数した。その結果を表 1 に示す。

表 1 . 各線量区、1000 個の 2 核細胞中の小核含有細胞数

細胞 線量(Gy)	129SV	m5S
0	7	9
1	25	28
2.4	56	55
3.5	122	103

この表から、 $D_0$  (129SV で 1.6Gy、m5S で 2Gy) を少し越える 2.4Gy までには小核出現数にほとんど差がなく、 $D_0$  の約 2 倍前後の線量である 3.5Gy で 129SV 細胞にその頻度がやや高くなる傾向が読み取れる。さらに高い線量域での差の拡大の有無については今後の検討課題である。さらに、この系では検出されない微細な遺伝子レベルでの変動の差異、あるいはエピジェネティック (後成的) な変動の差異が存在する可能性もあり、それらは細胞の癌化には複合的に影響すると考えられる。当面、インビトロの系で細胞の癌化の第一歩と考えられる形質転換能の有無を調べると共に、その背後のメカニズム、さらに放射線以外のストレス源に対する ES 細胞特異的な反応の有無などについても検討を加えてゆきたいと考えている。

(平成 19 年 7 月 3 日受付, 平成 19 年 7 月 26 日再受付)

## 文 献

- (1) 中辻憲夫「ヒト ES 細胞 なぜ万能か」岩波科学ライブラリー 88, 岩波書店, (2002)
- (2) 山中伸弥「幹細胞生物学の現状と展望」細胞工学 26(5), 482-484 (2007)
- (3) M. S. Sasaki and Y. Kodama : 「Establishment and some mutational characteristics of 3T3-like near diploid mouse cell line」J. Cell Physiol. 131,114-122 (1987)
- (4) A. Wakata and M. S. Sasaki : 「Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations」Mutat. Res. 190, 51-57 (1987)
- (5) M. Fenech : 「The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations」Mutat. Res. 285, 35-44 (1993)
- (6) S. Ban et al. : 「Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes obtained from patients with cancers of the breast, head and neck or cervix as determined with a micronucleus assay」J. Radiat. Res. 45, 535-541 (2004)
- (7) 日本製薬工業協会編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンステスト社, pp117 (2000)