

リボソームによる多能性幹細胞の創造 Generation of Pluripotent Stem Cells by Ribosome

中川 潤紀 米田 琉世 西山 菜緒 後藤 舞子
Hiroki Nakagawa, Ryusei Yoneda, Nao Nishiyama, Maiko Goto

Incorporation of lactic acid bacteria (LAB) into the human dermal fibroblasts (HDFs) can generate cell clusters and they are similar to the embryoid bodies derived from embryonic stem cells (Ohta et al., 2012). After that, the cellular transdifferentiation is caused by ribosomes (Ito et al., 2018). Our purpose in this study is to examine the transdifferentiation ability of ribosomes using other kind of cells. We used human hepatoma cells (Li-7), rabbit kidney cell line (CCD-IC), rabbit cornea cells (RC4), Chinese hamster lung cells (CHL), mink lung cells (NBL-7), medaka caudal fin cell line (OLHNI-2, J Comp Physiol B 2006) and ribosomes for the cell clusters formation assay. To perform it, we investigated several culture conditions by changing the amount of ribosome. We showed that the ribosomes incorporated Li-7, CCD-IC, RC4, CHL, NBL-7 and OLHNI-2 induced cell clusters. Then, we cultured cell clusters of RC4, Li-7 and CCD-IC in STEMPRO Adipogenesis and Osteogenesis Differentiation Medium and conducted Oil Red O staining and Alizarin Red staining, respectively. The ribosomes incorporated RC4 and Li-7 were differentiated into adipocytes and osteoblasts. CCD-IC was differentiated into only adipocytes. These findings demonstrate that incorporation of ribosomes induces cellular transdifferentiation of not only HDFs but also other kind of animal cells.

1. はじめに

2007年、京都大学山中伸弥教授が幹細胞の一種であるiPS細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cell)(図.1)に関する論文を発表して以来、再生医療への期待は急速に高まりつつある。

幹細胞とは、組織を構成する分化した細胞をつくる能力を持ち、自己複製能力を持つ未分化な細胞のことである。多様な組織も、元をたどると親の細胞に行き当たる。幹から多くの枝がわかれ、大きな木へと成長していくように幹細胞からも多くの細胞がわかれていき、組織や器官を形作る様々な細胞へと分化する。

さて、先のiPS細胞であるが、自己細胞を利用するため拒絶反応が起きない、また、ES細胞の課題であった倫理的問題が生じないというメリットがある。しかし、iPS細胞作製の際には細胞に初期化因子を導入する必要がある、これによって細胞が腫瘍化、すなわち癌化するリスクが生じる。

熊本大学大学院生命科学研究部神経化学分野太田訓正准教授は、人工的に作成した幹細胞を再生医療に利用するための基礎研究を行っている。太田研究グループは、京都大学の山中教授がヒトiPS細胞作製に用いたヒト皮膚細胞(HDF細胞: human dermal fibroblast cell)を実験に用いて、HDF細胞の基本培養液で培養、トリプシン及びEDTA処理を行った後、リボソームをエンドサイトーシスで取り込ませると数日後には細胞塊が形成され、アルカリフオスファターゼ染色に強く反応したことから多能性を有することが示唆されたことを発表した。

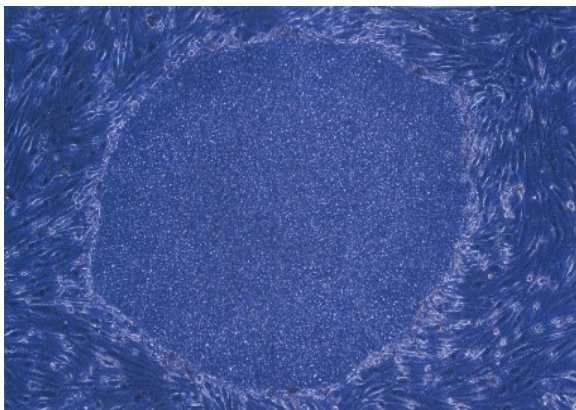


図.1 iPS細胞(京都大学のホームページより掲載)

リボソームについて

リボソームは、直径約20~25nmで、数本のRNA分子と50種類ほどのタンパク質からなる巨大なRNAとタンパク質の複合体である(図.2)。全体として大小2つの粒子に分かれ、それぞれ大サブユニット、小サブユニットと呼ばれる。これらのサブユニット中心部にはRNA分子があり、その表面には数多くのタンパク質が結合している。ただし、2つのサブユニットが会合する接触面にはタンパク質は結合せず、RNA同士が直接、結合する。リボソームはタンパク質合成の場であり、遺伝情報の設計図であるDNAから転写されたmRNAをもとにタンパク質を合成する。A・U・G・Cの4種類の塩基からなるmRNAの塩基配列3個(コドン)で1つのアミノ酸を指定しているため、 $4 \times 4 \times 4 = 64$ 通りのコドンの組合せから20種類のアミノ酸及び終止コドン指定する遺伝暗号表がつけられる。コドンとアミノ酸の対応は原核生物・真核生物を通じ共通であるが、ミトコンドリアなど一部の生物種では部分的に異なっている。

mRNAの塩基配列に基づきリボソームでアミノ酸が順次結合されてポリペプチド鎖がつながり合わされていく。この時、コドンとアミノ酸を接続する役割を果たすtRNA(転移RNA)という。塩基70~90で分子量2~3万、生体内でDNAからmRNAが合成された後、mRNAのコドンに対応させる役を持ち、リボソーム上でコドンにしたがってポリペプチドが合成されるのを仲介する。細胞内には20種のアミノ酸に対して一種またはそれ以上の分子種の転移RNAが存在するが二次構造はクローバーの葉の形が一般的で生体内で折りたたまれて、L字型の三次構造をとると考えられている。tRNAは、アミノ酸特異的な酵素(アミノアルシルトランスファーRNA合成酵素)の作用を受け対応するアミノ酸を結合する。

原核生物でも真核生物でも同様に、リボソームでは、アミノアルシルトランスファーRNAが次々と運ばれ、対応するアミノアルシルトランスファーRNAが触媒作用によってペプチドに結合されていく。すなわち、細胞質内だけでなく、核内にも存在するリボソームはmRNAで結合されて集団を作り、ポリリボソームつまりポリソーム polysomeと呼ばれる集合体になって、この状態でタンパク質合成の場となる。



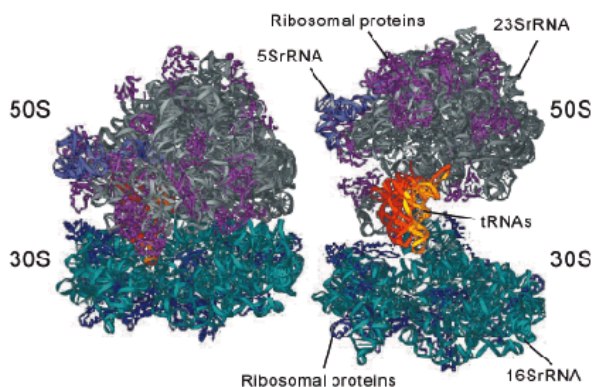


図.2 リボソーム(national institute of genetics)

太田研究グループの先行研究

太田研究グループは、トリプシン処理をしたヒト皮膚細胞に生きた乳酸菌を取り込ませると、細胞塊を形成し多能性を持つことを報告している(図.3)。なお、多能性を持たせる原因となる物質は乳酸菌中のリボソームであることが明らかになっている。

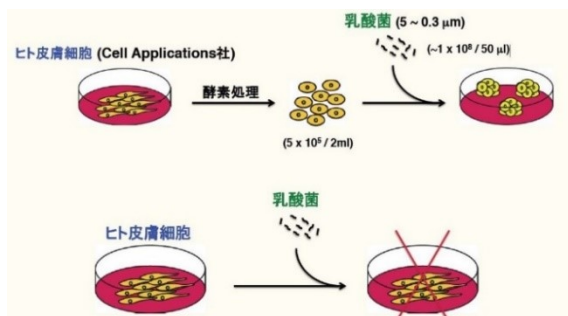


図.3 ヒト皮膚細胞のリプログラミング (Ohta et al, PLOS ONE e5 1886 2012)

図.4 は、ヒト由来である小腸細胞, 胃癌細胞, 食道癌細胞である。上段がコントロール(未処理), 下段が概略図の手順通り(図.3)に、細胞にトリプシン処理後、リボソームを取り込ませたものである。どの細胞においても複数の細胞が細胞同士で接着し、細胞塊を形成していることが分かる。ヒト皮膚由来の細胞塊は、ヒト幹細胞用分化誘導液によって外胚葉・中胚葉・内胚葉に分化誘導することができる。外胚葉とは、皮膚細胞や爪、水晶体などを形成する胚葉のことであり、中胚葉は筋肉など、内胚葉は消化管や肺などを形成する。

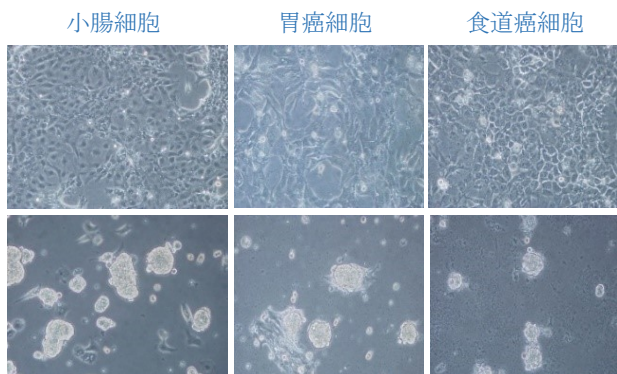


図. 4 上段：コントロール(未処理)
下段：リボソームを取り込ませた細胞
(第 10 回幹細胞シンポジウム資料)

そして、リボソームを取り込んだ細胞塊を分化誘導して、染色処理すると、細胞の分化が確認された。(図.5)

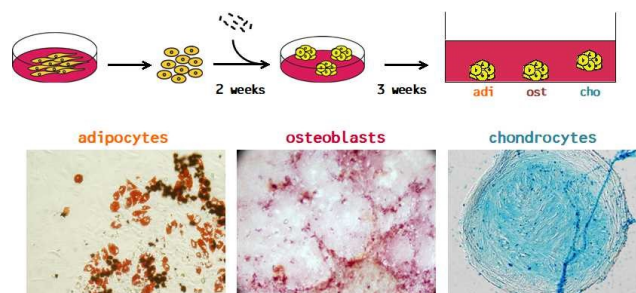
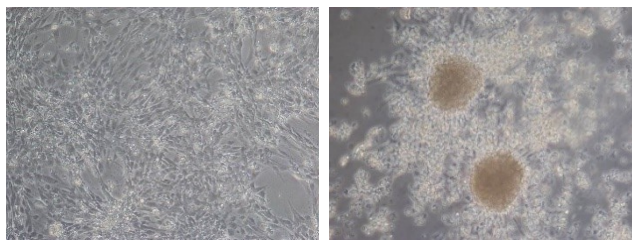


図. 5 細胞染色(脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞) (Ohta et al, PLOS ONE e5 1886 2012)

先行研究で得られたこと

H27 課題研究で、先輩方はメダカの尾ヒレ細胞(OLHNI-2)を用いて、太田研究グループと同じ手法で実験を行った(図.6)。加えるリボソームの量を変えると、細胞塊が形成するものと形成しないものがあったため、その細胞に適したリボソームの量があることが判明した。

また、メダカヒレ細胞にトリプシン処理を施さなかった場合は細胞塊を形成しなかったが、施した場合には細胞塊を形成したため、細胞がエンドサイトーシス(細胞外の物質を取り込む膜の移動・変形によって物質を輸送する機構の一種。飲食作用ともいう)によって、細胞がリボソームを取り込みやすくなったことが分かった。



コントロール 細胞塊

図.6 メダカ尾ヒレ OLHNI-2 細胞

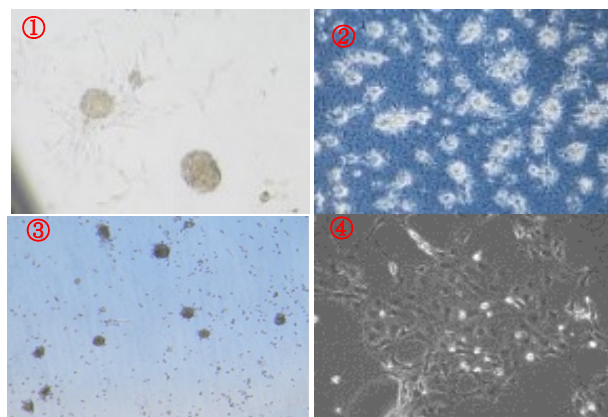
H28 課題研究では、トノサマガエル真皮性黒色素由来細胞株 LAH1, イヌ腎臓上皮様細胞由来細胞株 MDCK, ヒト前骨髄球性白血病細胞由来細胞株 HL-60, ハムスター肺線維芽細胞由来細胞株 CHL, ミンク肺上皮様細胞由来細胞株 NBL-7, ウサギ角膜線維芽細胞由来細胞株 RC4 を用いて同様の実験を行った。(表.7)

表.7 細胞株と培地, リボソーム量と細胞塊形成の関係

細胞株	培地	リボソーム量 (μg)	細胞塊
LAH1(接着細胞, 中胚葉由来)	L-15	10,20,30,40	×
		3,6,10,15	×
	mFSF	10,20,30,40	×
		3,6,10,15	×
MDCK(接着細胞, 中胚葉由来)	MEM	10,20,30,40	×
		3,6,10,15	×
	mFSF	10,20,30,40	×
		3,6,10,15	×

CHL(接着細胞, 内胚葉由来)	MEM	10,20,30,40	×
	SCM 132	1,3,10,30	×
NBL-7(接着細胞, 内胚葉由来)	MEM	10,20,30,40	×
	SCM 132	1,3,10,30	△
RC4(接着細胞, 外胚葉由来)	MEM	10,20,30,40	○
	SCM 132	1,3,10,30	○
HL-60(浮遊細胞, 中胚葉由来)	RPMI 1640	10,20,30,40	×
		3,6,10,15	×
	mFSF	10,20,30,40	×
		3,6,10,15	×

- ①ウサギ角膜細胞 (外): ○
②ハムスター肺細胞 (内): ○
③ミンク肺細胞 (内): ○
④トノサマガエル皮細胞(中): ×等



また、免疫染色を行った HDF 細胞の細胞塊を図.8 に示す。二次抗体のみであるコントロール、DAPI で染色した核、 α -M-IgG-cy3 で染色したリボソームの His, これらを重ねた写真を得た。 α -M-IgG-cy3 で免疫染色したリボソームの His, DAPI で免疫染色した核を重ねた画像を比較したところ、核の位置とリボソームの位置が重なっていることからリボソームが確実に細胞内に取り込まれていることが確かめられた(図.8)。

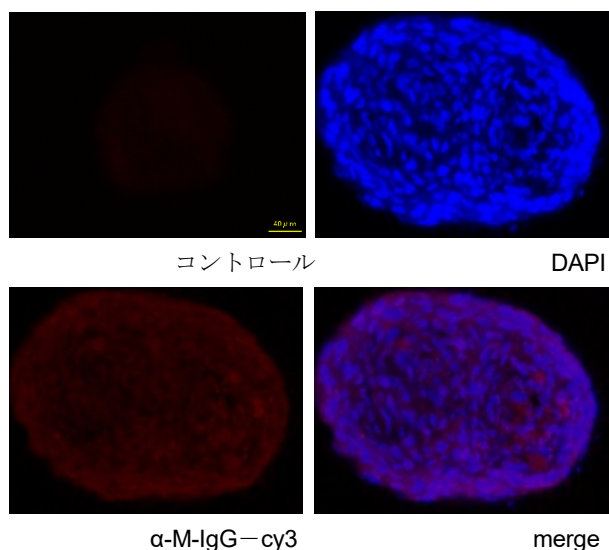


図.8 RC4 細胞免疫染色

培養液について、上段の L-15, MEM, RPMI1640 は理化学研究所バイオリソースセンターBRC が指定した基本培養液である。下段の mFSF, SCM132 は、ヒト幹細胞用の培養液である。また、細胞塊について、細胞塊が確認されたものを○、確認されなかったものを×、確認はされるものの整っていないものについては△として表している。

H28 課題研究の実験結果から、ウサギ細胞で細胞塊が確認され、リボソームによる細胞塊形成を再現することができた。これは、細胞が初期化されて多能性を有する可能性の存在を示している。また、浮遊細胞では細胞塊が形成されない可能性が高いこと、全ての接着細胞が細胞塊を形成するわけではないことが判明した。

2. 研究の方向性

太田研究グループと同様の手法で実験を行い、細胞塊を形成する。細胞の共通点、リボソームの含有量、細胞塊の形を着目する。

本研究で使用する細胞(図.9)

理化学研究所バイオリソースセンターから入手
Li-7 ヒト肝臓癌由来細胞株(内胚葉由来)

→癌細胞はリプログラミングするか

CCD-IC ウサギ腎集合管由来細胞株(中胚葉由来)

→ウサギの角膜細胞(外胚葉)が細胞塊形成した先行研究を参考に、他の細胞でも細胞塊形成するか

→ヒトと同様に細胞塊形成するか



(図.9)

研究の目的

この研究をするにあたって 2 つの目的をあげた。

1 他の細胞を使用しても細胞塊を形成するかどうか調べる

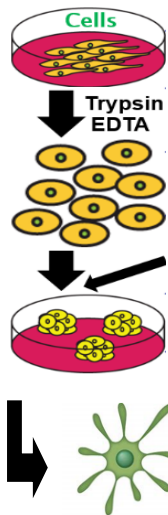
2 それらの細胞はまた別の種類に分化するかどうか調べる

1 について、先輩方の研究で、ウサギ角膜細胞、ハムスター肺細胞、ミンク肺細胞は細胞塊を形成することが分かった。このことから、これ以外の動物の細胞や他の体の器官でも細胞塊ができるかどうか調べるため

2 について、細胞塊ができた後に分化誘導液につけ、細胞染色をし、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化したかを確かめる。細胞塊ができたとしても、別の種類に分化できなければ多能性をもつことにならないので、調べるため

研究の手法

実験については、クリーンベンチ内で無菌操作を行った。



1. 細胞を洗浄
2. トリプシン処理
3. 細胞数確認
4. リボソーム添加
5. 細胞塊形成確認
6. 分化誘導
7. 細胞染色

図.10 細胞塊形成実験の手順

(1)細胞を起こす

- ① 液体窒素で冷凍していた細胞を取り出し、37°Cのウォーターバスで融解する。
- ② 10 mlチューブに移しバッファー(緩衝液)を加え懸濁する。
- ③ 遠心(1200rpm, 3分), 上澄みを吸引することで不純物(冷凍保存液など)を取り除く。
- ④ 培養液 10 mlを加え、6 cmシャーレに移しインキュベーターで培養する。

(2)トリプシン処理

- ① 細胞をバッファーで洗浄し、トリプシンを 0.5 ml加えインキュベーターで保管する(5分)。
- ② 顕微鏡を用いて細胞接着が切れているか確認する。
- ③ インヒビター(トリプシン阻害液)を 1.0 ml加え、トリプシンの活性を停止させる。
- ⑤ バッファーを 8.5 ml加え、10 mlチューブに移し懸濁する。



図.11CMF(緩衝液)



図.12 トリプシン

(3)細胞密度を求める

- ①セルカウンターを用いて細胞密度を求める。
- ②1wellに必要な細胞数 1.0×10^5 個が含まれる体積分, 別の 10 mlチューブに移し, 遠心分離機(1200rpm, 3分)にかけ, 上澄みを吸う(4wellを用いているので 4.0×10^5 個)。

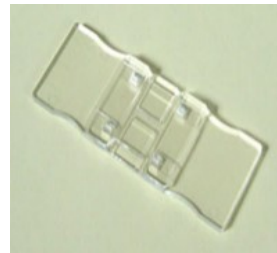


図.13 セルカウンター



図.14 遠心分離機

(4)リボソームの添加(図.16)

- ① 培養液を 0.5 ml(4wellより 2.0 ml)加え, よく懸濁する。
- ② リボソーム(0,10,20,30 μg)を入れた 4well に①を加える。
- ③インキュベーターで培養する。



図.15 4well シャーレ

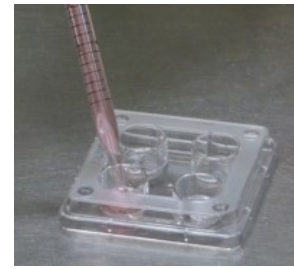


図.16 リボソーム+細胞

※リボソームの精製

リボソームは大腸菌由来のものとし, Hi-stag に吸着させて精製する。



Colon bacillus

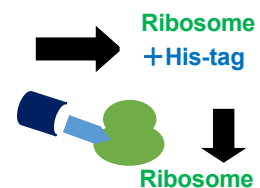


図.17 リボソームの精製

(6)分化誘導液につける

- ① マイクロピペットを, 培養液を吸って湿らせる
- ② 細胞塊を顕微鏡で確認しながら, マイクロピペットで比較的大きい細胞塊を取り出す(図.17)
- ③ 分化誘導に細胞塊を 2, 3 個加える
- ④ インキュベーターで 1 週間培養する。

(7)-1 細胞染色(oil Red 染色法)

- ① 10 分間振った液に水を加え, 6%に希釈しろ過する。
- ② 細胞を PBS で 2 回洗い, 500ml の 10%ホルマリンで, 10 分間固定する。
- ③ PBS で 2 回洗い 60%イソプロパノールに 1 分つけて上澄み液を吸う。
- ④ 染色液を細胞に加え, 10~20 分浸す。
- ⑤ 染色液を抜き, 60%イソプロパノールで 1 回洗う。
- ⑥ PBS で 2 回洗い, PBS 内で細胞を観察する。

(7)-2 細胞染色(Alizarin Red S 染色法)

- ①蒸留水で細胞を洗う。
- ②PFA で 30 分間固定, 上澄みを吸う。
- ③蒸留水で 2 回洗う。
- ④染色液に 2~3 分つける。

⑤染色液を抜き、蒸留水で3回洗い、蒸留水内で細胞を観察する。

(7)-3 細胞染色(Alcian Blue 染色法)

- ①PBS で1回洗い、4%のホルマリンで30分間固定する
- ②PBS で十分にすすぎ1%の染色液と0.1N HClに30分つける
- ③0.1N HCl で3回すすぎ、蒸留水を加え、倒立顕微鏡で観察する



図.18 細胞を起こす

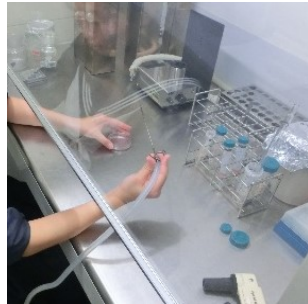


図.19 トリプシン処理



図.20 細胞密度を求める

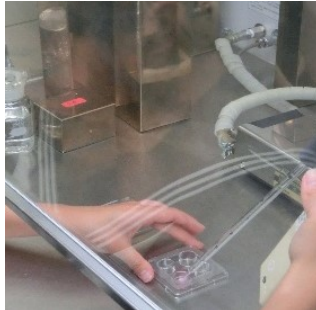


図.21 リボソーム添加



図.22 細胞培養



図.23 細胞塊確認

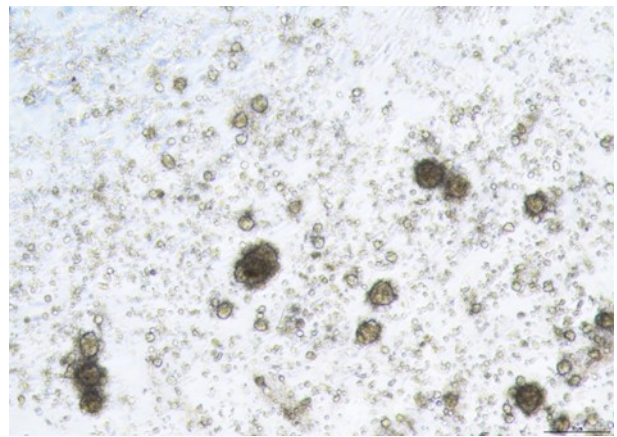


図.24 Li-7:ヒト肝臓癌細胞(リボソーム 10 μ g)

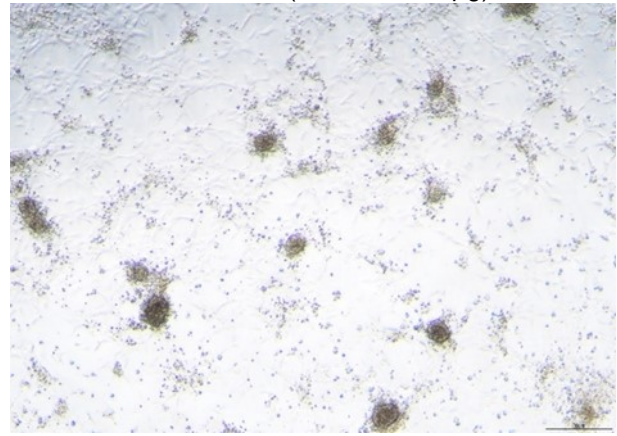


図.25 CCD-IC:ウサギ腎集合管細胞(リボソーム 30 μ g)

太田訓正准教授の更なる研究でリボソームの中でもあるタンパク質 X が細胞塊形成に関与していることが判明した。そこで私達もタンパク質 X を用いて細胞塊形成実験をした。リボソーム添加時と同様にタンパク質 X 量 0, 40, 60 μ g ごとに実験を行った。画像は図.22, 23, 24, 25, 26, 27 に示す。タンパク質 X 量ごとに細胞塊の形成度合いが違うのがわかる。

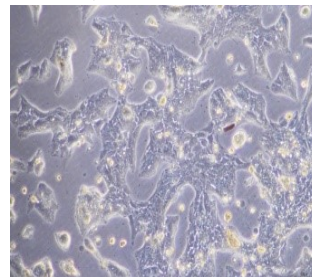


図.26 Li-7 0 μ g



図.27 CCD-IC 0 μ g

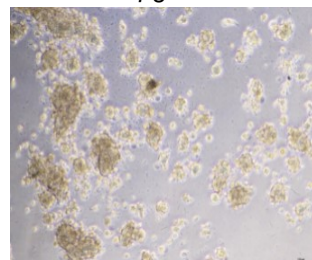


図.28 Li-7 40 μ g

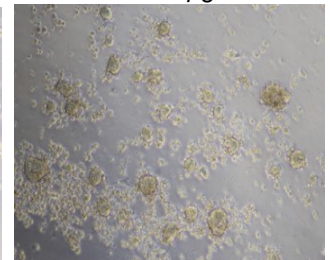


図.28 CCD-IC 40 μ g

3. 結果

(1)細胞塊生成

リボソーム添加後1週間後の画像を図.24, 図.25に示す。画像下のリボソーム添加量は10, 20, 30, 40 μ gのなかで、その細胞株においての最も大きな細胞塊を形成したときのリボソーム添加量を示す。Li-7は直径数5~20 μ mの細胞塊を形成し、CCD-ICは直径10 μ mの細胞塊を形成した。細胞塊数はヒト肝臓癌細胞の方がウサギ腎集合管細胞よりも比較的多かった。細胞塊の形成度合いは細胞塊実験を行う研究者の実験技能も重要となっており、幾度か実験を繰り返してより多くの細胞塊の形成が可能となった。

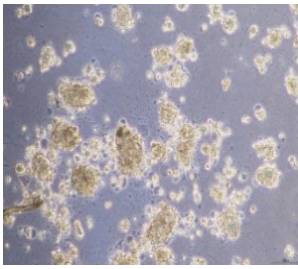


図.29 Li-7 60μg

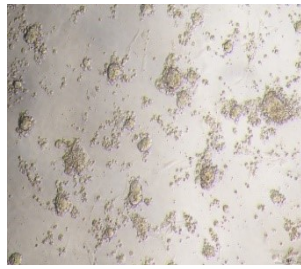


図.30 CCD-IC 60μg

(2)分化誘導・細胞染色

今回使用した未分化細胞を骨細胞(Osteoblast), 脂肪細胞(Fat cells), 軟骨細胞(Chondrocytes)に分化させる分化誘導液に Li-7, CCD-IC の細胞塊を加え, 分化誘導に成功して染色した結果を図.31,32,33 に示す. RC4 の骨・軟骨細胞, Li-7 の骨・脂肪細胞, CCD-IC の骨細胞が分化誘導にした.また, 図.34,35 は軟骨細胞への分化を施した細胞である. 図からわかるように, 細胞は分化せず, 黒くなって死滅してしまっている.

また, 今回使用した細胞と過去 3 年間使用した細胞を図.35 でまとめた. 枠で囲われている部分が分化誘導に成功している. 下図は左に分化誘導液の名称, 上に細胞株の名称を示している.

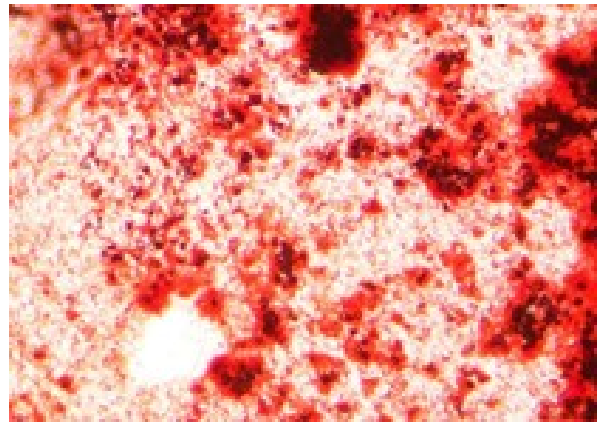


図.33 CCD-IC 骨細胞を OilRed に染色させた様子

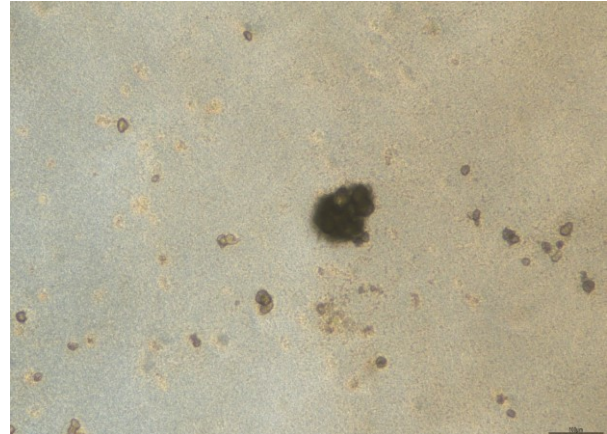


図.34 Li-7 の軟骨細胞への分化しなかった様子

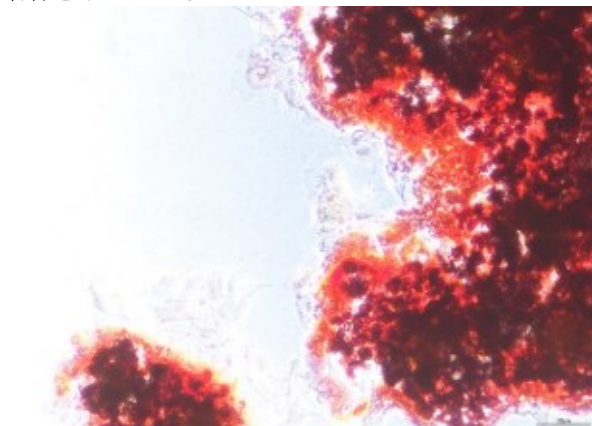


図.31 Li-7 骨細胞を OilRed に加え染色した様子

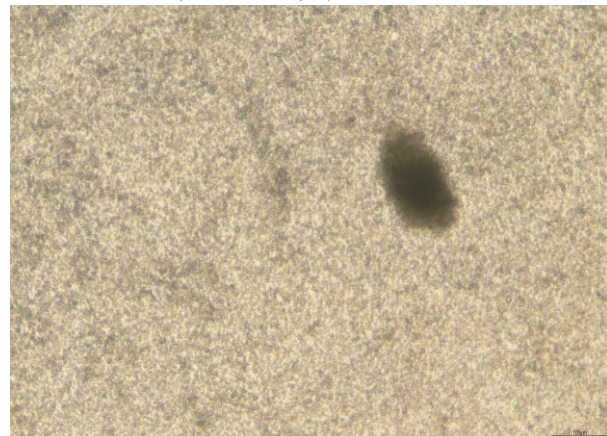


図.35 CCD-IC の軟骨細胞へ分化しなかった様子

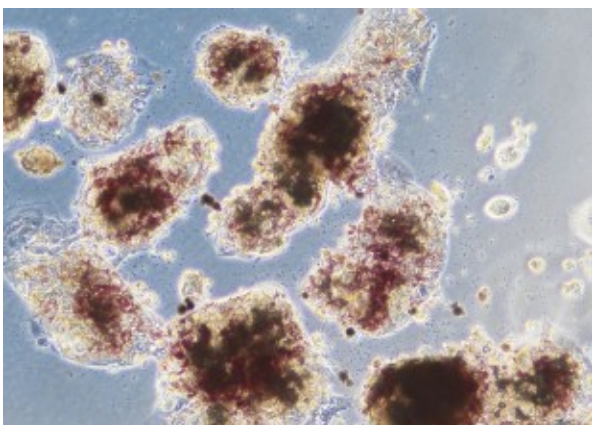


図.32 Li-7 脂肪細胞を Alizarin Red に染色させた様子

4. 考察

4年分の細胞ごとに条件を変えて細胞塊形成実験を行った研究を表(表.38)にまとめた。

1年目では1つの細胞で理化学研究所が指定している培地以外の幹細胞用の培地での研究,2年目は太田先生が人の細胞での研究をおこなっている,ヒトと様々な他の動物の細胞を比較した研究,3年目は2年生の細胞数が多く,△など細胞塊が形成できているかという精度があまり高くなかったため,再度同じ細胞で研究を行い,分化誘導も行った.今年の4年目では人と人に寄せたサル,先行研究で一度成功しているウサギを違う胚葉を用いて細胞塊形成実験を行った.今年はヒト肝臓癌由来細胞株と腎集合管由来細胞株だけでなく,ザル胎児脈絡膜網膜由来細胞株も細胞塊形成実験を行ったが,3.細胞数確認の段階で細胞塊が形成した.細胞内にリボソームを取り込んでいない状態でも細胞塊が形成したことから異例なため,研究では除外した。

表.38の説明として接着性(Yes=接着細胞...cellの底に細胞が付着している,No=浮遊細胞=cellの底に付着しておらず,細胞は浮遊している)はYes,Noどちらも細胞塊形成をした細胞が存在したことから関係はない.培地は各細胞ごとに理化学研究所の指定する培地で培養し,3年目まではIPS細胞と関連する培地でも培養した.リボソーム量(Ribo量)は最初0,10,20,30をそれぞれ加えて培養し,適量を加え,再度実験を行った。

表.36 三胚葉の各器官の分化

外胚葉	表皮 神経管	皮膚の表皮, 眼の水晶体・角膜, 鼻や口の表皮 眼の眼細胞・網膜・脊髄
中胚葉	脊索 体節 腎節 側板	退化する 脊椎骨, 骨格, 骨格筋, 皮膚の真皮 腎臓, 輸尿管 心臓, 内臓・血管の結合組織や筋組織
内胚葉	腸管	食道, 胃, 肝臓, すい臓, 気管・肺, 小腸, 大腸, ぼうこう

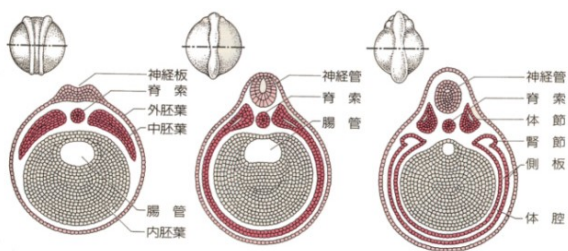


図.37 カエルの胚発生の様子

表.38 細胞塊形成の共通点

細胞の種類	接着性	三胚葉	培地	Ribo量	細胞塊
1期生 OLF-136 (medaka)	Yes	外胚葉	M199	3μt	×
			L-15	3	○
			mFSF	3	○
			L-15 A + 3		×
			L-15 SSR	3	×
2・3期生 LAH1(Frog)	Yes	中胚葉 (Mesoderm)	L-15	10,20,30, 40	×
			m-FSF	10,20,30, 40	×
				3,6,10,15	×
MDCK(Dog)	Yes	中胚葉	MEM	10,20,30, 40	×
			mFSF	10,20,30, 40	×
				3,6,10,15	×
CHL(Hamster)	Yes	内胚葉 (Endoderm)	MEM	10,20,30, 40	×
			SCM132	10,20,30, 40	×
				3,6,10,15	×
NBL-7(Mink)	Yes	内胚葉	MEM	10,20,30, 40	×
			SCM132	10,20,30, 40	×
				3,6,10,15	△
RC4(Rabbit)	Yes	外胚葉 (Ectoderm)	MEM	10,20,30, 40	○
			SCM132	10,20,30, 40	×
HL-60(Human)	No	内胚葉	RPMI1640	10,20,30, 40	×
			mFSF	10,20,30, 40	×
4期生(現在) Li-7(Human)	Yes	内胚葉	RPMI1640	0,10,20,30	○
CCD-IC (Rabbit)	Yes	中胚葉	DMEM	0,10,20,30	△
				15,20,25, 30	○
RF/6A (Monkey)	Yes	外胚葉	RPMI1640	—	○

(1) 細胞塊形成の条件

これまでの先行研究を含めて,

- ① 細胞塊形成に必要なリボソームの量は決まっている。
- ② 接着細胞は細胞塊を形成する可能性があるが,浮遊細胞は成功しない。
- ③ 胚葉による違いは見つからなかった。
- ④ RF/6A がリボソームをせずに細胞塊形成した特殊な例での細胞塊形成だったのは, CCD-IC, Li-7 にない細胞塊形成を促す物質を含んでいたからではないか。
- ⑤ 今回使用したリボソームは大腸菌由来のものだったので, それ以外の由来では結果がかえあるのではないかと考えた。

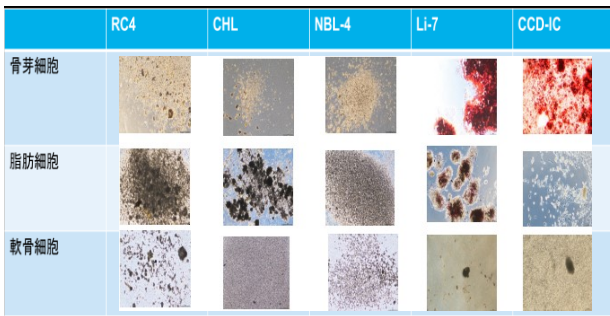


図.39 細胞染色の様子

(2) 分化誘導実験(図.31~35)

①Li-7 の脂肪細胞への分化は成功したが,CCD-IC の脂肪細胞への分化は失敗したことから,細胞によって分化する細胞の種類は違うと確認した.

②CCD-IC の脂肪細胞への分化が生存しているにもかかわらず,失敗したことから,分化実験後に細胞が生存していても分化しているとは限らないとわかった.

5. 結論

今回行った 3 つの細胞(RF/6A, CCD-IC, Li-7)全てで細胞塊の形成を確認した. 細胞塊形成に必要なリボソームの量は細胞ごとに決まっているが,1 つの細胞(RF/6A)は特殊な例での形成であった.分化誘導後の細胞の生死は分化には関係がなかった.CHL や NBL-4 はどの細胞へも分化せず,一番分化できた細胞は骨芽細胞だった.

6. 展望

これまでの研究を通して,以下のような疑問点が挙げられる.

- ・大腸菌由来以外のリボソームでも細胞塊を形成することが出来るのか
- ・細胞に対するリボソーム適量以外での細胞塊形成結果に影響があるのか
- ・タンパク質 X を構成するどの物質が細胞塊形成に関与しているのか
- ・分化誘導は外胚葉(骨芽細胞), 中胚葉(脂肪細胞), 内胚葉(軟骨細胞)の順にしやすいのではないか
- ・ザル胎児脈絡膜網膜由来細胞株で細胞塊形実験を行った時,細胞数確認のリボソームを取り込んでいない状態で細胞塊が形成したのか
- ・どの細胞も軟骨細胞には分化せずに死滅してしまうのか

これら細胞塊の形成や分化誘導実験の共通点を探るために更に実験のデータを増やしていこうと考えています.

7. 参考文献

- ・ Naofumi Ito & Kunimasa Ohta: Reprogramming of somatic cells by bacteria. *Develop.Growth Differ.*57,305-312(2015)
- ・ Kunimasa Ohta:Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria,* Vol25,No.1,13-17(2013)
- ・ akif2.tara.tsukuba.ac.jp/protocol_iweb/OilRedO.html
- ・ <http://www.fujita-hu.ac.jp/~stemcell/stemcell-page.html>
- ・ 細胞工学別冊 ゼロからはじめるバイオ実験マスターコース 〈1〉 実験の基本と原理

- ・ 細胞工学別冊 ゼロからはじめるバイオ実験マスターコース 〈3〉 細胞培養トレーニング
- 西方敬人/川上純司 学研メディカル秀潤社(2015/03)
- ・ 熊本県立宇土中学校・宇土高等学校第 5, 6 年次 SSH 課題研究論文集「リボソームによる多能性幹細胞の創造」P44-P49(2017)
- ・ 岩波生物学辞典 (第五版)

8. 謝辞

研究に関してご指導いただきました,熊本大学大学院生命科学研究部神経化学分野太田訓正准教授に感謝申し上げます. また,細胞株を提供して頂いた理化学研究所バイオリソースセンターにお礼申し上げます.

また,熊本大学北里柴三郎プロジェクト発表大会,英語によるポスターセッションの機会を提供していただいた第 5 2 回日本発生物学会年会委員会にこの場を借りてお礼申し上げます.

全体を通して,御指導をいただきました担当の後藤裕市先生,研究に関する助言をいただきました本校の生物の先生方に感謝申し上げます.

