

神経タンパクマーカを用いたマウス ES 細胞からの 神経細胞への分化機序に関する研究

神野 英毅 (応用分子化学科)

岩村 道子 (東邦大・理)

松本 宏治郎 (東邦大・薬)

1. はじめに

本年度は、再生医療に向けた研究テーマを取り入れ、ES 細胞や iPS 細胞の工学的利用を検討した。そのため、まず神経細胞への分化効率等を検討し、また、その際の神経細胞特異的なタンパク質の検出も試みたので報告する。

現代の医療現場において、人工臓器やドナーの提供による臓器移植などの再生医療技術の必要性が年々高まってきている。しかし、それらは絶対的な数の不足や、拒絶反応といった大きな問題を抱えている。そこで近年では ES 細胞 (胚性幹細胞) による目的細胞の獲得と移植による治療が、再生医療現場では大いに成果をあげる革命的な治療法に成るのではないかと期待されている。

ES 細胞とは胚盤胞期における受精卵から内部細胞塊を取り出し、特殊な条件において培養を行うと、未分化な状態を保ちつつ自己増殖をし続ける幹細胞である。また、その幹細胞という性質から多種多様な分化能を有し、内胚葉・中胚葉・外胚葉といった生体のほぼ全ての細胞に分化する能力を持っている細胞である。この ES 細胞を目的の細胞へと分化させ、機能を失った組織の回復を行う事や衰えた器官を再生する事が ES 細胞を利用した再生医療技術の目標であり、様々な国の様々な機関において研究が進められている期待の技術である。

本研究の目的である神経細胞への分化誘導だけでも多くの研究がなされているが、現在までに 100%の分化率が成された結果は得られていない。

しかし、医療現場での使用を視野に入れると、移植の際にこの純度が必要なのは明確である。何故なら、目的細胞以外が混入、あるいは増殖し続ける未分化な細胞が残っているのは腫瘍細胞に等しいからである。そこで本研究では単純に分化率の向上ではなく、よりクリーンかつ安全な分化誘導方法による神経細胞分化の検討を行った。

また、ES 細胞の倫理面・拒絶反応の 2 大問題を回避出来ることで近年注目を集めだした iPS 細胞においても同実験を行い、理論上同じ性質を持つ細胞であるこの両細胞における差異が見られるかどうかの比較検討を行った。

2. 実験方法

2.1 SDIA 法による神経分化誘導

本実験で使う ES 細胞はその特性上、実験環境により結果が大きく左右される細胞である。実験結果の比較検討のため、また手技的な経験を得る為に、笹井らの SDIA 法を参考にし、アレンジを加えた方法にて神経細胞への分化誘導実験を行った。12well plate 上に DMEM 培地を使用して PA6 細胞を 1×10^5 cells/well ずつ撒き、上清に浮いた死細胞を除くなど液替えをしながら、およそ 2~3 日かけてコンフルエントとした。この状態の well に ES 細胞(C3H/He mouse 由来 H-1 細胞)を同じく 1×10^5 cells/well ずつ撒いた。この際には LIF(Leukemia Inhibitory Factor)を除いた ESM 培地を用いた。また、神経細胞分化誘導因子として知られている RA(all-trans Retinoic Acid: レチノイン

酸)と神経細胞成長因子である basic-FGF を 12well の横 4 列、縦 3 列にそれぞれ濃度を振って添加した(縦横 1 列目の well はコントロールとして無添加である)。

2.2 ヒト由来因子による神経分化誘導

2.1 の実験を踏まえ、実験方法の検討を行った。SDIA 法では高い分化率を誇るものの、他動物種由来の細胞や血清の使用などの必要があるため、人体への再生医療材料として使用するには不安がある。これにより本実験の目的は、よりクリーンな神経細胞への分化誘導であり、着目した点は「フィーダー細胞の存在」「培地における血清」「神経細胞成長因子」である。それぞれの問題点と解決方法は以下の通りである。

2.2.1 無フィーダーへの逐次適応法

ES 細胞の培養を行う際にはマウスの線維芽細胞などをフィーダーとし、その上で ES 細胞を培養する方法が一般的である。これには種々の理由があるが、問題点として由来も種類も違う細胞同士の共培養である為、細菌の混入や感染のリスクもあり、人体への医療材料としての利用を視野に入れると ES 細胞のみでの純粋培養が望ましい。そこで細胞の環境適応性と馴化を利用した逐次適応法を用いて、ES 細胞(129 系マウス由来 D3 細胞)を 4 継代に渡って徐々にフィーダー細胞(C57 マウス由来 MEF)を除いた培養を行った。

2.2.2 無血清培養への逐次適応法

培地に混合する血清は細胞への栄養として不可欠であると同時に、ウシ由来の血清のためヒトの細胞に与えるリスクはゼロではない。また、血清は実験系の中で分化誘導因子を最も多く含んでいる事も大きな問題であった。invitrogen 社の KSR(Knockout Serum Replacement)を血清の代わりに培地に添加する方法により無血清培地を作製し、逐次適応法にて安定培養を行えるよう調整した。

2.2.3 RA(レチノイン酸)による神経細胞

ヒトの体内に存在する因子で神経細胞への分化が認められている RA を用いた分化誘導を試みた。RA を DMSO(Dimethyl Sulfoxide)に溶解し、濃度を $2.5 \times 10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, $2 \times 10^{-6}M$ の 4 種類に振り分けて培養を行った。

2.2.4 RT-PCR

分化誘導実験後の細胞を回収し、実際に神経細胞ができているかの確認を RT-PCR 法を用いて、神経細胞分化マーカータンパク質の RNA の発現により行った。神経細胞分化マーカーとして Nestin, TH, NSE, Tuj1 の 4 種類の検出を行った。また、未分化マーカーとして E-Cadherin と Sox2 を使用した。用いた Primer を Table 1 に示した。さらに増幅した遺伝子は、電気泳動により確認を行った。

Table 1 Primer Sequence for detection of Neuronal markers with PCR

Primre	Sequenze (5'-3')	Tm (°C)
Nestin(Forward)	GGTCACTGTCGCCGCTACTC	76.2
Nestin(Reverse)	CGGACGTGGAGCACTAGAGAA	66.6
NES (Forward)	TGATCTTGTCGTCGGACTGTGT	67.0
NES (Reverse)	CTTCGCCAGACGTTTCAGATCT	65.6
TH(Forward)	TGTTGGCTGACCGCACATT	67.8
TH (Reverse)	GCCCCAGAGATGCAAGTC	67.1
Tuj1(Forward)	GGTCTGGCGCCTTTGGA	67.6
Tuj1(Reverse)	CACCACTCTGACCAAAGATAAAGTTG	65.5
SOX2(Forward)	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	69.9
SOX2(Reverse)	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	66.3
E-Cadherin(Forward)	CCTTCCCCCAACACGTCCCCC	78.4
E-Cadherin(Reverse)	TCTCCACCTCCTTCTTCATC	60.8

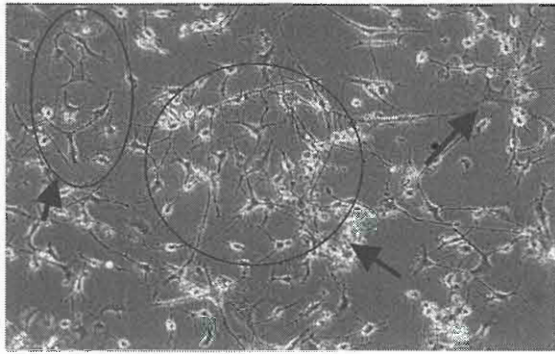


Fig. 1 SDIA 法による神経細胞分化
H-1 細胞 分化誘導 4 日目

3. 結果

3.1 SDIA 法による神経分化誘導

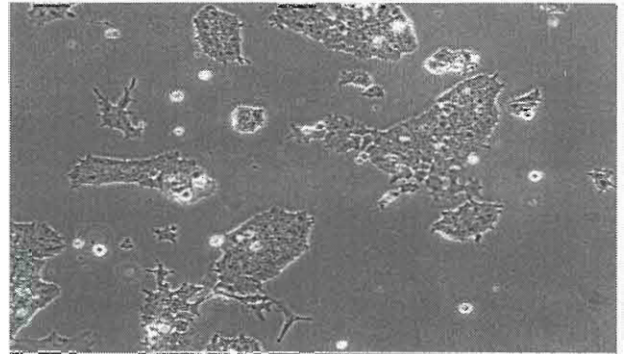
ES 細胞の培養開始時から 1 日目で約 90% の細胞が接着した。この状態液替えを行わずに培養を継続し、経過を観察したところ 2 日目から神経らしい樹状突起が現れ始め、およそ 4 日目でピークを迎え、5 日目以降では死滅期へと入った。どの well においても神経分化が見られたが、中でも 4 日目の RA 1.0 mM・b-FGF 1.0 mM 加えた well で神経細胞への分化が最も多く見られた (Fig. 1)。

3.2.1 無フィーダーでの培養

ES 細胞を培養する際にフィーダーを用いる理由として、接着培養を行い易くする為、細胞にかかる負担緩衝の為、コロニーを作りやすくする為などの意味を持つ。実際、フィーダー細胞を用いないでシャーレに直接 ES 細胞を培養すると底面へ接着せず浮遊した。その後経過を見ても、増殖よりも死滅していく細胞が目立った。フィーダーとして撒く細胞(MEF)の数を、半分ずつ減らして逐次培養法にて培養を行った結果、4 継代目より ES 細胞のみでの純粋培養に成功し、以後では安定した培養が可能となった。

3.2.2 無血清培地での培養

KSR(Knockout Serum Replacement)は ES 細胞培養において広く使われているが、FCS(Fetal Cow Serum)を 100%KSR に置き換えず、1:1 などで混合



D3 細胞 培養 2 日目

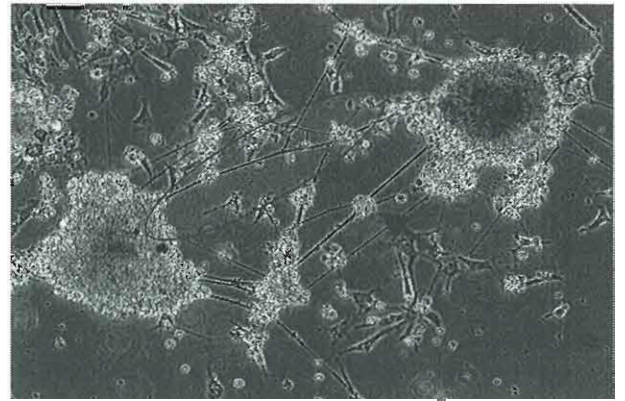


Fig. 3 RA による神経細胞分化

D3 細胞 分化誘導 7 日目

して使用する場合が多い。また、細胞バンクでは FCS を含んだ凍結液を使用しているため、FCS を用いず KSR のみでの培養を行うには、逐次培養法にて馴化する必要があった。液替えと継代のタイミングで培地に通常 20%混合する血清の割合を FCS と KSR を 100% : 0% , 75% : 25% , 50% : 50% , 25% : 75% , 0% : 100% と移行した所、その後の細胞培養には KSR のみ混合の培地においても安定した培養が可能となった (Fig. 2)。

3.2.3 RA(レチノイン酸)による神経分化

クリーンな培養条件から他細胞との混合培養を避けるという第一前提があるので、マウス頭蓋細胞由来の PA6 細胞を用いる事ができない為、必然的に SDIA 法が適用出来ない条件である。ヒトの体内に存在する因子という条件のもと RA を誘導因子として用い、ヒト由来 basic-FGF を成長因子として用いる方法とした。

無フィーダー、無血清培地での ES 細胞の培

養後、分化誘導因子を添加し、分化誘導培養開始からおよそ4日目で神経細胞らしい樹状突起が現れた。これらの突起はゆっくりと伸張を見せ、7日目でその数はピークに達し、8日目以降は死滅期に入った(Fig. 3)。

3.2.4 RT-PCR

3.2.3 で得られた細胞を用いて、RT-PCR 法による神経細胞への分化の確認を行った。□ RT-PCR 後に電気泳動を行った結果を Fig. 4 に示□ す。RT-PCR によって増幅させた部分の遺伝子すべてにおいてバンドが確認できた。よって、今回の分化誘導実験後において、成熟神経細胞、ドーパミン神経細胞、そして未分化細胞が共存して存在する事が確認出来た。これにより無フィーダー、無血清条件下であっても、RA と basic-FGF のみの□ 分化誘導条件で ES 細胞から神経細胞へ分化を誘導できることが証明された。

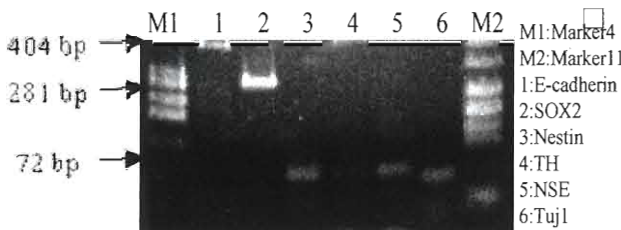


Fig. 4 RT-PCR 後の電気泳動

4. 考察

本実験手法は、SDIA 法に比べると、神経細胞へ分化するまでの日数も長くかかり、なおかつ分化率も著しく下がってしまう。しかし、再生医療の現場で使う事を視野に入れば、時間が多少かかってもクリーンな細胞を使用の方が有用であると考えられる。

しかし、この方法では分化選択性は低い為、目的細胞以外の細胞を選別する方法もより困難を極める事が予想出来る。再生医療材料として使う為の大きな課題の一つと言える。なお、無フィ

ーダー、無血清へのアプローチの方法は他にも、阻害剤を添加する方法などがあるが、今回、逐次培養法を選択した点として、クリーンな培養方法であることが前提にあったからである。手間のかかる作業ではあるが、細胞の環境適応能力は侮る事ができない。

5. 結論

本研究において下記のことが、明らかとなった。

- ES 細胞、iPS 細胞の神経分化接着培養において、培養約 3~4 日で共に樹状突起が見られた。この際、浮遊培養中に島状のコロニーを作製しておく効率的に神経細胞に分化したが、コロニーが小さいと分化率が下がることが分かった。

- RT-PCR 後にゲル電気泳動を行った結果、未分化細胞マーカーと神経細胞マーカーの両方でバンドが見られた。これにより神経細胞へ分化している細胞が存在することが確認できた。

- 今回行った培養方法の中で最も分化率が高く、クリーンな条件は、RA 濃度 0.5 μ M、bFGF 1 nM、KSR 5(v/v) %、FCS 5(v/v) %を含む培養液で培養した場合であった。

5. 参考文献

- 1) Kitani H, Atsumi T, Fukuta K : *Zoolog Sci*, 13, (1996), 865-871
- 2) Kawasaki H, Mizuseki K, Sasai Y : *Neuron*, 28, (2000), 31-40
- 3) Hanna J, Wernig M, Jaenisch R : *Science*, 318, (2007), 1879-1880
- 4) Kazutoshi Takahishi , Shinya Yamanaka : *Cell*, 126, (2006), 652-655
- 5) Shinya Yamanaka, et al. : *Cell*, 131, (2007), 861-872