

細胞培養基質表面特性の胚性幹(ES)細胞分化に対する影響

日大生産工 (院) ○山下 翔平

日大生産工 野呂 知加子

1. 諸言

最近、iPS 細胞を用いた再生医療が世界の話題となっている。再生医療とはヒトの臓器の機能低下や損傷を、幹細胞によって修復することを意味する。

再生医療には、iPS 細胞や ES 細胞などの万能細胞（未分化幹細胞）を用いる方法、各臓器に潜んでいる組織修復用の細胞（体性幹細胞）を活用する方法、いったん分化した細胞を培養により少し幹細胞寄りに戻して用いる方法（脱分化幹細胞）などがある。これらのいずれの場合でも、幹細胞は数が少ないので、通常は生体外での細胞培養により、幹細胞を増幅してから移植などに利用することが多い。

細胞は生体内では 3 次元的な構造をとっているが、培養皿の上では 2 次元的なストレスのかかる形態をとることになる。また培養時には、細胞が接着する基質の性質も、生体内とは異なるプラスチック等の人工物である。近年、細胞外基質が接着している細胞に対して、増殖・分化などのシグナルを与える役割を担っていることが明らかになっている。従って、再生医療に応用する細胞を培養する際には、細胞と基質の相互作用に着目し、元の幹細胞の形質を維持できるような条件を選ぶ必要がある。

本研究は、マウス ES 細胞 D3 株を用いて、細胞培養の際に用いる基質の表面特性の細胞形態や細胞分化に対する影響について、

分子レベルで検討することを目的とする。

ES 細胞とは、胚盤胞期の内部細胞塊から樹立された多能性と自己複製能を有する胚性幹細胞である。培養条件を調整することにより、すべての組織を構成できる多能性を持ち、LIF というタンパク質存在下では無限に増殖することも可能である。

また、マウス ES 細胞を神経細胞へと分化誘導するレチノイン酸を用いて、マウス ES 細胞を分化誘導した場合、基質の違いにより、未分化幹細胞がどの程度残るか？についても検討した。

2. 材料と方法

2.1 培養方法

マウス胚性幹 (ES) 細胞 D3 株(feeder free)

を、Corning® BioCoat™ Collagen Type Iおよび

Collagen Type IV, Fibronectin, Laminin,

Gelatin(Control)上に播種した。Laminin については、種類を変えて(Laminin-511, 521 Veritas 社等) 培養皿に塗布した。培養液は、DMEM+10%ノックアウト血清代替 KSR+5%牛胎児血清 FCS+1%PS+0.1%ES 細胞増殖因子 LIF+0.1%メルカプトエタノール 2-ME を使用した。分化誘導の実験では、ES 細胞増殖因子 LIF とメルカプトエタノールを加えずに、0.1%レチノイン酸と 0.1%DMSO を加えた。

Effects of the surface properties of culture substrates on the differentiation of embryonic stem (ES) cells

Shohei YAMASITA and Chikako YOSIDA-NORO

播種後 6 時間から 72 時間まで、細胞形態を顕微鏡観察した。

2.2 RT-PCR

72 時間後に回収した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。未分化マーカーとして Oct3/4, Nanog, Sox2、中胚葉分化マーカーとして Brachyury の遺伝子発現を調べた。

2.3 免疫染色

マウス ES 細胞の表面に発現する未分化マーカー糖鎖抗原である stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

3. 結果と考察

播種後 6 時間後から 72 時間後までの細胞形態について、基質による違いを観察した。播種後 1 日目には、少しずつ差が見え始め、3 日目には顕著な差が見られた。Collagen IV では、細胞が仮足を出して成長していた。Laminin 処理した培養皿では、細胞が培養皿へ接着するよりも、細胞同士が接着して凝集塊を形成した (Fig.1)。

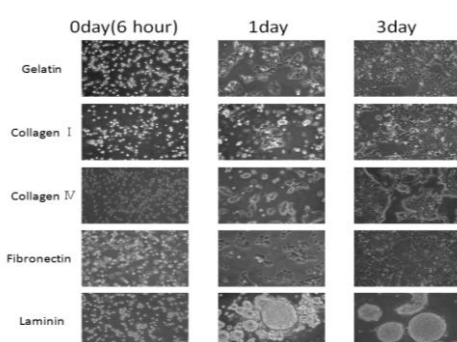


Fig. 1 培養3日目の細胞像

一方、RT-PCR の実験では、ES 細胞の未分化マーカーである Oct3/4, Nanog の発現は Collagen IV, Fibronectin, Laminin 処理皿では保持され、Collagen I および Gelatin (Control) 処理皿ではむしろ低下していた (Fig.2)。同じく未分化性の指標となる Sox2 の発現は、どの基質でも同程度であった。また、Laminin 処理皿では中胚葉マーカーで

ある Brachyury の発現が低下していた。

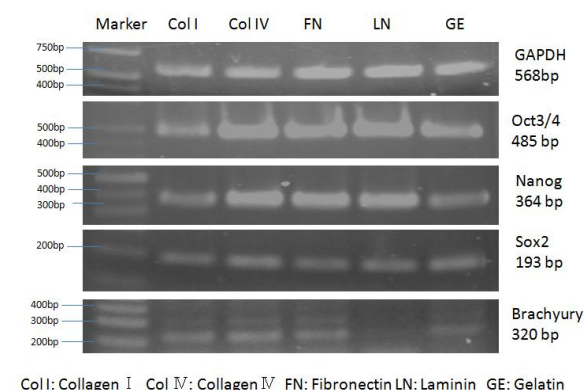


Fig. 2 ES 細胞の遺伝子発現

ES 細胞上の SSEA-1 抗原を、抗体と Alexa488 で可視化させ、蛍光顕微鏡観察により細胞未分化度の判定を行った。LIF を抜いても未分化細胞が多かったのは、市販の Laminin (-111) 処理培養皿上で (Fig. 3)、Laminin-511, 521 を塗布した皿上では、未分化細胞は少なかった (データ非表示)。

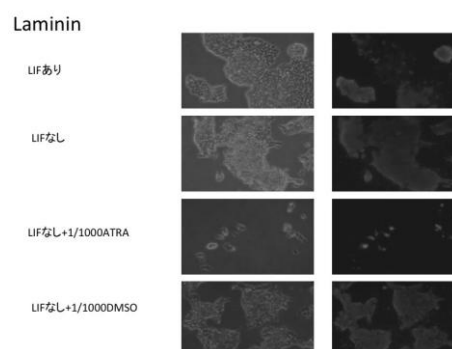


Fig. 3 Laminin 処理皿での SSEA-1 抗原発現

今後は、塗布の方法と Laminin の種類を変えてさらに検討し、また抗体を結合させた磁気ビーズ (FG-Beads 多摩川精機) を用いた幹細胞分離により、細胞外基質の違いによる未分化幹細胞数の定量比較を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Domogatskaya AM *et al.*, (2008) *STEM CELLS*, **26**, 2800–2809.
- 2) Hayashi Y *et al.*, (2007) *STEM CELLS*, **25**, 3005–3015.