

マウスES細胞の神経前駆体細胞への分化誘導および検定法の確立

日大生産工（院）照井 賢久

日大生産工 神野 英毅

【緒言】

人間の体は、事故や病気、様々な理由から損傷や機能不全に陥る可能性を持つ。近代医学では、これらの損傷や疾患に対して臓器移植や人工素材移植などの方法を用いて、失った機能を取り戻す試みが行われている。しかし、これらの方法では、臓器提供者の圧倒的な不足や、他人の細胞を用いることや人工的な非生体素材を用いることによる患者の体への負担や拒絶反応などといった問題があり、使いどころがとても難しい技術である。

それらの問題を解消すべく、近年、再生医療の分野において特に注目されているのが、ES細胞（胚性肝細胞）を用いた再生方法である。

この技術を用いた再生医療分野での治療が期待されている疾患として、動脈硬化症や肝硬変、糖尿病、心筋梗塞、パーキンソン病などが挙げられる。ここでは例としてパーキンソン病治療の方法を説明したい。パーキンソン病とは、神経伝達物質であるドーパミンが不足することにより引き起こる疾患であり、ふるえや歩行障害などが顕著に現れる。このドーパミンを生み出す部位が神経細胞であるが、この治療方法としてES細胞を必要な神経細胞へと分化させ、患者に移植することにより、再びドーパミンを正常に生み出させるという方法が期待されている。

ES細胞を用いた組織細胞への分化誘導に関する検討は、様々な種のES細胞を用いて行われ

ているが、目的の組織細胞を高頻度で効率的に得る方法は未だ確立されたとは言い難い。そこで本研究では目的細胞を神経細胞とし、マウスES細胞の培養方法の検討及び、マウスES細胞を用いた神経細胞への分化誘導を試みる。

【実験方法】

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)を培地に使い、25 cm²のTフラスコにフィーダー細胞としてマウス線維芽細胞であるBLFbをコンフルエントな状態まで培養を行う。その後、マイトマイシンCを滴下して増殖を止める。同じように、このTフラスコ上にマウスES細胞としてC3H/He mouse由来であるH-1細胞の培養を行う。この際、余計な分化が起こらぬよう、分化抑制剤としてLIF(Leukemia Inhibitory Factor)を加えたDMEMにて培養を行う。

H-1細胞がコンフルエントな状態になった後、75cm²のTフラスコへ継代を行い、神経細胞への分化誘導を試みる。この際、LIFが加わっていると分化を抑制してしまうので、LIFが入った培地が残らないよう洗浄を行う。

ES細胞の分化には、分化誘導因子が必要であるが、神経細胞への分化にはレチノイン酸が有効とされている。また、細胞同士がある程度のコロニーを作っていることが望ましく、その方法としてハンギングドロップ法などがあるが、本実験では平面接着培養法にて行う。レチノイ

Mechanism of the differentiation to the nerve
Cell of the mouse embryonic stem cell

Takahisa TERUI and Hideki KOHNO

ン酸を加えた DMEM を、H-1 細胞でコンフルエントとなっている 75cm²T フラスコに添加を行うと、およそ 3~4 日後に神経細胞の特徴である突起が確認できる。

【結果】

C3H/He mouse 由来 H-1 細胞をレチノイン酸添加培地での接着培養を開始してから 2 日後、神経細胞と思われる線状の突起が顕微鏡確認できた(Fig. 2)。しかし、その後もインキュベーター(CO₂5%, 37)内にて培養を続行したが、これより長く突起が伸びることはなく、6 日後にはフィーダー細胞と ES 細胞ともに全細胞が死滅してしまった。

これは、恐らく神経細胞を作りきるには ES 細胞のコロニー形成が不十分だった為と、栄養要求の高い ES 細胞に対し、観察を行う上であえて培地交換を行わなかったことが原因と考えられる。

【今後の予定】

本実験の目的は、再生医療での利用実現に向けた研究として同じ哺乳類であるマウスの ES 細胞を用い、そのマウス ES 細胞の神経細胞分化におけるメカニズムの解明を目的とするものである。それに向けた当面の目的は、神経細胞への分化効率を様々な環境下、細胞種によって探ることである。

今後では、例えば C57BL/6 mouse 由来 ES 細胞である B6fc-2 や B6 × CBA mouse 由来の TT2 といった H-1 細胞以外のマウス ES 細胞を用いた、あるいはレチノイン酸添加量の考察や、コロニー形成のためのハンギングドロップ法の導入など、他の方法を用いた分化誘導実験を進めてゆく。

【参考文献】

1) Kitani H, Takagi N, Atsumi T, Kawakura K, Imamura K, Goto S, Kusakabe M, Fukuta

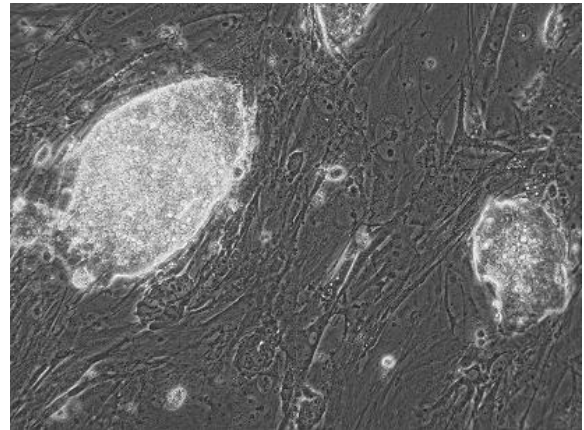


Fig. 1 C3H/He mouse 由来 H-1 細胞

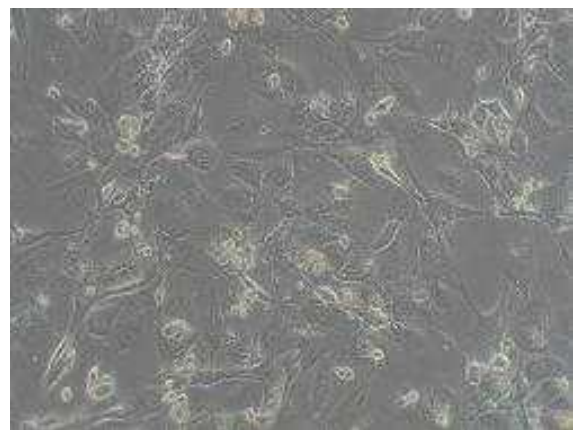


Fig. 2 レチノイン酸添加培地にて
培養 2 日後の H-1 細胞

K. "Isolation of a germline-transmissible embryonic stem (ES) cell line from C3H/He mice." 9107142[PubMed-indexed for MEDLINE] (1996)

2) Anzai H, Ikawa Y, Atsumi T. "Stem cell factor and interleukin-3 induce stepwise generation of erythroid precursor cells from a basic fibroblast growth factor-dependent hematopoietic stem cell line, A-6." 11352642 [PubMed-indexed for MEDLINE] (2001)

3) Shimizukawa R, Sakata A, Hirose M, Takahashi A, Iseki H, Liu Y, Kunita S, Sugiyama F, Ygami K. "Establishment of a new embryonic stem cell line derived from C57BL/6 mouse expressing EGFP ubiquitously." 15830376 [PubMed-indexed for MEDLINE] (2005)