

P1-31-3 体外成熟卵を用いた ntES 細胞の作出

山梨大

深澤宏子, 下地彩乃, 平田修司

【目的】体細胞の核を除核未受精卵に顕微注入する体細胞核移植 (SCNT) 技術を用いて作出される核移植胚由来の胚性幹細胞 (ntES 細胞) は, 受精卵由来の ES 細胞と同様の多分化能を有している。将来的には, 患者自身の体細胞を用いた ntES 細胞を樹立し, 失われた組織や臓器を再生して, 免疫拒絶のない移植医療への応用が期待される。しかしながら, ntES 細胞を樹立するにあたり, 相当数の未受精卵が必要であることが明らかとなっており, 将来的な ntES 細胞による再生医療のヒトへの臨床応用を展望した場合, 未受精卵の確保が大きな障壁となる。そこで, 本研究はマウスの卵巣から採取した未成熟卵を体外成熟 (IVM) させて SCNT を行い, IVM 卵由来の ntES 細胞の樹立の可能性を検討した。【方法】マウス卵巣から未成熟卵 (卵核胞期卵) を採取し, TaM 培地をベースにした培養液内で 17~24 時間体外成熟培養を行い成熟卵 (MII 卵) を作出した。得られた MII 卵を除核しさらに卵丘細胞核を移植して構築した核移植胚 (IVM 群) の初期発生をコントロール (Cont 群) と比較検討した。【成績】未成熟卵を体外成熟させた未受精卵を用いた体細胞核移植胚は, 胚盤胞まで発生し得たが, 胚盤胞到達率は IVM 群が (41/244) と Cont 群 (25/32, $p<0.001$) より有意に低かった。しかしながら, IVM 卵から得られた胚盤胞の内細胞塊から ntES 細胞を 5 系列樹立し得た。【結論】IVM 卵由来の核移植胚から, MII 卵由来のそれよりも率は低いものの, ntES 細胞を樹立し得ることが明らかとなった。将来的な未成熟卵を用いた ntES 細胞による再生医療の可能性が示された。

P1-31-4 胚発生および胚性幹 (ES) 細胞特性に果たす β -カテニンの機能解析慶應大¹, 国立成育医療研究センター研究所生殖・細胞医療研究部²奥村典子¹, 阿久津英憲², 浜谷敏生¹, 山田満穂¹, 菅原かな¹, 小川誠司¹, 梅澤明弘², 久慈直昭¹, 青木大輔¹, 吉村泰典¹

【目的】着床後胚発生に必須である β -カテニンは ES 細胞特性, 特に未分化能性維持に重要であると言われているが, その分子生物学的背景は未だ明らかでない。本研究では β -カテニン・ノックアウト (KO) 実験により β -カテニンの胚発生および ES 細胞特性への直接関与を明らかにする。【方法】コンディショナル KO 法を用いて β -カテニン-KO ES 細胞を樹立し, ES 細胞の 3 つの特性である 1) 未分化能性, 2) 多分化能性, 3) 自己複製能力について野生型 ES 細胞と比較した。1) は未分化特異遺伝子の蛍光免疫染色, RT-PCR 法および定量 PCR 法により, 2) は in vitro 解析として初期胚発生モデルである胚様体 (EB) を作製し, 三胚葉分化マーカーの免疫染色および定量 PCR 法を行った。in vivo 解析として奇形腫及びキメラ作出実験を行った。3) は増殖曲線を検討した。さらに, 4) プラスミドベクターを用いて β -カテニンの再導入実験も行った。【成績】1) β -カテニン-KO ES 細胞の未分化特異遺伝子発現は野生型と同等であった。2) EB の定量 PCR 法において, β -カテニン-KO ES 細胞では内胚葉および外胚葉分化は野生型と同等に認められたが, 中胚葉分化に障害が認められた。奇形腫およびキメラは得られなかった。3) 増殖能力は野生型と同等であった。4) β -カテニン再導入により EB および奇形腫において三胚葉への分化能が回復し, キメラ形成も確認された。【結論】 β -カテニンは ES 細胞の未分化能性に必須ではなく, 多分化能性に関与し, 特に発生に際し中胚葉分化に重要である。

P1-31-5 羊膜より樹立した HAM 細胞のドーパミン産生ニューロンへの分化誘導の検討

石渡産婦人科病院

玉川朝治, 石渡千恵子, 岡根夏美, 石渡 巖, 石渡恵美子, 佐藤智子, 時枝由布子, 石渡 勇

【目的】羊膜は未分化な状態である幹細胞が含まれていると考えられている。本学会で神経細胞への分化誘導に成功した事を報告した。今回はドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を試みた。【方法】ドーパミン産生ニューロンへの分化誘導は, 分化誘導培養液 I として 10%FBS, 2mM L-glutamine, 10ng/ml rhEGF, 10ng/ml rhFGF-2, 1xN2 supplement 含有 α MEM で 48 時間培養し, 分化誘導培養液 II である 2mM L-glutamine, 1xN2 supplement, 200 μ M butylated hydroxyanisole, 1mM N6, 2'-dibutyryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate, 0.5mM isobutyl-1-methyl-xanthine, 1 μ M all-trans-retinoic acid 含有 α MEM で 96 時間培養し, 神経細胞への分化誘導を行い, さらにドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を行うために, 分化誘導培養液 III として, 1% B27 supplement, 250ng/ml SHH, 100ng/ml FGF-8, 50ng/ml FGF-2 添加 neurobasal medium で 7 日間培養した。分化誘導の有無を調べるために, 23 種類のドーパミン産生ニューロン特異的マーカーの遺伝子解析と TH, DAT と神経細胞特異的マーカー Tuj1 の免疫染色を行った。【成績】分化誘導前から, 21 種類のドーパミン産生ニューロン特異的マーカー遺伝子の発現を確認出来たが, 分化誘導後は 23 種類全ての発現を確認した。また免疫染色の結果, 分化誘導後は TH と DAT とも陽性であり, Tuj1 は分化誘導に関わらず, 陽性であった。【結論】HAM 細胞のドーパミン産生ニューロンへの分化誘導が示された。羊膜細胞は再生医療の細胞ソースとして有効であると考えられる。