

2Ka10 E- カドヘリン遺伝子導入フィーダー細胞を用いたマウス ES 細胞の培養

○堀江 正信, 清原 武彦, 井藤 彰, 河邊 佳典, 上平 正道
(九大院・工・化工)

胚性幹 (ES) 細胞はほぼすべての体細胞へ分化することのできる多能性と、無限に増殖することのできる自己複製能を併せ持っており、再生医療における細胞源として、また胚発生や細胞の分化機構を解析するための有用なツールとして注目されている。マウスES細胞の多能性維持には特定のシグナルが必要であり、培養にはマウス胚性線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として、さらに白血病阻止因子 (LIF) を添加することで多能性を保持したまま増殖させることができる。しかし、MEFは初代培養細胞であり、増殖に限りがあるため、マウス胎児から適宜採取する必要があることから、取り扱いやすいフィーダー細胞であるとは言い難い。そこで、本研究では株化細胞として、マウスストローマ細胞株STO細胞およびマウス線維芽細胞株NIH3T3細胞に、細胞間接着因子であるE-カドヘリン遺伝子を導入・発現させ、これらをフィーダー細胞として用いることによって、ES細胞の未分化能を維持しながら培養することに成功したので報告する。

Culture of mouse embryonic stem cells using E-cadherin-expressing feeder cells.

○Masanobu HORIE, Takehiko KIYOHARA, Akira ITO, Yoshinori KAWABE, Masamichi KAMIHARA
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words E-cadherin, embryonic stem cell, feeder cell, cell culture

2Ka12 生理的グルコース濃度下で形成したマウスES細胞胚様体の分化的特徴

○望月 秀美, 黒澤 尋
(山梨大院・医工総合・生命)

【目的】ES細胞は、自己増殖する能力と様々な機能細胞に分化する能力があるため、再生医療や細胞治療のための細胞供給源として注目されている。試験管内で ES 細胞の分化誘導を行う場合、一般的に胚様体 (embryoid body; EB) の形成が行われるが、通常、このEBは高グルコース (25 mM) 培地で形成される。グルコースはES細胞の増殖と維持に使われるが、高グルコース培地がEB形成の際にも必要かどうかは示されていない。本研究では、生体内のグルコース濃度に近い低グルコース (5.5 mM) 培地を使用してEB形成を行い、グルコース濃度がEBの分化傾向に与える影響について検討した。

【方法】低細胞付着性の96-well plate (Lipidure, NOF Co.) に、初期細胞数 1000 cells/well となるようにマウスES細胞 (129SV) を播種し、EB形成を行った。培地は高グルコース培地 (DMEM-HG) と低グルコース培地 (DMEM-LG) を用意した。それぞれの培地で形成したEBについて、形態的分析及び遺伝子発現の解析を行った。

【結果】DMEM-HG で形成した EB は効率良く心筋へ分化するのに対して、DMEM-LG で形成した EB では心筋への分化が遅れた。リアルタイム RT-PCRによる解析の結果、DMEM-LGで形成したEBは、形成7日目においてもOct3/4、Nanog、Rex1といった未分化マーカーの発現がみられ、DMEM-HG培地で形成したEBに比べて未分化性を維持していた。すなわち、培養中のグルコース濃度が分化マーカー遺伝子の発現に影響を与えているということが示唆された。

Differentiation characteristics of embryoid bodies formed in medium with a physiological glucose concentration of 5.5 mM.

○Hidemi MOCHIZUKI, Hiroshi KUROSAWA
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words ES cell, embryoid body, physiological glucose concentration, differentiation

2Ka11 脊髄後根神経節培養上清液によるマウス胚性幹細胞からの筋肉細胞と神経細胞への分化

○原 優里菜¹, 北澤 彩子², 岩宮 貴弘¹, 清水 範夫^{1,2}
(¹東洋大院・生命科学,²東洋大・バイオナノ)

【目的】マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は多分化能を持ち、*in vitro* で様々な細胞に分化することから特定の細胞に効率良く分化誘導する方法が検討されている。本研究では、神経栄養因子である nerve growth factor(NGF) を添加して培養した脊髄後根神経節 (DRG) の培養上清液 (CM) を用いて、マウス ES 細胞が筋肉細胞と神経細胞にどのような割合で分化するかを検討した。

【方法】分化抑制因子である leukemia inhibitory factor(LIF)を含む培地でマウスES細胞を7日間培養し、ES細胞コロニーを形成させた。DRG-CMを添加したLIFを含まない培地でES細胞コロニーを12日間培養して分化させ、筋肉細胞と神経細胞に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーまたはフローサイトメーターを用いてそれぞれの細胞の分化の割合を測定した。

【結果】DRG-CM を 0 ~ 20% 濃度で添加して 12 日間培養した ES 細胞コロニーを免疫蛍光染色し、蛍光強度を測定した結果、筋肉細胞と神経細胞に分化誘導する最適添加濃度が異なった。次に、DRG-CM無添加条件とDRG-CM10%濃度添加条件で分化させたES細胞コロニーを免疫蛍光染色し、筋肉細胞及び神経細胞に分化した陽性細胞の割合を測定した。その結果、無添加条件よりもDRG-CM添加条件で分化したES細胞の方が筋肉細胞、神経細胞ともに高い割合で分化していたことから DRG-CM は筋肉細胞と神経細胞の両方に分化誘導する効果があることがわかった。

Proportion of muscle cells and neuronal cells differentiated from mouse embryonic stem cells using DRG conditioned medium

○Yurina HARA¹, Ayako KITAZAWA², Takahiro IWAMIYA¹, Norio SHIMIZU^{1,2}
(¹Grad.Sch.Life Sci.,Toyo Univ., ²Bio-nano,Toyo Univ.)

Key words ES cell, DRG conditioned medium, muscle cell, neuronal cell

2Ka13 マウスES細胞の胚様体分化に及ぼす培養面コート剤の影響

○大貫 喜嗣¹, 望月 秀美¹, 安藤 友子¹, 野田 朋澄², 中島 史雄², 黒澤 尋¹
(¹山梨大院・医工総合・生命,²日油 (株)・筑波研)

【目的】胚様体 (EB) 形成は、ES細胞を*in vitro* で分化誘導する際に広く行われている。EBは低細胞付着性を付与した培養容器内でES細胞を浮遊培養することによって得られる。培養容器を低細胞付着性とするためには、種々のコート剤が用いられている。本研究では、コート剤に被覆された培養面が、EBの分化状態にどのような影響を与えるのかを検討した。

【方法】2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンからなるリン脂質ポリマー (MPC)、負荷電基を有するリン脂質ポリマー ((-)MPC)、及び両親媒性界面活性剤であるPluronic F127 (Sigma) をコートしたポリスチレン製96-well丸底プレートでEB形成を行った (使用細胞: マウスES細胞 129/sv)。形成されたEBの遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRで解析するとともに、接着培養した場合の心筋の発生を調べた。負荷電量は段階的に変化させ、その影響についても検討した。

【結果及び考察】Pluronic F127コートでは、単一のEBを形成した割合が他のコート剤と比較して低かった。また、Pluronic F127コート上で形成したEBからの心筋発生率も有意に低かった。MPCと(-)MPCコート上で形成したEB間には、若干ではあるが分化状態に差がみられた。以上のことから、培養面に塗布されたコート剤が ES 細胞の分化に何らかの影響を及ぼしたと考えられた。しかし、負荷電量の違いによる影響は明瞭には現れなかった。

Effect of culture surfaces coated with low-cell-binding agents on the differentiation of embryoid bodies of mouse ES cells.

○Yoshitsugu OHNUKI¹, Hidemi MOCHIZUKI¹, Tomoko ANDO¹, Tomozumi NODA², Fumio NAKASHIMA², Hiroshi KUROSAWA¹
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, ²NOF Co.)

Key words ES cell, embryoid body, differentiation, coating agent