

D120

遺伝子導入フィーダー細胞による ES 細胞の増殖維持システムの開発

(九大院工・化工)○(学)堀江正信・(学)清原武彦・(正)井藤 彰・(正)河邊佳典・
(正)上平正道

1. 緒言

胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工的に作製した多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、主としてマウス胚性織維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として維持・培養されている。しかし MEF は、増殖に限りがあることや、取得の手間およびロット間による不均一性が問題になることがある。一方で、株化された細胞であるストローマ細胞株 STO もフィーダー細胞としてしばしば用いられているが、MEF と同等の性能を有していないことが問題となっている。そこで、本研究ではマウス織維芽細胞株 NIH3T3 細胞および STO 細胞に、遺伝子導入により人工的に E-カドヘリンを発現させることで、MEF と同等の能力を有するフィーダー細胞の樹立を行った。

2. 実験

発現ベクターとして pcDNA4 (インビトロジエン) に E-カドヘリン cDNA (理研ジーンバンク) を挿入し、リポフェクション法によって STO および NIH3T3 細胞に遺伝子導入を行った。導入後、ゼオシンによるスクリーニングを行い、安定的に E-カドヘリンを発現する細胞株 STO/E-cad および 3T3/E-cad を得た (Fig. 1)。これらの細胞をフィーダーとしてマウス ES 細胞を培養し、その未分化維持や分化能力をアルカリリフォスマターゼ (AP) 染色および未分化・分化マーカー遺伝子の RT-PCR により評価した。

3. 結果と考察

各フィーダー細胞上で 6 日間培養した ES 細胞の AP 染色により、STO/E-cad および 3T3/E-cad 細胞では MEF と同等の未分化能を維持していることが分かった (Fig. 2)。また、20 日間培養した ES 細胞の mRNA を抽出して RT-PCR により未分化マーカー遺伝子の発現を調べたところ STO/E-cad および 3T3/E-cad では MEF をフィー

ダーフィーダー細胞として用いた場合と同程度の発現を観察した。さらに STO/E-cad フィーダー細胞上で 30 日間培養した ES 細胞に対し、胚様体 (EB) を経た分化誘導を行い、11 日後に mRNA を抽出して RT-PCR によって各胚葉分化マーカー遺伝子の発現を解析したところ、MEF と同様に各マーカー遺伝子を発現しており、多能性の保持が確認された (Fig. 3)。また、in vivo での多分化能を確認するために 30 日間培養した ES 細胞をマウス大腿部に注射したところ、テラトーマを形成し、テラトーマの組織学的な検証により、全ての胚葉系組織に分化していることがわかった。これらの結果から、E-カドヘリン遺伝子を導入した STO および NIH3T3 の二つの細胞株は、フィーダー細胞としての高い能力を持つことが示された。

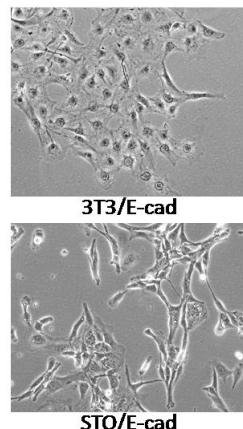


Fig. 1 樹立した細胞の
相差顕微鏡写真

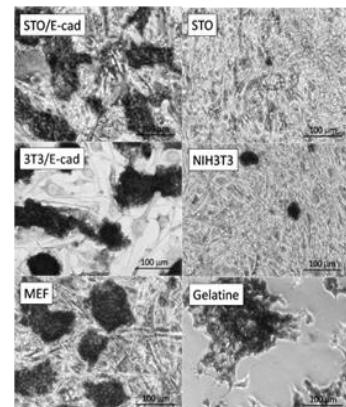


Fig. 2 各条件で培養した
ES 細胞の AP 染色

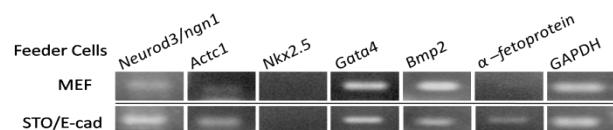


Fig. 3 各胚葉分化マーカー遺伝子の RT-PCR

*Tel: 092-802-2743, Fax: 092-802-2793

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp