

L11

バイオアクチュエータ開発を目指した筋芽細胞への IGF-I 遺伝子導入

(九大・工) ○ (学) 佐藤暢哲, (九大院工・化工) (正) 井藤 彰, (正) 河邊佳典,
(豊田中研) 藤田英明, (正) 長森英二, (九大院工・化工) (正) 上平正道

1. 緒言

筋肉のエネルギー変換効率は我々の身の回りにあるアクチュエータ(入力されたエネルギーを運動に変換する装置)と比較すると驚くべき高さである。現在、筋組織の特性を生かした新しいアクチュエータの開発が試みられており、石油資源に頼らず、食品残渣に含まれる糖質などのバイオマスの化学エネルギーを利用できる動力装置として期待されている。我々は、バイオアクチュエータの能力を向上させるために、筋芽細胞への有用遺伝子の導入を行っている。本研究では、筋芽細胞の増殖および筋分化が促進されると報告のある IGF-I 遺伝子を導入した筋芽細胞を作製した。

2. 実験方法

・細胞培養

マウス筋芽細胞株C2C12細胞は、増殖培地として Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) にウシ胎児血清を10%添加したものを使用し、分化誘導培地には仔牛血清を2%添加したものを使用した。

・目的遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターの作製

目的遺伝子であるマウス由来 IGF-I 遺伝子は、フナコシより購入した cDNA を鋳型にして PCR 法により増幅した。それを制限酵素により処理してレトロウイルス生産用プラスミド(pQMSCV/IRES-eGFP)に組み込み、293FT 細胞をウイルス生産用細胞として IGF-I と EGFP を共発現するレトロウイルスベクターを作製した。

・細胞増殖および分化の評価

細胞増殖は、細胞数をトリパンブルー色素排除法で計測することにより評価した。分化の評価として、細胞を抗 α アクチニン抗体(Sigma)で蛍光染色した。

3. 実験結果及び考察

レトロウイルスベクターを用いて、C2C12細胞に感染させることでIGF-I遺伝子導入C2C12細胞を得た。

まず、IGF-I遺伝子の細胞増殖への効果を調べるために、遺伝子導入を行ったC2C12細胞を1週間培養し、経時的に細胞数を計測した。その結果、IGF-I遺伝子導入C2C12細胞は、遺伝子導入を行わないコントロールのC2C12細胞と比べ、2日で約1.8倍、7日で約8倍、細胞数が多くなった (Fig. 1)。

次に、IGF-I 遺伝子導入 C2C12 細胞の分化誘導を行い、分化能が促進されるかについて調べた。IGF-I 遺伝子導入 C2C12 細胞はコントロール細胞と比較して

ほとんど分化しなかった。原因として、増殖時と分化時では IGF-I のシグナル経路が異なるという報告があり、構成的遺伝子発現では分化誘導を開始しても増殖のシグナルが活性化するため、分化できなくなっている可能性が考えられた。この仮説に対して、IGF-I で細胞を刺激するタイミングを、増殖時、分化誘導開始時および分化誘導3日後に設定し、IGF-I 遺伝子発現細胞の培養上清を用いた調整培地 (conditioned medium) を用いて調べたところ、細胞増殖時に添加した場合には細胞増殖速度が上昇したが、分化誘導時に添加した場合には分化誘導が抑制された。一方、分化誘導3日後に IGF-I 含有培養上清を添加したところ、筋管の肥大が観察された (Fig. 2)。これらのことから、IGF-I による筋芽細胞の増殖・分化の亢進には、IGF-I の作用するタイミングが重要であることが分かった。今後、IGF-I 遺伝子の発現制御に Tet-on システムによる誘導型発現システムを用いて、筋芽細胞の増殖・分化の増強と制御について検討していく予定である。

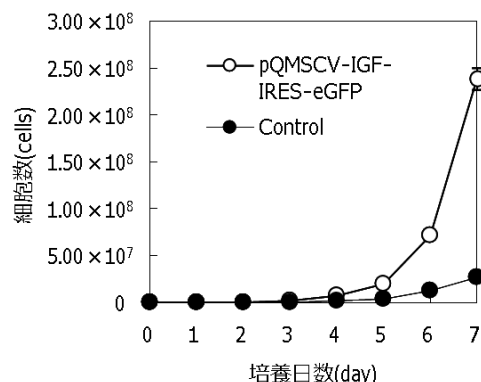


Fig. 1. IGF-I 遺伝子導入筋芽細胞の増殖

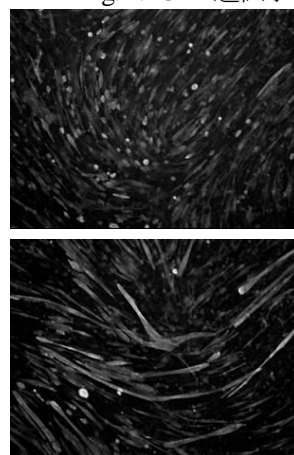


Fig.2. 抗 α アクチニン抗体による筋管の染色。(上) コントロール細胞の上清で培養した C2C12 細胞。(下) IGF-I 遺伝子導入細胞の上清で培養した C2C12 細胞。

*Tel: 092-802-2743, Fax: 092-802-2793.
e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp