



Characterization of Embryoid Bodies of Mouse Embryonic Stem Cells Formed under Various Culture Conditions and Estimation of Differentiation Status of Such Bodies

さまざまな培養条件下で形成したマウス ES 細胞胚様体の分化状態の特徴付け

(JBB, Vol.104, No.4, 294-299, 2007)

小池美紀子・榎 秀次郎・天野 義文・黒澤 尋*

胚性幹 (ES) 細胞は、胎盤を除くすべての細胞種に分化する能力を持つため、再生医療のための細胞供給源として注目されており、ES 細胞を *in vitro* で種々の分化細胞に誘導する研究が盛んに行われている。胚様体 (EB) の形成は、ES 細胞の分化を誘導する方法として広く用いられているにもかかわらず、これまで EB 形成法や形成条件に関する詳しい検討はなされておらず、また形成された EB の分化状態を品質管理の観点から評価した研究はほとんどなかった。我々は ES 細胞をベースとした再生医療を実用化するには、EB の品質 (分化状態) のコントロールが重要課題であると考え、分化状態が均一な EB を高い再現性で簡便に作製できる新規な EB 形成方法の開発に取り組んできた。その結果、リン脂質ポリマー (MPC, Lipidure®, NOF Co.) を塗布した細胞非接着性の丸底 96-well plate を用いる MPC plate 法を確立することに成功した。MPC plate 法は、従来法であるハンギング・ドロップ (HD) 法では不可能だった EB 形成培養中の顕微鏡観察および培地交換を可能にした。これによって、EB の状態を形態学的にも確認できるようになり、質的に均一な EB を効率的に形成させることが可能になった。さらに、播種細胞密度などの培養条件を意図的に変化させ、さまざまなタイプの EB を再現性よく形成することを可能にした。

ES 細胞から派生する各種細胞の分化効率は、中間段階で形成される EB の質に大きく影響を受ける。本研究ではさまざまな条件下で形成された EB の遺伝子発現パターンを解析し、その図式化を行った。これまで、EB において発現しているマーカー遺伝子 (mRNA) を定量的に分析した研究は多くあるが、EB の分化状態を特徴付けるのに適する遺伝子を取捨選択し、その発現量の相対的關係を図式化することによって、EB の分化状態を一見して把握できるようにした試みは、本研究が最初であると思われる。

本研究で注目した遺伝子は、未分化性のマーカーである Oct-3/4 と Rex-1、心筋特異的遺伝子の Nkx2.5 と α -MHC、内胚葉特異的遺伝子の TTR と AFP および一般的

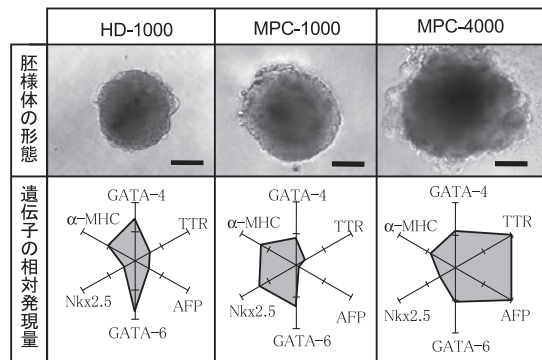


図1. さまざまな培養条件下で形成した胚様体の形態と遺伝子の相対発現量 (Scale bar: 200 μ m)

に ES 細胞の分化マーカーとして用いられている GATA4 と GATA6 である。さまざまな培養条件下で形成した EB における遺伝子の発現量を定量的に測定し、発現パターンをレーダーチャートとして図式化した (図1)。MPC plate 法で初期細胞数 1000 個から形成した EB (MPC-1000) は、心筋特異的遺伝子の Nkx2.5 と α -MHC が強く発現している、この EB からは拍動する心筋細胞が効率よく発生した。初期細胞数を 1000 から 4000 個に変化させただけで、MPC plate 法で形成された EB の遺伝子発現パターンが変化することが分かった。すなわち、4000 個から形成した EB (MPC-4000) では、Nkx2.5 と α -MHC よりも TTR と AFP の相対発現量が顕著に増大した。そして、この EB からは内臓卵黄嚢様構造が高效率で発生した。また、MPC plate 法で形成した EB は、従来法である HD 法で形成した EB とは異なる遺伝子発現パターンを持つことが分かった。

以上の結果は、EB 形成のための培養条件 (ES 細胞の初期細胞数および EB の形成方法) をコントロールすることにより、特定の分化状態にある EB を意図的、かつ安定的に作製可能であることを示している。本研究成果は、今後の ES 細胞の分化制御の研究や EB 生産の品質管理に貢献するものと期待される。

* 著者紹介 山梨大学大学院医学工学総合研究部生体環境医工学系 (准教授) E-mail: kurohiro@yamanashi.ac.jp