

ES細胞と金属

川瀬 雅也*・相川 博明

「金属」が生体内で重要な働きをすることがわかってきて久しい¹⁻³⁾。たとえば、生体レベルではFeがヘムの中心金属であり、酸素運搬に必須であることやZnが味覚の維持に関係すること、さらには、毒性の強いSeでさえセレノシステインというアミノ酸の構成元素になっていくつかのタンパク質の構成アミノ酸として貢献している。細胞レベルでみるとCaが細胞内での情報伝達に関与していたり、Znが転写因子に関係したりすることも分かっている。また、Vはインスリンレセプターに作用し、インスリン様の働きをすることも知られている。金属イオンがホルモンと同様の働きをすることは驚きであり、金属イオンには、まだ知られていない生理作用が隠されていることを示唆している。その他の金属についても多くの知見が得られてきており、これらの知見は、現在1冊の本にまとめられている⁴⁾。

しかし、これらの知見のほとんどは成熟した組織や細胞の中での知見であり、幼若な組織や細胞、とりわけ発生初期の細胞（ES細胞など）ではまだ、十分分かってきたとは言い難い状況である。本稿では、これまでに報告されている知見の中からES細胞の分化と金属の関係に関する知見と、ES細胞の培養初期状態における金属の動態に関して筆者らの行った分析結果を紹介し、幼若な細胞中での金属の役割について考えてみたい。

ES細胞のドーパミン産生ニューロンへの分化と金属

ドーパミン産生ニューロンの変異がパーキンソン病を引き起こすことがよく知られている。パーキンソン病の治療の一つとして、ドーパミン産生ニューロンを多く含む胎児中脳組織の移植が有効とされているが、量的な確保が難しいこと、倫理的な問題などから、胎児中脳組織に変わるドーパミン産生ニューロンの供給源が求められている。

そこで注目されたのがES細胞からドーパミン産生ニューロンを作り出し治療に用いるアイデアである⁵⁻⁸⁾。ES細胞はさまざまな細胞に分化することが知られており、多くの報告がなされている。その中でドーパミン産生ニューロンへの分化も報告されている⁸⁾。

この分化過程での金属動態に注目した研究が先ごろ杉本らにより報告された⁹⁾。杉本らは未分化なES細胞と分化誘導されたドーパミン産生ニューロンの細胞内の元素濃度をシンクロトン放射および電子線照射による蛍光X線分析より求め、さらに、これらの細胞内の金属原

子価をシンクロトン放射を用いてXANES (x-ray near edge structure) を測定し定めている。

元素濃度分析の結果、ドーパミン産生ニューロン中のFe/Cl比およびZn/Cl比が未分化ES細胞の5倍および10倍になり、分化誘導後に細胞内のFeおよびZn濃度の上昇を報告している。また、原子価分析により未分化ES細胞中ではFeの原子価は2価および3価であったのに対し、ドーパミン産生ニューロン中のFeはすべて2価であったとも報告されている。杉本らは、この結果を次のように解釈している。2価のFeはチロシン水酸化酵素の活性中心に存在する金属であり、ドーパミンの生合成に不可欠な酵素である。したがって、分化誘導後、このチロシン水酸化酵素が合成されるため、細胞内のFeがすべて2価となっているのであるとしている。また、Znについては、Znが細胞内のタンパク質の合成や分解に深くかかわっており (Zn-fingerタンパク質の一部として)、ES細胞が分化する際に必須の金属としている。

この研究は、ES細胞の分化を金属イオンという観点から眺めてみると、新しい知見が表れてくる可能性のあることを示唆していると思われる。

培養初期のES細胞中の金属含有量

杉本らの研究から分化誘導により、細胞内の金属含有量が大きく変化することが示された。ES細胞の未分化状態維持にはLIF (leukemia inhibitory factor) が不可欠であり、フィーダー細胞を用いない培養法¹⁰⁾もあるが一般的にはフィーダー細胞が使われている^{11,12)}。筆者らは、フィーダー細胞の影響も考慮した培養初期のES細胞中の金属動態について興味を持ち、分析を行ってみた (未発表)。

ES細胞としてはAGFES9細胞を用い、フィーダー細胞使用 (“ES+F”) および不使用 (“ES”) 条件下で培養を行った。“ES+F” では図1に示すような増殖を示した。細胞形態と細胞内金属イオン量に何らかの関係が見いだせることを期待して、培養50, 75, 90時間後にサンプリングし、細胞内の金属含有量を誘導結合プラズマ質量分析法 (inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS) により分析した。分析結果を表1に示した。

分析結果より、両培養条件ともに培養が進むに従い、細胞内の多くの金属イオンで、その含有量が減少していることが分かった。Mg²⁺については、細胞内含有量が培養時間の経過に伴い増加していた。Ca²⁺は“ES” 条件

*著者紹介 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 (教授) E-mail: m_kawase@nagahama-i-bio.ac.jp

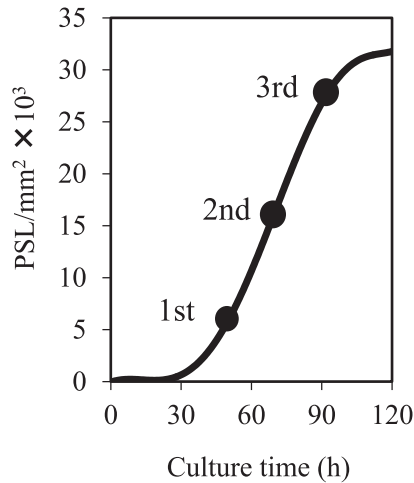


図1. ES細胞の増殖曲線. “ES+F” 培養条件における増殖曲線を示す. 細胞増殖は富士フィルムのLAS4000で測定したEGFP蛍光強度 (PSL/mm²) から求めた. サンプルング時間は図中に1st (50時間; 50h-sampling), 2nd (75時間; 75h-sampling), 3rd (90時間; 90h-sampling) として示している.

では他の多くの元素同様に培養経過とともに細胞内含有量は低下していったが, “ES+F” 条件では, ほぼ一定に保たれていた. また, Mn²⁺およびSe²⁺は両培養条件ともに, 培養初期に細胞内に多く蓄積され, その後, 急速に細胞内濃度が減少していた.

現在, このような現象がなぜ生じているかを調べており, まだ, 確定的な理由は分かっていないが, Mg²⁺については細胞増殖時に必要な働きをしているため, 常に必要とされているのではないかと予想している. フィーダー細胞を用いている場合にCa²⁺濃度が維持されている理由は, ES細胞とフィーダー細胞の間で何らかの情報やり取りがあり, その時にCa²⁺が関与しているためではないかと考えている. 以上は, まだ, 仮説に過ぎず, 今後, 検証し原因を明らかにしなければならないと考えている.

Mn²⁺およびSe²⁺についても同じく現在, 作業仮説を検討している段階である. Se²⁺は細胞内の抗酸化能と関係があり, 培養初期の酸化ストレスから細胞を保護するために必要とされるのではないかと考えられた. そこで, “ES+F” 条件で培養したES細胞内のSe関連酵素類 (グルタチオンペルオキシダーゼ類) およびメタロチオネイ

表1. 各サンプルング点における細胞内金属含有量の分析結果

Element	ES (/10 ⁴ cells)			ES + F (/10 ⁴ cells)		
	50h sampling	75h sampling	90h sampling	50h sampling	75h sampling	90h sampling
B (ng)	1.40	0.14	0.06	0.13	0.03	0.02
Na (mg)	19.68	3.25	1.89	15.13	2.74	1.37
Mg (ng)	7.58	37.87	40.81	10.30	9.85	44.39
Al (ng)	0.70	0.17	0.29	0.74	0.16	0.10
K (mg)	0.90	1.21	0.68	1.24	1.19	0.69
Ca (ng)	7.56	1.17	0.74	0.80	0.48	1.33
V (pg)	13.97	2.11	1.08	5.17	1.26	0.60
Cr (pg)	42.58	7.47	4.48	12.24	4.46	2.34
Mn (pg)	188.39	27.92	9.68	49.83	14.46	6.46
Fe (ng)	1.38	0.46	0.09	0.40	0.37	0.12
Co (pg)	11.50	1.37	0.37	0.00	0.00	0.00
Ni (ng)	1.38	0.24	0.03	0.00	0.00	0.00
Cu (ng)	0.10	0.02	0.04	0.00	0.00	0.00
Zn (ng)	0.80	0.81	0.43	1.04	0.74	0.45
As (pg)	0.00	0.87	0.00	0.00	0.00	0.00
Se (pg)	170.93	12.01	15.10	117.88	12.63	3.68
Mo (pg)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
Cd (pg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sn (pg)	3.22	0.00	0.00	0.00	0.28	0.00
I (pg)	58.42	9.67	3.10	0.00	0.00	0.28

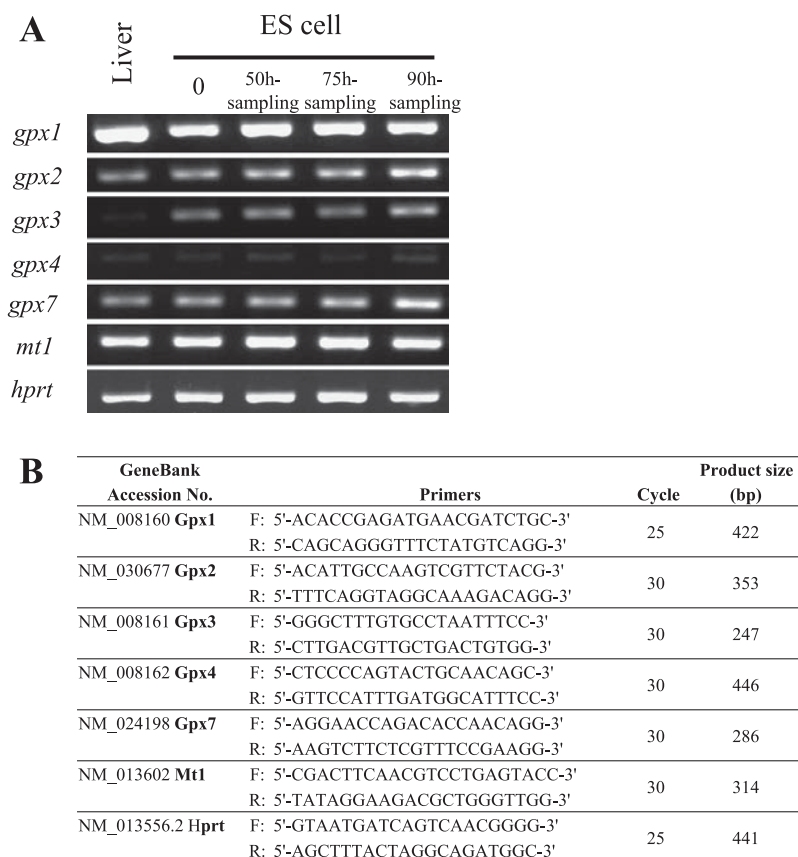


図2. RT-PCRによるSe関連タンパク質のmRNA発現の確認 (A) と用いたプライマー (B)

ンの遺伝子発現について調べた。結果を図2Aに示した。また、この時に用いたプライマーを図2Bに示した。

RT-PCRの結果より分かるように、ES細胞内のSe関連酵素類の遺伝子発現量は培養期間中に変化はなく、培養初期にSe²⁺が細胞内に蓄積されるのは、細胞の抗酸化能とは関連が薄いと考えられた。

Mn²⁺およびSe²⁺については、今後、細胞内での動態を説明するモデルの構築をめざし、検討を進めるつもりである。

また、細胞形態と金属動態との関連についても、今後さらに、詰めていく必要がある。

まとめ

今回は、ES細胞の分化と金属のかかわりに関する研究報告を紹介し、併せて、筆者らの行った分析結果も紹介した。ES細胞中での金属イオン、特に微量金属イオン、の役割や動態については、十分研究されているとは言い難い。今後、金属イオンに課する研究が進めば、ES細胞の基礎研究や応用研究上、有用な知見を与える可能性がある。ES細胞中の細胞内金属イオンの働きについては、研究が始まったばかりで、今後、多くの知見が集ま

り、さまざまな疑問に対する答えが報告されることが期待される。さらには、iPS細胞に関しても金属イオンに関する研究が必要であると感じている。

細胞内の金属イオンに関して研究が、細胞工学などの分野で新たなブレイクスルーを生み、また、進展することも期待している。

文 献

- 1) Sandstead, H. H.: *J. Lab. Clinic. Med.*, **124**, 322 (1994).
- 2) MacDonald, R. S.: *J. Nutr.*, **130**, 1500S (2000).
- 3) Cario, G. and Pietrangelo, A.: *Biochem. J.*, **352**, 241 (2000).
- 4) 桜井 弘: 生命元素事典, オーム社 (2008).
- 5) Hynes, M. *et al.*: *Neuron*, **28**, 11 (2000).
- 6) Kawasaki, H. *et al.*: *Neuron*, **28**, 31 (2000).
- 7) Morizane, A. *et al.*: *J. Neurosci. Res.*, **69**, 934 (2002).
- 8) Dunnet, S. B. *et al.*: *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 365 (2001).
- 9) Sugimoto, T. *et al.*: *Biomed. Res. Trace Elemnts*, **15**, 26 (2004).
- 10) Xu, C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 971 (2001).
- 11) Smith, A. G. *et al.*: *Nature*, **336**, 688 (1988).
- 12) Miyamoto, K. *et al.*: *Stem cells*, **22**, 433 (2004).