

1 1. ES 細胞はなぜコンパクトなコロニーを形成するのか

松木 考顕 (医学部医学科 6年)

指導教員

横田 崇 (医学系研究科 教授)

1. 背景

人を含めた哺乳類の発生はまず受精卵から始まる。受精卵は分裂を繰り返し、胚盤胞と呼ばれる段階で初めて異なる二つの細胞集団、栄養外胚葉と内部細胞塊に分かれる(図1)。栄養外胚葉は胎盤の形成に寄与し、体を構成する細胞・組織にはならない。一方、内部細胞塊は分化して、肝臓、消化管、心臓、肺など、体を構成する全ての細胞・組織を形成する。

ES 細胞とは、この内部細胞塊を培養し続けることにより樹立された細胞株である。ES 細胞は白血病阻止因子(LIF)の存在下では未分化な状態で増殖することができる。一方 LIF の非存在下では、様々な細胞に分化する。

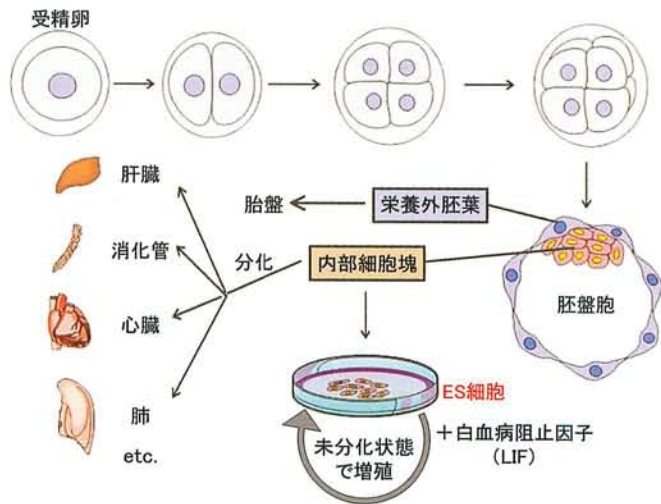


図1.ES 細胞とは何か

(再生医学と夢の再生医療(羊土社)から一部改変して引用)

1998 年、ヒトの ES 細胞が樹立されたことにより、ES 細胞を再生医療に応用できる可能性が出て

きた(図2)。具体的には、まず患者の体細胞から核を摘出する。この核を、あらかじめ核を取り除いた未受精卵に移植する。これにより、患者の核を持った未受精卵を作製できる。この未受精卵を胚盤胞まで培養し、その胚盤胞から内部細胞塊を採取して、ES 細胞を作製する。この一連の操作により、自己の遺伝子(ミトコンドリア遺伝子は未受精卵に由来)を持ったマイ ES 細胞を作製できる。そしてマイ ES 細胞を人為的に分

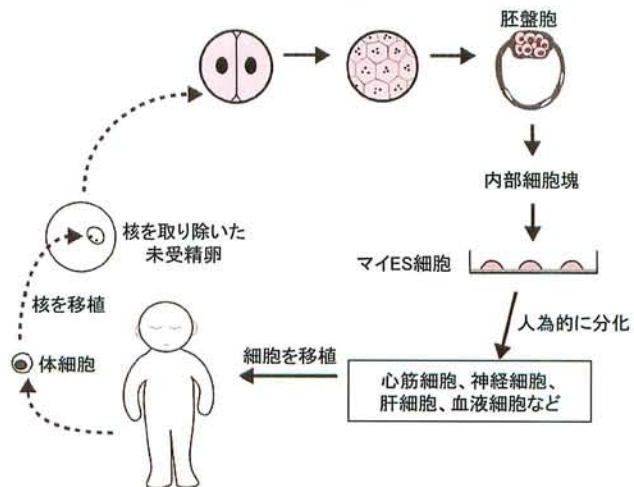


図2.ES 細胞の再生医療への応用

(再生医学がわかる(羊土社)から一部改変して引用)

化させ、作製した細胞を細胞移植などの方法により患者の体内に移植し機能させれば、病気により失われた機能が回復する可能性がある。理論的にはこのマイ ES 細胞から体を構成する全ての種類の細胞を作り出せる。また、こうして得られた細胞は、他人からの臓器提供による臓器移植で見られるような拒絶反応を起こす事もない。このように ES 細胞の再生医療への応用は大きな可能性がある。そしてその実現のための基盤技術の開発が求められている。

2. 研究目的

ES 細胞の大きな特徴として、多能性と自己複製能がある。多能性とは、個体を構成する全ての細胞に分化できる能力である。自己複製能とは、ES 細胞が白血病阻止因子(LIF)の存在下で、多能性を維持したまま分裂できる能力である。もう一つの ES 細胞の特徴として、ES 細胞を LIF の存在下で未分化性を維持して培養すると、細胞同士が密着し合った集塊、すなわちコンパクトなコロニーを形成する事が挙げられる。

一般的な培養細胞を培養すると、一層で平らに疎らに広がって増殖し、細胞同士は重積しない(図3)。

一方、ES 細胞は LIF の存在下で未分化性を維持して培養すると、細胞同士が密着し個々の細胞の輪郭が明瞭でなくなる程に、コンパクトなコロニーを形成する(図4)。

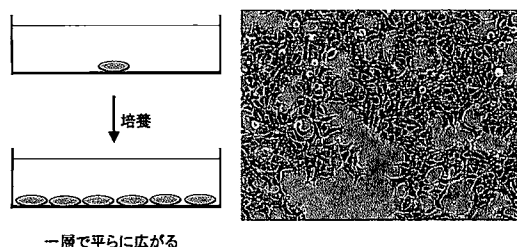


図3. 一般細胞の培養

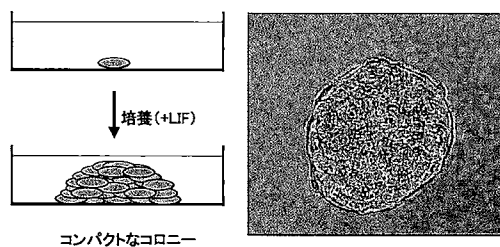


図4. ES 細胞の培養

興味深いことに、未分化状態の ES 細胞はコンパクトなコロニーを形成しているが、LIF を培地から除去して ES 細胞を分化させると、コンパクトなコロニーを形成し得なくなる(図5)。

そこで私は、ES 細胞はなぜコンパクトなコロニーを形成するのかという疑問を持ち、今回の研究を行った。「なぜ」というのには、二点ある。まず、如何なる機序により ES 細胞のコンパクトなコロニーが形成されるのか、次に、コンパクトなコロニーの形成が ES 細胞の未分化性の維持に必須なのか、という機序と意義の二点である。

E-cadherin と呼ばれる細胞同士を接着する分子が ES 細胞のコンパクトなコロニーを形成においても重要な役割を果たしているとの報告があった¹⁾。また、ES 細胞とは別の培養細胞(MCF-7、CHO)

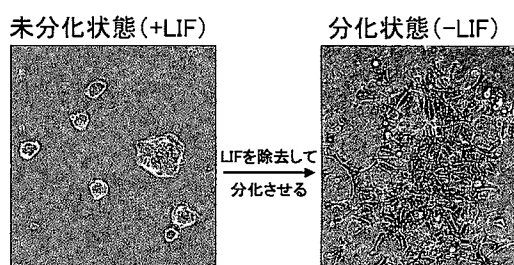


図5. LIF 非存在下における ES 細胞の培養

で、E-cadherin がリン酸化酵素 ROCK²⁾によって制御されているとの報告があった³⁾。このことから私は、ES 細胞における ROCK の機能の解析を中心に本研究を行った。

3. 材料と方法

①細胞培養

129/SvJ 系統マウス由来 ES 細胞である A3-1 細胞は、0.1%ゼラチン溶液でコートした培養皿上で ES 細胞用培地(ダルベッコ変法イーグル培地, 15%牛胎児血清, 2 mM glutamine, 1×non-essential amino acids, 1×nucleosides, 40 μM β-mercaptoethanol)に、マウス LIF 発現プラスミドを強制発現させたヒト胎児由来 HEK293 細胞の上清を 1/1000 希釈率で添加あるいは無添加にて培養した。細胞培養は 5% CO₂、37°Cの条件で行った。

②ROCK 活性の定量

ROCK の基質である MYPT1 を用いて細胞粗抽出液中の ROCK 活性を定量した。まず、個々の条件下で培養された ES 細胞を懸濁バッファーに懸濁し、遠心後、上清を回収して細胞粗抽出液とした。蛋白質濃度は Protein assay CBB 溶液を用いて決定し、蛋白質 2.5 μg 当たりを MYPT1 と 25°Cで 10 分間反応させ、反応液を 11.5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を 1%BSA でブロッキング後に、一次抗体として Anti-phospho-MYPT1(polyclonal)、二次抗体として Goat Anti-Rabbit IgG, HRP conjugate を用い、Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus にて蛍光させた。

③遺伝子導入効率

個々の培養条件下で、継代 1 日後に LipofectAMINE 2000 を用いて reporter vector を導入し、その後 2 日間培養された ES 細胞を懸濁バッファーに懸濁し、遠心後、上清を回収して細胞粗抽出液とした。Luciferase Assay System を用いて細胞粗抽出液中の luciferase 活性を測定した。蛋白質濃度は Protein assay CBB 溶液を用いて決定し、蛋白質 1 μg 当たりの luciferase 活性を算出した。

4. 研究結果と考察

①コンパクトなコロニーの形成の機序

E-cadherin と呼ばれる細胞同士を接着する分子が ES 細胞のコンパクトなコロニーの形成においても重要な役割を果たしているとの報告があった¹⁾。そこで E-cadherin に対する抗体を用い、E-cadherin の作用を阻害することで ES 細胞のコンパクトなコロニーが壊れることを確認した(図 6)。抗体 (Anti-Mouse E-cadherin(ECCD-1)(0.2mg/ml))を添加する前には ES

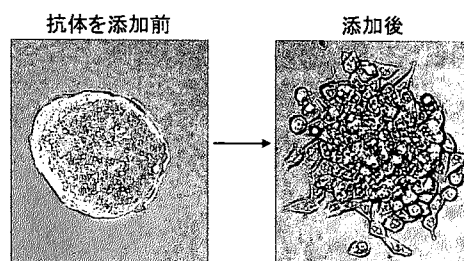


図6. 抗 E-cadherin 抗体の効果

細胞はコンパクトなコロニーを形成しているが、抗体を添加し24時間後には、コンパクトなコロニーが崩れ、細胞が拡散して増殖する。これにより、E-cadherin が ES 細胞のコンパクトなコロニーの形成に関与する事が確認できた。

次に、E-cadherin の活性の制御機構を調べた。ES 細胞とは別の培養細胞 (MCF-7、CHO) で、E-cadherin がリン酸化酵素 ROCK²⁾ や細胞骨格蛋白質 myosin2 によって制御されているとの報告があった³⁾。そこで、ES 細胞に ROCK や myosin2 の阻害剤を作用させることによりコンパクトなコロニーが崩れるかを調べた。すると、ROCK 阻害剤 (Y27632:30 μ M)⁴⁾、myosin2 阻害剤 (blebbistatin:30 μ M) の添加により、ES 細胞のコンパクトなコロニーが崩された (図7、図8)。これにより、ROCK や myosin2 が ES 細胞のコンパクトなコロニーの形成に関与していることが明らかとなった。

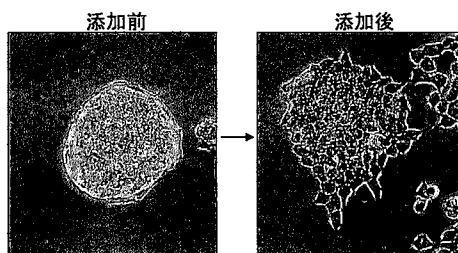


図7. ROCK 阻害剤(Y27632)の効果

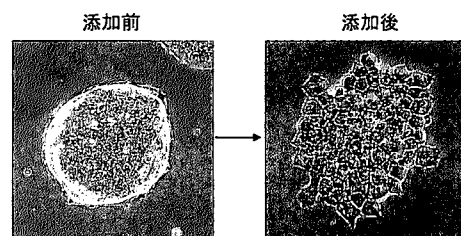


図8. myosin2 阻害剤(blebbistatin)の効果

以上の結果から、ES 細胞のコンパクトなコロニー形成には E-cadherin、ROCK、myosin2 が働いていることが判った。さらに LIF を除去すると ROCK 活性が低下するとの結果も得ている (図 9)。そこでこれらの結果から次のような仮説を考えた。ES 細胞においては、まず LIF が ROCK や myosin2 を活性化して、次に活性化された ROCK や myosin2 が E-cadherin の活性化を行うことによってコンパクトなコロニーを形成していると言う仮説である (図 10)。

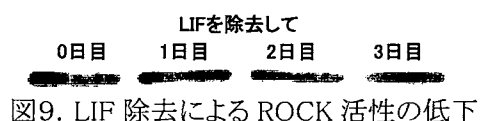


図9. LIF 除去による ROCK 活性の低下

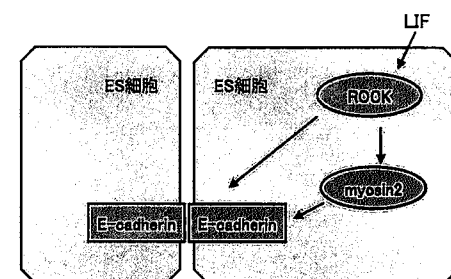


図 10. コンパクトなコロニーの形成機序

②コンパクトなコロニーの意義

次にコンパクトなコロニーの形成が ES 細胞の未分化性の維持に必須なのかという点について検討した。ROCK 阻害剤(Y27632)で ES 細胞を 18 日間培養後、ROCK 阻害剤を除去し 3 日間培養したところ、再びコンパクトなコロニーの形成が観察された (図 11)。このことは ROCK 阻害剤の作用が可逆的であることを示している。一旦分化した細胞は元の未分化な状態には原則的には戻れないので、この結果は ROCK を阻害してコンパクトなコロニーを壊しても ES 細胞は分化していなかったことを示している。つまり、コンパクトなコロニーの形成は ES 細胞の未分化性維持に必須ではないと思われる。

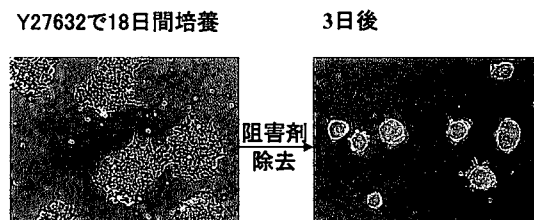


図 11. Y27632 の効果は可逆的である

③ROCK 阻害剤と再生医療

今回の研究から、ROCK 阻害剤によって ES 細胞を分化させずにコンパクトなコロニーを壊す事が可能であると判明した。ES 細胞はコンパクトなコロニーを形成するために、コロニーの中心部は培地と接する事ができず、薬剤などをコロニー中心部の細胞に作用させにくいという技術上の問題がある。逆に ES 細胞を一般の培養細胞のように二次元的に培養できるようになれば、遺伝子の導入効率などが上がると期待される。図 12 は、実際に ROCK 阻害剤 (Y27632) を作用させて ES 細胞を培養した方が、遺伝子導入効率が約 20% 上昇していることを示している。また、ヒト ES 細胞を ROCK 阻害剤 (Y27632) の存在下で培養すると、細胞死が抑制されてクローンの増殖効率が約 100 倍に上昇し、遺伝導入効率も飛躍的に簡便になるとの報告もあった⁵⁾。以上の事から、ROCK 阻害剤 (Y27632) は、ES 細胞を用いた再生医療において有用なツールとなる可能性をもっていると考えられる。

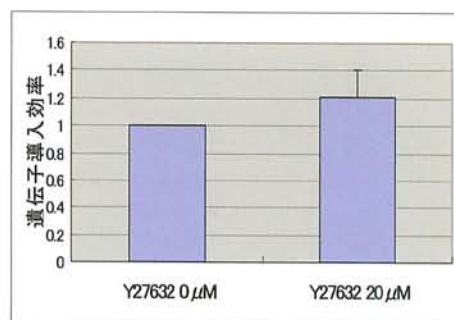


図 12. Y27632 添加による
遺伝子導入効率の上昇

5. 参考文献

- 1) Larue, L. et al. A role for cadherins in tissue formation. *Development* 122, 000-000 (1996)
- 2) Riento, K. & Ridley, A.J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446-456 (2003)
- 3) Annette, M. et al. Myosin 2 is a Key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell* 16, 4531-4542 (2005)
- 4) Ishizaki, T. et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* 57, 976-983 (2000)
- 5) Watanabe, K. et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotech.* 25, 681 - 686 (2007)