

論文内容要旨

Epidermal growth factor-immobilized surfaces for
the selective expansion of neural progenitor cells
derived from induced pluripotent stem cells
(iPS 細胞由来神経前駆細胞の選択的増殖に有効な
EGF-His 固定化基材の作製)

主指導教員：谷本 幸太郎教授
(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：加藤 功一教授
(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：加来 真人教授
(医系科学研究科 生体構造・機能修復学)

山内 優佳

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

神経前駆細胞(NPC)は、中枢神経系を構成するニューロン、グリア細胞、オリゴデンドロサイトに分化することが可能であるため、パーキンソン病やアルツハイマー病などの中枢神経疾患の再生療法にとって有効な細胞供給源であると考えられている。近年、人工多能性幹(iPS)細胞の樹立に伴い、iPS細胞由来NPCをパーキンソン病患者に移植する細胞療法に関して治験も開始された。このような細胞移植療法の実現には、高純度のNPCを短期間かつ大量に得るための方法が必要である。そこで本研究では、iPS細胞から分化誘導したNPCを効率的かつ高純度で得るための培養基材の設計を目的とした。とくに本研究では、上皮成長因子(EGF)がNPCの増殖を促進することに着目し、培養基材表面の分子設計を試みた。

実験1 EGF固定化基板の作製

EGFのC末端に6残基のhistidineを融合させたEGF-Hisを大腸菌発現系によって合成した。金を蒸着したガラスプレート表面に、11-mercapto-1-undecanol及び11-mercapto-1-undecanoic acidの混合溶液を用いて、末端にOH及びCOOHをもつ自己組織化単分子膜(SAM)を形成させた。その際、2種類のアルカンチオールの変換比を変化させることで、OH及びCOOHの表面密度を制御した。これらの混合SAM表面上にN-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid及びNiSO₄を介してEGF-Hisを固定化し、培養基板を得た。

Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce)を用いて、固定化されたEGF-Hisの表面密度を測定した結果、COOHの表面密度に関わらず0.40~0.55 µg/cm²のEGF-Hisが固定化されたことがわかった。しかしながら、非特異的に吸着したEGF-Hisの表面密度はCOOH含有率50%の基板において最も少なかった。この結果を踏まえ、その後の実験においてはCOOH含有率50%の基板を使用した。

実験2 iPS細胞からNPCへの分化誘導

NPCはマウスiPS細胞からニューロスフェア培養によって誘導した。未分化維持培養したiPS細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17)を単個細胞に分散させた後、表面の親水化によって細胞付着性を低減させたディッシュに播種し、5 µg/mLヘパリン、2% B27、20 ng/mL EGF、20 ng/mL 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、および10 nM レチノイン酸を添加したDMEM/F-12培地を用いてニューロスフェア培養を行った。培養は6日間行い、直径100~200 µmの細胞凝集体(ニューロスフェア)を形成させた。得られた細胞凝集体を分散させ、再度、同様の条件でニューロスフェア培養を行った。

細胞の凝集と分散を4回繰り返した結果、nanogプロモーター領域の下流に導入されたGFPの発現は、2継代目以降完全に消失し、細胞の分化誘導が進行したものと考えられた。細胞の増殖率は継代ごとに低下した。また、NPCマーカー等の発現を定量PCR法により分析した結果、nestin及びEGFレセプター(EGFR)の発現量は継代を繰り返すことで増加し、3継代目で最大となった。この結果は、継代を繰り返すことでNPCの含有率が上昇したことを示唆する。さら

に、フローサイトメトリーによる分析の結果、総細胞の 23.2%の細胞に EGFR の発現することが明らかとなった。以上の実験結果を踏まえ、3 継代目の細胞を以下に述べる EGF-His 固定化基材の評価に用いた。

実験 3 EGF-His 固定化基材の評価

3 継代目の NPC を EGF-His 固定化基板上で培養した。EGF-His 固定化基板に NPC を播種した結果、一部の細胞が接着した。それらの細胞は神経突起を伸展しながら増殖し、NPC に特徴的な 2 次元細胞ネットワークを形成した。一方、比較として用いた市販組織培養用ポリスチレン培養皿には NPC の接着が認められなかった。これらの結果は、EGF-His 固定化表面への細胞接着が EGF-EGFR 間相互作用に基づくことを示唆する。

EGF-His 固定化基材上で培養した細胞の増殖率を測定した結果、第 3 世代のニューロスフェア形成細胞と同等の増殖能をもつことがわかった。また、基材上で培養した細胞は、新たな EGF-His 固定化基材を用いて 4 回継代することが可能であった。蛍光免疫染色の結果、1 継代目では 99.2%の細胞で NPC マーカーである nestin の発現が認められ、4 継代目においても nestin 発現細胞率は 98.8%と高かった。

以上のように、EGFR を発現する NPC は、基材表面に固定化された EGF-His との相互作用を介して、基材上に選択的に捕捉され、その後、EGFR の活性化により NPC の増殖が促進されるものと考えられる。よって、EGF-His 固定化基材は、iPS 細胞由来 NPC の効率的な増殖に有効であると結論する。