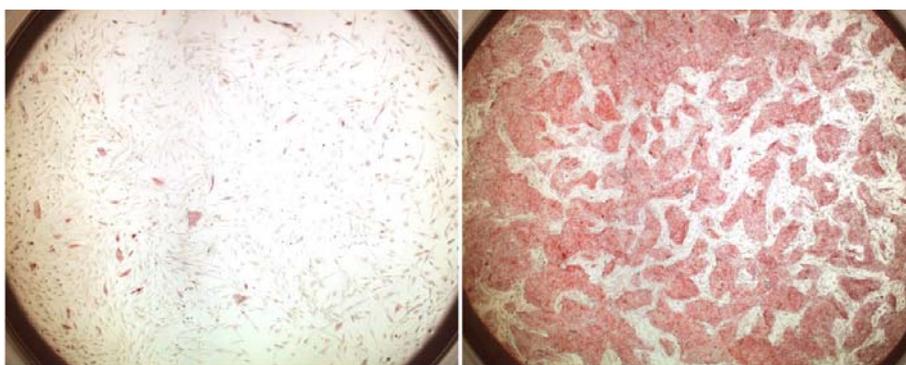


## ヒト ES 細胞の大量培養や大脳細胞産生が可能に

平成 19 年 5 月 28 日

高い自己複製能と多分化能を併せ持つ胚性幹細胞（ES 細胞）は、医学応用の観点から大きな注目を浴びている。ES 細胞を試験管内で培養して増やし、さらに有用細胞へと分化させ、創薬研究や毒性検査、移植医療に利用しようというシナリオだ。既にマウスなどの動物 ES 細胞では大量培養が可能となり、分化誘導の研究も進んでいる。しかし、ヒト ES 細胞はその培養過程で容易に細胞死を起すため、細胞数が著しく損なわれてしまうという実用面での根本的な問題を抱えていた。

理研 CDB の渡辺毅一研究員（細胞分化・器官発生研究グループ、笹井芳樹グループディレクター）らは、ヒト ES 細胞を培養した際に起こる細胞死が、Rho キナーゼ（ROCK）の活性化によって引き起こされていることを発見した。ROCK の阻害により細胞死は大きく抑制され、培養効率が飛躍的に向上することが明らかとなり、ヒト ES 細胞の大量培養への道が拓かれた。さらに、これまで難しかったヒト ES 細胞への遺伝子導入や、分散浮遊培養による大脳細胞分化が可能になるなど、複数の技術的ブレイクスルーをもたらした。この研究は上野盛夫客員研究員（国立長寿医療センター病院）らとの共同研究で、米国の科学誌 *Nature Biotechnology* に 5 月 27 日付けでオンライン先行発表された。なお、渡辺毅一氏は現在、カリフォルニア工科大学の研究員。この研究は文部科学省のリーディングプロジェクト「再生医療の実現化プロジェクト」の一環として進められた。



ROCK 阻害剤添加によるヒト ES 細胞生存率の劇的な上昇：分散植え継ぎ後、ROCK 阻害剤無しでは約 99%の細胞が死滅する（左）のに対し、ROCK 阻害剤を培養液に添加すると、細胞死は強く抑制され、単一細胞由来のコロニーが多数生じた（右）。

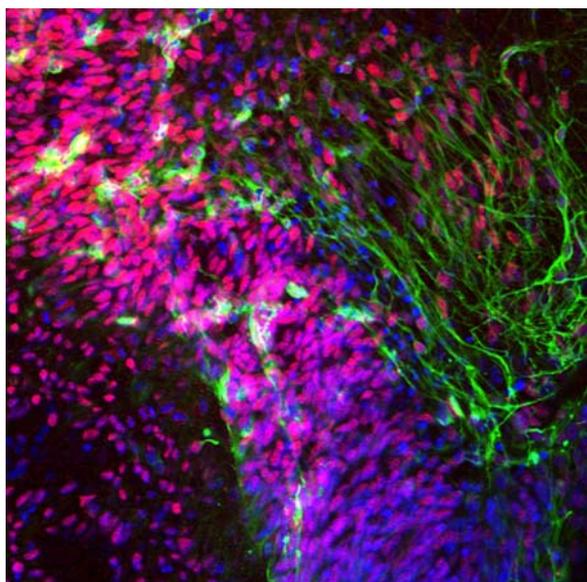
笹井グループディレクターらはこれまでに、マウスやサルの ES 細胞から神経系や感覚器系の細胞など、医学的価値の高い多くの有用細胞を分化させることに成功してきた。さらに、これらの技術をヒト ES 細胞へ順次応用し、昨年にはヒト ES 細胞から、パーキンソン病治療への応用が期待されるドーパミン神経細胞を産生することに成功している。ところが、医学利用のため

にヒト ES 細胞を培養・分化誘導するには、大きな技術的障壁が立ちはだかっていた。ヒト ES 細胞は非常にストレスに弱く、通常の培養操作でも容易に細胞死を起こしてしまう。例えば、細胞をシャーレからシャーレに植え継ぐ際には、酵素処理によって細胞一つ一つを解離させる「分散培養」が必要となる。しかしヒト ES 細胞では、この分散培養をすると 99%の細胞が 2 日以内に死滅してしまうため、非効率で特殊な培養技術を使う必要があった。渡辺研究員らはこの問題を解決し、ヒト ES 細胞の医学応用を大きく促進する技術開発を目指してきた。

彼らは今回、運動神経細胞など一部の特殊な細胞死に関わることが示唆される Rho キナーゼ(ROCK)に注目して研究を進めた。まず、ヒト ES 細胞における ROCK の機能を調べたところ、細胞同士をバラバラにして分散培養すると、直ぐに Rho タンパク質の活性化とそれに続く ROCK の活性化が起こることが判明した。そこで、ROCK の選択的阻害剤である Y-27632 を加えて培養したところ、ヒト ES 細胞の分散による細胞死が強く抑制され、単一細胞からのコロニー形成率が約 30 倍に上昇することがわかった。また、ROCK 阻害剤の投与がヒト ES 細胞の多能性と自己複製能に影響を与えないことや、分散培養以外の培養方法においてもヒト ES 細胞の生存・増殖を促進することが示された。

彼らはまた、ROCK 阻害剤の投与によりヒト ES 細胞への遺伝子導入が飛躍的に簡便になったことも示している。ヒト ES 細胞では、ゲノムへの外来遺伝子の導入効率は一般的に 0.1%以下と非常に低く、多くの未導入細胞から導入細胞を選別するためには、分散培養によるコロニー形成が必須だった。しかし、前述のように分散培養では細胞死が頻発するため、遺伝子導入細胞を得るには大量の培養が必要だった。今回の ROCK 阻害剤による細胞死の抑制により、遺伝子改変細胞の作成を 10cm シャーレ 1 枚程度で十分行うことが可能になった。

さらに、今回の方法を用いてヒト ES 細胞から大脳皮質細胞を高効率に産生することにも成功している。笹井グループディレクターらはこれまでに、マウス ES 細胞から大脳神経前駆細胞を効率的に産生する方法を開発していた。しかし、その方法は細胞分散や浮遊培養のステップを含むために、そのままヒト ES 細胞に適用することは出来なかった。そこで今回、この培養系に ROCK 阻害剤を添加して細胞死を抑制したところ、分散および浮遊培養にもかかわらず生存率は向上し、さらに 3 つの細胞外シグナル (Wnt、Nodal、BMP) の阻害因子を加えると、培養開始 35 日後には 33%の細胞が大脳神経前駆細胞または大脳神経細胞に分化した。これらの大脳細胞の多くは大脳皮質の前駆細胞であることも明らかとなった。また、培養系にソニックヘッジホグと呼ばれるシグナル因子を加えると、大脳基底核の神経細胞も産生できることが判明した。



ROCK 阻害剤を応用したヒト ES 細胞からの大脳細胞の産生：ROCK 阻害剤を培養液に添加すると、分散・浮遊培養にもかかわらず生存率は大きく上昇し、培養開始 35 日後には 3~4 割の細胞が大脳前駆細胞 (Bf1 マーカー陽性) に分化した。(Bf1: 赤、TuJ: 緑、DAPI: 青)

今回の研究成果は、ROCK 阻害剤の添加という比較的単純な方法によって、ヒト ES 細胞の生存率を飛躍的に向上させた点で画期的といえる。これにより、ヒト ES 細胞の培養がマウス ES 細胞の培養並に容易になったため、1) 遺伝子導入が現実的なレベルで可能になる、2) マウス ES 細胞での分化誘導技術を早期にヒト ES 細胞に応用できる、3) 単一細胞からのコロニー形成によって細胞の品質管理が容易になるなど、もたらされた実用面での効果は計り知れない。笹井グループディレクターは、「今回開発した手法を基盤にして、他機関との共同研究を効率的に進め、ヒト ES 細胞の医学利用の実現化に向けた開発をさらに加速させていきたい。同時に、なぜヒト ES だけが高頻度に細胞死を起こすのか、なぜヒト ES では一般的な細胞死因子とは異なる ROCK が機能しているのかなど、基礎面からの研究も進めてきたい」と話す。