

iPS細胞を分化させて作製した神経細胞の成熟度の指標化

Analyzing the Time Course of Differentiation and Maturation of iPS Cells into Nerve Cells Induced by NGF
(Nerve Growth Factor)

川口英夫* 太田昌子**

1. はじめに

2006年に山中伸弥教授らによってiPS細胞 (induced Pluripotent Stem cells: 人工多能性幹細胞) が開発された。iPS細胞ではES細胞 (Embryonic Stem cells: 胚性幹細胞) が本質的に有する倫理的な問題を回避できるため、再生医療の現実性が急速に高まり、iPS細胞から分化誘導した細胞を用いた検討が世界的に進められている。日本でも最近、ヒトiPS細胞から分化誘導した神経細胞の前駆細胞を加齢黄斑変性の患者に移植し、網膜を再生させる臨床試験が始まっている。

一方、従来多くの論文では、iPS細胞から分化神経細胞を作製する場合、神経細胞特有のタンパクの発現を免疫染色法で確認することで分化神経細胞を作製したと結論づけていた。しかしながら、神経細胞の本質的な役割は、電気的な信号を出力し、受け取って情報処理をすることである。そのため、分化神経細胞の電気的特性を電気生理的に測定し解析することが必要である。我々は、予備的な検討の結果、『神経細胞特有なタンパク (β III-tubulin) が発現する時期 (培養1週間) と電気的な神経信号を出す時期 (培養4週間) は異なり、後者がかなり遅れる』ことを見出した。すなわち、分化神経細胞の電気生理的な『成熟』には時間がかかることが分かった。しかるに、分化神経細胞の電気的特性を測定することは、大掛かりな計測システムと職人芸的なスキルが必要である。そこで本研究は、分化神経細胞が電気的な機能を発現することを簡便に把握できる評価法、すなわち『成熟』の簡便な評価法を提案することを目的とした。

2. 方法

2. 1 培養および免疫染色

上記の通り、電気生理計測技術は一般的ではない。そこで、細胞を培養している研究室で普及している実験手法である免疫染色法を用いて、『iPS細胞由来の分化神経細胞の成熟度』が評価できる指標を探索する。具体的には、分化神経細胞が形態変化する際 (培養1週間) で発現する細胞骨格タンパクである β III-tubulin (いわゆる神経突起を形成するタンパク)、その後に発現すると考えられる核タンパクであるNeuNを対象として検討を進めた。

本研究では、iPS細胞を分化誘導するために、NGF (Nerve Growth Factor: 神経成長因子) をiPS細胞の分化培地に10 ng/mLの濃度で添加した。

分化神経細胞を成熟させるには長期間培養すれば良いのは自明だが、培養日数が2週間 (14日間) を超えると細胞が傷んで生存率が落ちることが分かっている。したがって、培養神経細胞に関する成熟度の指標を見出すとともに、分化神経細胞の長期培養方法あるいは早く成熟させる培養法の開発が同時に必要であるため、この点も検討を進める。

2. 2 電気生理計測

神経機能すなわち神経細胞の電気活動を、微小ガラス電極を用いた、いわゆる電気生理学的計測法の一つであるパッチクランプ法 (ホールセルクランプ法: Whole-cell clamp method) で解析する。本研究では、成熟した神経細胞が発生する活動電位を記録することを目指した。なお、パッチクランプ法を用いると、活動電位だけでなく、後シナプス電位や活動電位の発火特性を計測することも可能であり、神経機能の獲得過程を評価できると考えられる。

*生命科学部 生命科学科

**食環境科学部 食環境科学科

iPS 細胞を分化させて作製した神経細胞の成熟度の指標化

Analyzing the Time Course of Differentiation and Maturation of iPS Cells into Nerve Cells Induced by NGF (Nerve Growth Factor)

川口英夫 太田昌子

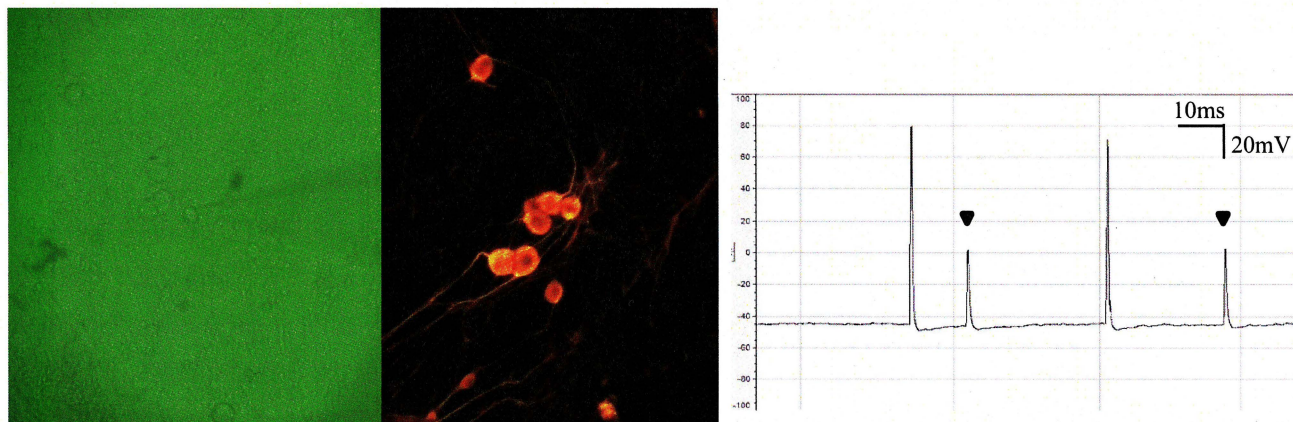


図1 (左) 微小電極を用いたホールセルクランプの例
 (中) ホールセルクランプした DRG 細胞の β III-tubulin による免疫染色結果
 (右) 活動電位 (自発発火: \blacktriangledown) の記録例 (無印は外部印加による膜電位変化)

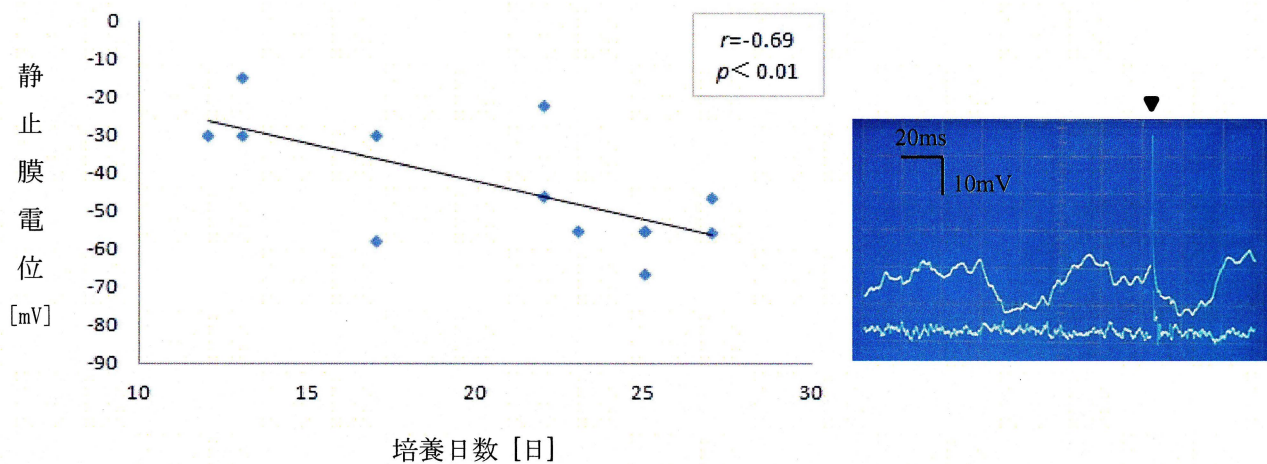


図2 (左) 分化誘導した iPS 細胞の培養日数による静止膜電位の変化
 (右) 活動電位 (自発発火: \blacktriangledown) の記録例 (上: 膜電位変化、下: 膜電流変化)

3. 結果と考察

我々はまず、マウス生体から摘出したDRG (Dorsal Root Ganglion : 後根神経節) 細胞を培養し、この培養神経細胞から電気生理学的手法 (ホールセルクランプ法) を用いて活動電位が記録できるか検討した。その結果、図1 (左) (中) に示す培養11日目のDRG細胞を対象として、活動電位 (自発発火) を記録することができた (図1 (右) 参照)。

そこで、iPS細胞から分化誘導した神経細胞について、ホールセルクランプ法を用いた実験を実施した。その結果、図2 (左) に示す通り、27日間分化培養を続けることでようやく一般的な神経細胞の静止膜電位である-60 mV程度になる結果を得た。培養開始27日目の細胞の膜電位変化を記録した時、図2 (右) に示す活動電位 (自発発火) が観測できた。これより、iPS細胞から分化誘導した神経細胞は、自発発火が発生するまで成熟するのに、4週間程度の培養期間が必要であることが明らかとなった。

さらに、iPS細胞と生体から摘出した感覚神経細胞の共培養系で、抗 β -III tubulin抗体と運動神経細胞マーカーである抗Lim-3抗体を用いてiPS細胞由来の分化神経細胞を2重染色した。その結果、 β III-tubulinは培養1週間以内に発現したが、培養を4週間続けてもLim-3の発現は見られなかった。すなわち、分化神経細胞は1週間以内に形態的には神経細胞様になるが、分化・成熟した神経細胞になるためには4週間以上かかると考えられた。

次に、培養を主に研究している研究室で一般的な実験手法であるRT-PCR法と蛍光免疫染色法を用いて、『培養神経細胞の培養日数による成熟度の変化』を検討した。まず、図3に示す通り、NeuNタンパクのmRNAの発現についてRT-PCR法で検討した。その結果、培養開始12日目に一過性の発現量の増加がみられることが分かった。一方、NeuNタンパクの発現量については、図4に示す

通り、培養開始21日目まで発現量が増加し、その後一定となることが分かった。以上より、NeuNタンパクについては、mRNAの一過性の発現後、培養開始3週間以降に核タンパクとして発現量が維持されることが分かった。なお、前述の通り、 β III-tubulinタンパクが培養開始1週間以内に発現することも蛍光免疫染色法で確認している。

4. まとめ

本研究により、神経細胞に特有な核タンパクであるNeuNについて、iPS細胞から分化誘導した神経細胞においても、自発発火が観測できる培養3週間以降に安定に発現していることが判明した。したがって、このNeuNタンパクを指標として『成熟度』をモニタできる可能性が示された。

今後、神経活動に必須であるNa⁺ channelタンパクの発現量変化と一致するか検討を進める。さらに、半透膜 (セルカルチャーインサート) を用いて異種の細胞を分離した状態で共培養できる方法を用いることで、iPS細胞と生体から摘出した初代培養細胞を共存させる共培養系を対象に、早く成熟させる培養技術の確立を検討したい。

4. 参考文献

- 1) Yashiro Y and Kawaguchi H, Effect on differentiation and maturation of iPS cells by co-culturing with primary cultured neurons derived from mice, *IUPUI (Indiana University, Padue University, Indianapolis) International Scientific Exchange Symposium*, Nov 22 (2015)

iPS 細胞を分化させて作製した神経細胞の成熟度の指標化

Analyzing the Time Course of Differentiation and Maturation of iPS Cells into Nerve Cells Induced by NGF (Nerve Growth Factor)

川口英夫 太田昌子

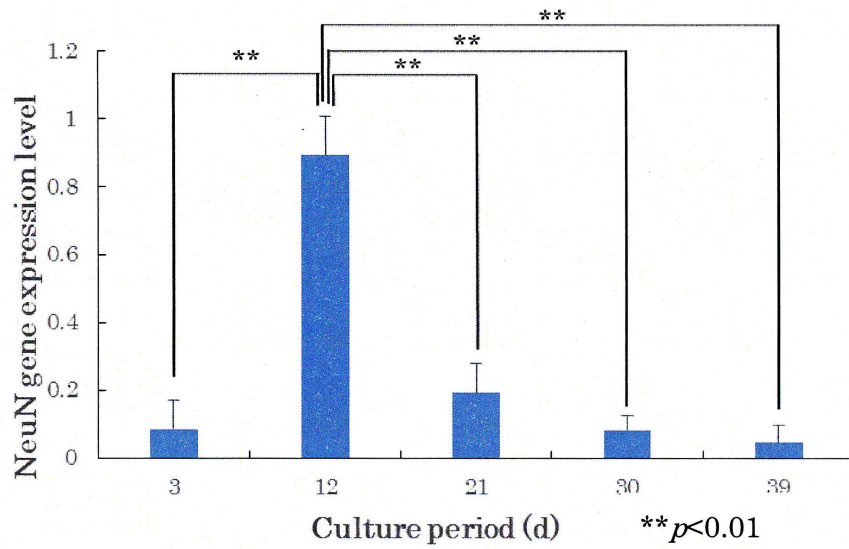


図3 培養日数による NeuN タンパクの mRNA の発現変化

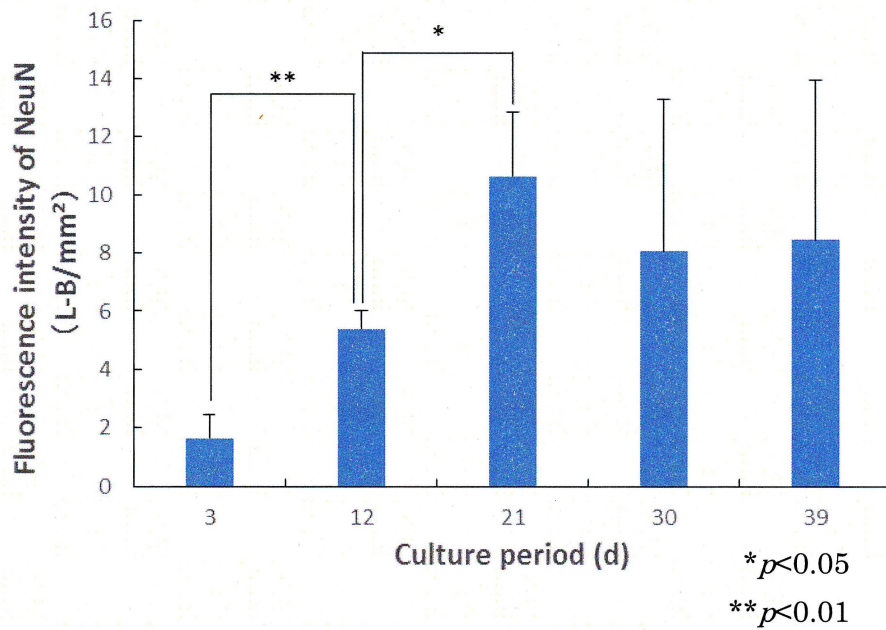


図4 培養日数による NeuN タンパクの発現量変化