

胚幹細胞のフィーダー非依存性無血清培養システムの確立  
Establishment of feeder- and serum-free culture system of  
embryonic stem cells

研究代表者 大阪大学大学院医学系研究科分子防御医学講座分子病態・  
栄養制御 助手 丹羽 仁史  
Hitoshi Niwa, Dept. of Nutrition and Physiological Chemistry,  
Osaka University Medical School

Embryonic stem cells is regarded as a powerful tool for gene-manipulation in mouse, but their proper growth with keeping pluripotency is highly depend on both the culture condition and their genetic origin. To override these problems, we are investigating to establish a new culture system without the feeder layer of mouse embryonic fibroblast cells and the fetal calf serum. Our result will also be important for therapeutic application of human ES cells to regenerative medicine.

1. 研究目的

胚幹細胞 (embryonic stem cells : ES細胞) を用いたジーンターゲット法による遺伝子改変動物の作製技術は、いまや個体レベルでの遺伝子機能の解析に、欠かすことの出来ない重要な技術となっている。しかし、この方法の爆発的な普及に伴い、さらなる改良の必要性も次第に明らかになってきた。最大の問題は、現在使用されているES細胞のほとんどすべては、129系統という特殊な純系マウスに由来するが、このマウスは行動異常を含む種々の奇妙な遺伝的背景を有しており、時に変異マウスの表現形の解析の支障となる、という点である。これまでに、ごく少数の、他の純系マウスに由来するES細胞を用いたジーンターゲットの報告があるが、これらのES細胞は、おそらくはその全分化能の不安定性ゆえに、普及には至っていない。ES細胞の分化を抑制するサイトカインLIF

(leukemia inhibitory factor) の発見は、ES細胞培養技術の改良に、重要な役割を果たし、我々を含む一部の研究室では、リコンビナントLIFを培養液に補足することによって、全くフィーダー細胞を使わずに、ES細胞株を樹立したり、ジーンターゲットを行えるようになってきている。しかし、この条件でも、他の129以外の系統に由来するES細胞の樹立・維持の効率を向上させることには成功していない。このことは、129以外の純系マウスからES細胞を得るためには、培養条件の抜本的な見直しが必要であることを示唆する。

また、近年ヒトES細胞が単離され、これを細胞移植に応用しようとする再生医学的研究が進められている。しかし、本当にヒトES細胞に由来する分化細胞を移植に用いるためには、体外で培養されたES細胞の安全性が問題となる。これまでに報告されている方法では、マウス胎児性線維芽

細胞をフィーダーとして用い、培養液には牛胎児血清を添加しているが、未知病原体の感染を考慮するならば、このような異種動物に由来する生体素材との接触は回避されなければならない。

そこで、本研究では、129系統由来マウスES細胞を無血清・無フィーダーで培養する条件を確立し、このような問題の解決を図ることを、その目的とする。特に、我々のこれまでの予備実験から、ES細胞を無血清・無フィーダーで培養するためには、LIF以外にもうひとつ液性因子が必要であることが示唆されたので、その単離・同定を試みた。

## 2. 研究経過

### (1) 方法

ES細胞の培養：129Ola由来マウスES細胞(CGR8、E14tg2a等)は通常Glasgow minimal essential medium (GMEM)を基礎培養液とし、これに10%fetal calf serum(FCS), 1xnon-essential amino acid, 1mM sodium pyruvate,  $10^{-4}$ M 2-mercaptoethanol, 1000U/ml LIFを加えた培養液で培養した。無血清化に際しては、このうちFCSのみを除去あるいは他の成分で置換した。

### (2) 結果と考察

#### I 無血清・無フィーダー培養条件の確立

これまでに、マウスES細胞を無血清で培養する試みとして、ライフテックオリエンタル社から販売されているKnockout Serum Replacement (KSR)を用いる方法がある。これは、既知成分から成る牛胎児血清の代替品で、これを培養液に10-20%添加することにより、フィーダー上でのES細胞の増殖は維持可能である。しかし、これを我々が用いている無フィーダー

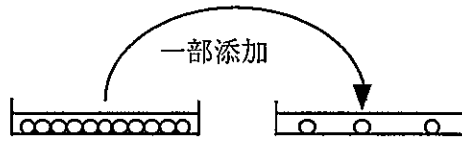


図1 コンディショニングメEDIUMを用いた無血清培養系

培養系で10%培養液に添加している牛胎児血清をKSRで置換してみたところ、高密度培養ではES細胞の増殖を維持することができたが、低密度、とくに1個の細胞からのクローナルな増殖は全く維持出来なかった。このように細胞密度がその増殖に影響を与える場合には、その細胞自身が産生する因子がその増殖を自己活性化していることが考えられる。そこで次に、高密度培養に用いたKSRを含む無血清培養上清(conditioned medium: CM)を、種々の濃度で新鮮なKSRを含む無血清培養液に添加し、これらがES細胞のクローナルな増殖を維持できるか検討した。すると、CMを3%以上加えたときには、未分化コロニーの形成が認められた(図1)。このことは、ES細胞自身が産生する液性因子が、無血清条件下での細胞増殖に必要であることを示唆する。

そこで次に、このような培養条件において、KSRが必須か否かを検討した。上記の一連の実験を、KSRの代わりにITS(insulin, transferrin, selen)を含む培養液で行ったところ、KSRを使用したときよりは若干効率が低下したものの、CM添加による無血清条件下での未分化コロニーの形成が認められた(図2)。このITS-10%CMで、細胞密度を問わずES細胞の培養が可能であったことから、CMの組成を除けば既知成分からなる無血清無フィーダー培養系が確立された、と考えられた。

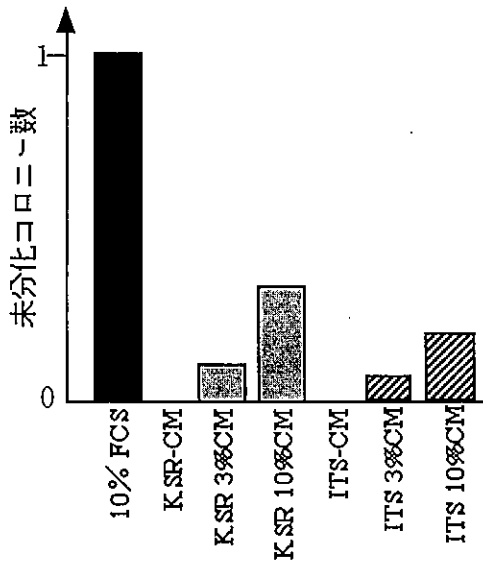


図2 コンディショニングメediumの未分化コロニー維持能  
10%FCSを用いたときのコロニー数を1として、それぞれの条件下での相対置を示した。

## II CMに含まれる因子の単離・同定の試み

では、このES細胞のCMに含まれる因子とは、一体どのようなものであろうか。これが蛋白因子であるかどうかを確認するために、2つの実験を行った。まず、ITSを含むCMを透析し低分子量成分を除去して添加したところ、活性は完全に残存していた。次に、限外濾過法で分画したCM中の活性を測定したところ、推定分子量30から50kDの画分に活性が認められた。これらの結果から、この因子が高分子量であることが分かった。さらに、CMを80℃で5分熱処理する、あるいは蛋白分解酵素トリプシンで処理すると活性が失われることから、この活性は蛋白因子に由来すると考えられた。

蛋白性生理活性物質は、多くの場合モノマーで作用するが、時にダイマー以上の多量体で活性を示す。そして、このいずれで

あるかは、それを単離する方法を選択するうえで重要なポイントである。そこで、ITSを含むCM50mlを逆相クロマトグラフィー法で分離し、その分画毎の活性を検討した。すると、この活性はただ一つの分画にのみ検出された。この結果は、この活性を担う因子がただ一つの蛋白であることを示唆するものである。このような蛋白は極微量で活性を示すことが多く、精製は困難と考えられたので、我々は以下の2つの方法で、その単離・同定を試みた。

### A 発現ライブラリー法

これまでに多くの液性蛋白因子が、cDNA発現ライブラリーをCOS細胞で発現させ、その上清中の活性を検討することにより、単離・同定されている。ただし、この場合、いかに目的の因子を大量に発現している細胞を選択し、これをライブラリー作成のソースとするかが成否の分かれ目となる。そこでまず、未分化ES細胞以外の培養細胞を用いて作成したCM中の活性を測定した。すると、未分化な胚性癌細胞株 (embryonic carcinoma cell) F9ではその培養上清中にES細胞同様活性が認められたが、それ以外の細胞種では殆ど活性は認められなかった。また、ES細胞を原始内胚葉や栄養外胚葉、あるいは栄養芽幹細胞 (trophoblast stem cell) に分化させたときには、この活性の産生が抑制された。これらのことは、この無血清条件下での細胞増殖に必要な液性因子が、未分化細胞特異的に発現していることを示唆し、興味深い。

以上の検討に基づき、ES細胞から調製したmRNAからcDNAを合成し、これを我々が開発した発現ベクターpHPCAGGSに組み込んで、 $2 \times 10^5$ 個のクローンからなる発現ライブラリーを構築した。これを4000個のクローンからなる50個のプールに分け、それぞれを8000個のCOS

細胞にリポフェクション法で導入した。導入後、培養液をITSを含む無血清培養液に置換し、3日間培養して各々のプールに由来するCMを得た。これらのCMの活性を無血清条件下でのクローナルな未分化コロニー形成能でアッセイしたところ、50プール中2プールに活性を確認できた。現在、この2プールからサブプールを作成し、その解析を進めている。

#### B 既知因子の検索

これまで、種々の生理活性を示す膨大な数の蛋白因子が単離・同定されている。我々が探している活性をしめすような因子はもちろんこれまでに報告されていないが、一つの因子が種々の異なる生理活性を示しうることはこれまでの報告から明かである。例えば、LIFはES細胞に対しては分化抑制効果を示すが、元来はその名が示すように、白血病細胞の分化誘導因子として単離されたものである。従って、我々が現在検討を進めている因子も、既に別の活性を指標として単離されているかもしれない。そこで、いくつかの候補となりうる既知蛋白因子の活性を、無血清条件下でのクローナルな未分化コロニー形成能でアッセイした。この結果、試した20余りの因子のうち、ほとんどの因子は活性を示さなかったが、唯一インターロイキン13 (IL-13)だけは、極めて弱いながらも、未分化コロニー形成維持活性を示した。しかし、これは生理的と考えられる濃度を大幅に越えた量を必要とし、またそのような条件でもES細胞のCMほどの活性は認められなかったことから、IL-13そのものが現在探している因子であるとは考えにくい。だが、異なるサイトカインがレセプターを共有していることはこれまでに多く知られているので、この場合にもIL-13とレセプター分子の一部を共有する未知因子が、

我々が単離を試みている活性を担っていることを示唆している可能性も考える。

#### 3. 研究成果

CMを用いたマウスES細胞の無血清無フィーダー培養系を確立した。また、このCMに含まれるES細胞の増殖を維持する活性が、単一蛋白分子に由来する可能性が高いことを確認した。

#### 4. 今後の課題と発展

現在の発現ライブラリーのスクリーニングを継続することにより、目的の因子の単離が、近い将来可能であると考えられる。また、念のため、これと並行して、大量のCMからの活性因子の精製も検討している。このいずれかの方法によってこの因子が単離されれば、それを用いた完全なマウスES細胞の無血清無フィーダー培養系が確立され、発生工学や再生医学に役立つことが期待される。

#### 5. 発表論文リスト

1. Burdon, T., Chambers, I., Niwa, H., Stracey, C. and Smith, A. G. : Signalling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells, *Cells Tissues Organs*, 165, 131-143, 1999.
2. Hotz Vitaterna, M., Selby, C. P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E. M., Hitomi, K., Thresher, R. J., Ishikawa, T., Miyazaki, J.-I., Takahashi, J. S. and Sancar, A. : Differential regulation of mammalian Period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12114-12119, 1999.
3. Miyawaki, K., Yamada, Y., Yano, H., Niwa, H., Ban, N., Ihara, Y., Kubota, A., Fujimoto, S., Kajikawa, M., Kuroe, A., Tsuda, K., Hashimoto, H., Yamashita, T., Jomori, T., Tashiro, F., Miyazaki, J.-I. and Seino, Y. : Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: A study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14843-14847, 1999.
4. Niwa, H., Miyazaki, J.-I. and Smith, A. G. : Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells, *Nat. Genet.*, 24, 372-376, 2000.