

Title	Electroporation of Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells.
Sub Title	カニクイザル胚性幹細胞に対するエレクトロポレーション法による遺伝子導入法の確立
Author	古谷, 正敬(Furuya, Masataka)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.18-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050602-0018

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Electroporation of Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells.

(カニクイザル胚性幹細胞に対するエレクトロポレーション法による遺伝子導入法の確立)

古 谷 正 敬

内容の要旨

胚性幹細胞 (ES細胞) を用いた基礎研究および臨床応用においてES細胞に対する安定した遺伝子改変技術の確立は必要不可欠なものであり、その利用価値は大きい。しかし霊長類ES細胞ではマウスES細胞と異なり高効率の遺伝子導入が困難とされてきた。我々は非ヒト霊長類ES細胞としてカニクイザル (サル) ES細胞の樹立および安定培養に成功している。サルES細胞はヒトES細胞と類似した性質を持つことから将来ヒトES細胞への遺伝子導入を目指し、その基礎実験としてサルES細胞に対する遺伝子導入法の確立を検討した。とくに遺伝子ターゲティングも視野に入れエレクトロポレーション法による遺伝子導入法の確立を試みた。

遺伝子導入法としてエレクトロポレーション法を用い、細胞解離方法や遺伝子導入条件を変えて蛍光遺伝子を発現するベクターを導入し、安定して蛍光蛋白を有する細胞を確認する事で導入効率を比較した。遺伝子導入に先立つ細胞解離方法に改良を加え単一の細胞まで解離せず、細胞塊に対して電気パルスを加えることで導入効率が改善した。さらに電気パルスの条件を最適化することで 10^7 個の細胞から約100クローンの安定遺伝子導入体を得た。続いて安定遺伝子導入体の薬剤選別によりサルES細胞で有効に働くプロモーターを検討した。その結果マウスES細胞と対照的にサルES細胞ではCMVプロモーターよりSV40プロモーターが有効に作用する事が明らかとなった。確立した遺伝子導入法を用いて蛍光標識したサルES細胞を作製しその特性解析、神経前駆細胞の分化誘導およびマウス胎仔脳室内への移植実験を行った。蛍光標識したサルES細胞がES細胞の性質を保持し、分化後も導入遺伝子である蛍光蛋白の発現が維持されることを確認した。また神経前駆細胞の脳室内移植実験により蛍光標識された移植細胞が宿主脳組織に取り込まれる様子を追跡する事ができた。

サルES細胞に対するエレクトロポレーション法による高効率の遺伝子導入法を確立した。この手法は霊長類ES細胞の基礎研究及び臨床研究に広く応用できるものと考えられる。

論文審査の要旨

胚性幹細胞 (ES細胞) の基礎研究および臨床応用には安定した遺伝子導入技術の確立が必須であるが霊長類ES細胞においてはマウスES細胞と異なり高効率の遺伝子導入が困難とされてきた。特にジーンターゲティングに一般に用いられるエレクトロポレーション法による高効率の遺伝子導入に成功した報告はこれまでになかった。本研究では霊長類ES細胞特有の性質である低いクローニング効率、すなわち細胞を単一細胞まで解離するとその後の細胞生存率が著しく減少するという性質に着目し、従来の単一細胞まで解離する方法を改良し細胞塊に対してエレクトロポレーションを行う事でカニクイザルES細胞に対する遺伝子導入効率を大幅に改善する事に成功した。

審査では、まず、霊長類ES細胞におけるクローニング効率の改善によって遺伝子導入効率を改善する可能性について質問がなされた。これに対し単一細胞に解離された霊長類ES細胞はフィーダー細胞への接着能が著しく低下し、フィーダー細胞との接触が絶たれた結果死滅してしまうこと、また接着したとしても単一細胞からの細胞増殖が遅延することから現時点ではクローニング効率の改善は極めて困難であり、細胞塊として扱うことで細胞増殖能を保つことが遺伝子導入効率改善の最善策であると回答された。これに対し本研究では単一細胞に解離する際に機械的な損傷を与えていると考えられ、より細胞障害性の低い化学的な細胞解離方法を更に検討することによりクローニング効率の改善を期待できる可能性があるとの指摘を受けた。次に細胞塊に対して遺伝子導入を行うことで得られる安定遺伝子導入体がクローナルなものでない可能性について質問がなされた。これに対し安定遺伝子導入体の獲得効率から考えて同一コロニー内に複数クローンが含まれる可能性は低く、また複数クローンから構成されるコロニーであったとしてもある程度細胞を増殖させた後であれば効率は低いもののクローニングが可能であると回答された。更にサザンブロット解析にてシングルコピーのクローンを確認しており、クローナルな安定遺伝子導入体の獲得は可能との回答がなされた。最後に本研究において達成された 10^5 という効率はジーンターゲティングに応用できるものかとの質問がなされた。これに対して一般にジーンターゲティングでは約300クローンの安定遺伝子導入体をスクリーニングすれば数クローンの相同組み換え体が含まれており、そこから逆算すると 3×10^7 個のES細胞を準備すれば良いことになりジーンターゲティングに十分応用できる効率であるとの回答がなされた。

以上の様に本研究はさらに検討すべき課題を残しているが、今後ヒトES細胞を含めた霊長類ES細胞の基礎研究および臨床研究に広く応用できる遺伝子導入技術を確立した点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
生理学 岡野 栄之 発生・分化生物学 須田 年生
分子生物学 清水 信義
学力確認担当者：
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成16年10月19日