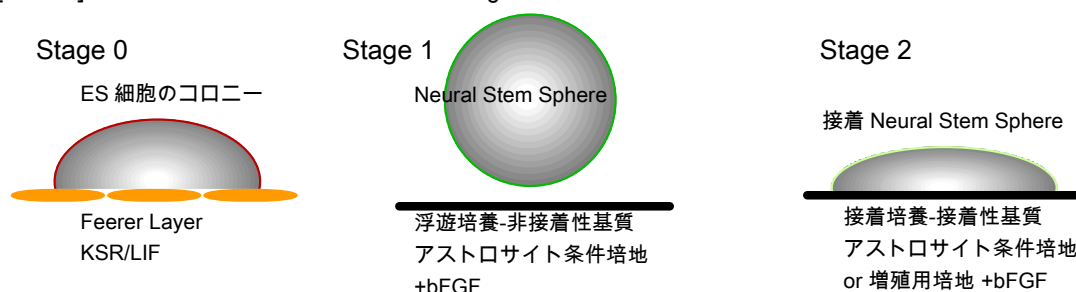


## ES 細胞由来神経幹細胞の増殖・分化と凍結保存

横浜市立大学医学部生化学 中山 孝 (nakayama@med.yokohama-cu.ac.jp)

[ 緒言 ] Embryonic Stem (ES、胚性幹細胞) 細胞はほとんど全ての細胞種に分化できる多能性幹細胞であり、また非常に増殖が早い。この特徴を利用して、我々が確立したアストロサイト条件培地を用いた方法でマウス ES 細胞を神経幹細胞へ短期間で効率よく分化させることができた。さらにこの ES 由来の神経幹細胞を凍結保存することにより、初代培養神経細胞と同等の細胞を必要な時にしかも大量に用いることが可能となった。また、霊長類 ES 細胞由来の神経細胞の作製も行うことができ、将来はヒト神経細胞を使った研究および創薬が可能となった。

[ 方法 ] 分化方法は以下に示す 3 つの Stage で構成されている。



### 1. Stage 0; ES 細胞の増殖

Feeder Layer 上で ES 細胞のコロニーを直径 300 ~ 500  $\mu\text{m}$  になるまで培養し ( 7 ~ 9 日間 )、浮遊培養用にピックアップする。

### 2. Stage 1; 神経幹細胞への分化

アストロサイト条件培地中で浮遊培養することで ES 細胞の Floating Sphere (Neural Stem Sphere) を作製し、神経幹細胞に分化誘導する ( 4 日間 )。また、培養液中に bFGF を加えることで神経幹細胞の増殖を高めることができる。

### 3. Stage 2; 神経幹細胞の増殖および神経細胞への分化誘導

Neural Stem Sphere を接着培地に移し、神経幹細胞や神経細胞に分化誘導する。ここでも bFGF を加えることで神経幹細胞を増幅することができる。

[ 結果 ] 以上の方法を用いるとピックアップした後 10 日間ほどで、ES 細胞のコロニー 1 個から  $10^5$  個以上の神経幹細胞を得ることができた。またマウスおよびサル ES 細胞由来の神経幹細胞は凍結保存が可能であり、融解後も興奮性を示す神経細胞に分化させることができた。さらにパーキンソン病モデルのサル脳内に、サル ES 由来神経幹細胞を移植しその効果を確認した。

[ 参考論文 ] 1) Nakayama T. et al. (2003) Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci. Res.* 46: 241-249. 2) Nakayama T. et al. (2004) Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *NeuroReport* 15: 487-491. 3) Nakayama T. and Inoue N. Neural Stem Sphere Methods: Induction of neural stem cells and neurons by astrocyte-derived factors in embryonic stem cells in vitro. *Embryonic Stem Cells-II: Methods and Protocols*, Kusad

Turksen eds. Humana Press (in press).