

氏名	やなぎ さわ 柳 澤 あやの
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第48号
学位授与年月日	平成17年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Generation of chromosome-specific monoclonal antibodies using <i>in vitro</i> differentiated trans-chromosomal (TC) mouse ES cells (インビトロ分化誘導後の染色体導入マウス ES 細胞を用いた、染色体特異的モノクローナル抗体の作製)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 健三 (副査) 押村 光雄 林 真 一

学位論文の内容の要旨

ヒトの細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体は、細胞の性質を調べたり、分離したりするのに大変有用である。そこでより広範囲のモノクローナル抗体を獲得することを目的として、ヒト染色体導入マウス ES 細胞をインビトロ分化誘導し、染色体特異的なモノクローナル抗体を作製する方法の有用性について検討した。染色体を導入した細胞やマウスにおいて導入染色体上の遺伝子はレシピエント細胞や組織の特異的制御のもと、発現することが示されている。本研究では、1)ヒト染色体導入 ES 細胞がインビトロ神経分化誘導において染色体非導入細胞と同様に分化し、神経前駆細胞マーカー nestin を発現することを示した。そして 2)nestin 陽性ヒト染色体導入 ES 細胞 (E14/hChr.4, E14/Chr.11) をマウスに免疫し、導入染色体特異的なモノクローナル抗体を作製できることを示した。

方法

ES 細胞の神経分化誘導は CDM(Chemically defined medium)法で行った。CDM に ES 細胞を播種し、5-6 日後の細胞を回収して 5×10^6 細胞をメス C57BL/6J マウス尾底部に皮下注射した。このマウス脾細胞よりハイブリドーマを作製し、培養上清をスクリーニング用の FACS 解析に用いた。h4-neural1 の抗原は、プロテイン G で精製した h4-neutal1 を NHS カラムに固定化し、ヒト EC 細胞株 NEC8 より精製した。これを質量解析で同定し、トランジェントで Cos-7 細胞に高発現させ、FACS 解析により確認した。

結果と考察

CDM分化誘導法により、ヒト4番染色体、11番染色体を導入したマウスES細胞(E14/hChr.4、E14/hChr.11)は、非導入マウスES細胞とほぼ同時期に分化し、分化段階に応じてESマーカーSSEA-1、神経前駆細胞マーカーnestin、ニューロンマーカー β -tubulin type IIIを順に発現した。

次に nestin 発現初期である CDM5 日目から 6 日目に E14/hChr.4、E14/hChr.11 をそれぞれマウスに免疫したところ、CDM5-6 日目の染色体導入細胞特異的なモノクローナル抗体を1つずつ獲得した。これらのモノクローナル抗体は染色体導入細胞の CDM 分化誘導 10 日目までは両者とも nestin の発現とほぼ平行に反応し、またヒト EC 細胞株のインビトロ神経分化誘導においても同様の反応を示した。一方、E14/hChr.4 の免疫より得られた h4-neurall (IgG1/ κ) を固定化したアフィニティゲルでヒト EC 細胞株より抗原を精製し、質量解析を行った。この結果、精製されたタンパクは CD133 (prominin 1, ~120kDa, 4p15.32) であり、CD133 の高発現株の FACS 解析により h4-neurall が CD133 に反応することが確認された。

結論

本研究より、インビトロ分化誘導したヒト染色体導入マウスES細胞を、免疫原として利用することにより、導入染色体特異的なモノクローナル抗体が獲得でき、またそれは実際にヒト細胞表面分子を認識することが示された。マウスES細胞を様々な細胞に分化誘導する方法はほぼ確立されている。これらの方法を染色体導入マウスES細胞に応用することにより、分化段階に応じたモノクローナル抗体が作製でき、パネル化が可能になる。これはヒトとマウスES細胞についてより深く理解する手助けとなると期待される。

審査結果の要旨

本研究はヒト染色体導入マウスES細胞を用いて新規細胞表面マーカーを同定することを目的としており、ヒト染色体4番と11番を導入したマウスES細胞をインビトロで神経前駆細胞に分化誘導した後マウスに免疫し、そこから得られた抗体の解析によりその手法の有用性について検討したものである。その結果、神経前駆細胞に分化したヒト染色体導入細胞特異的に反応性を示すモノクローナル抗体が作製できることを証明し、またその抗体がヒトEC細胞の分化誘導においても同様の反応性を示すことを示した。さらにそのうち一つのモノクローナル抗体について抗原を同定し、導入染色体上遺伝子にコードされたタンパクであることを明らかにした。本論文の内容は、ヒト細胞表面マーカーに対する抗体作製におけるヒト染色体導入マウスES細胞の有用性について示したばかりでなく、ヒト及びマウスES細胞の神経発生機構を理解する上で極めて重要な知見であり、幹細胞研究の分野において明らかに学術水準を高めたものと認める。