
牛下垂体幹細胞の不死化とその利活用： 性腺刺激ホルモン産生細胞への分化誘導系の確立

鳥取大学農学部・准教授 樋口 雅司

■ 目的

牛の受胎率低下要因の1つに牛に最適な性腺刺激ホルモン(gonadotropic hormone, GTH)製剤がないことが挙げられるが、現在、機能的に十分な量が得られ、倫理的・免疫学的に問題のない製剤を創る技術は存在しない。最近、我々は特殊な機器や試薬を用いずにホルモン産生細胞への分化能をもつマウス下垂体幹細胞を分離・増殖させることに成功した。そのため、牛下垂体幹細胞からGTH産生細胞への分化誘導系を確立できれば、牛に最適なホルモン製剤の体外生産系を構築できると考えられるが、牛では下垂体幹細胞が特定されておらず、分離技術もないため、細胞分化のメカニズムは未解明である。そこで本研究では、牛下垂体前葉からSex determining region Y-box 2(SOX2)陽性細胞を分離する技術を開発し、この細胞がホルモン産生細胞への分化能を有する「下垂体幹細胞」であるか検証した。そして、その幹細胞を不死化し、GTH産生細胞への分化誘導系の確立を目指した。

■ 方法

子牛下垂体前葉から初代細胞を調製してガラスボトムディッシュに播種し、接着した細胞を2次元培養に供した。細胞の性質は定量PCRおよび免疫蛍光分析により解析した。次に、増殖した細胞を3次元環境に移してGTH産生細胞への分化能および効率を調べた。また、レンチウイルスベクターにより細胞の不死化を試みた。

■ 結果および考察

下垂体前葉初代細胞の2次元培養では、接着した一部の細胞が島状に増殖する様子が観察された。増殖した細胞の遺伝的性質を調べたところ、培養前よりも培養後の細胞において下垂体幹細胞マーカー(*Sox2*、*Pitx1* および *Cdh1*)発現量が高かった。一方、下垂体前葉ホルモン遺伝子(*Pomc*、*Lhb*、*Tshb*、*Gh* および *Prl*)発現量は培養後で顕著に低かった。免疫蛍光分析の結果、増殖した細胞の99.2 ± 0.58%がSOX2陽性かつほとんどの細胞がEカドヘリン陽性であり、全ての細胞はホルモン陰性であった。次に、増殖した細胞を胎仔牛血清含有培地に懸濁して3次元培養を行ったところ、SOX2陽性細胞が約90%を占める凝集体を形成した。そして、凝集体を構成する細胞の約10%がGTH陽性であった。しかしながら、成馬血清を用いても凝集体は形成されなかった。以上のことから、2次元培養によって下垂体前葉に存在する未分化なSOX2陽性細胞を分離できることがわかった。また、本細胞はGTH産生細胞への分化能を有する「下垂体幹細胞」であることが明らかになった。一方、不死化細胞のシングルセルクローニングは進んでいるものの、細胞株の樹立は完了しなかった。

■ 結語

牛下垂体前葉SOX2陽性幹細胞の分離に成功した。また、胎仔牛血清に含まれる何らかの因子がGTH産生細胞への分化に必須であることが明らかになった。牛下垂体前葉SOX2陽性幹細胞株の樹立には至らなかったが、現在、シングルセルクローニングで初代細胞と形態の似た細胞コロニーが増殖を続けている。今後、細胞株の樹立が順調に進めば、GTH産生細胞への分化メカニズム解明に向けた研究シーズとしての利活用が期待できる。