



Title	交感神経系神経堤幹細胞及び神経芽腫cancer stem cellsの分離と神経芽種研究への応用
Author(s)	岩下, 寿秀
Citation	癌と人. 2007, 34, p. 34-35
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23658
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

交感神経系神経堤幹細胞及び神経芽腫 cancer stem cells の 分離と神経芽腫研究への応用

岩 下 寿 秀*

研究目的

我々は、交感神経系神経堤幹細胞を分離し、培養システムを構築することを試みている。そして、神経芽腫の発症、進展及び予後に関与する蛋白の機能解析に、この培養システムを利用する予定である。

本年度では、新生児副腎髄質からの交感神経系神経堤幹細胞の同定のための実験を行った。

研究方法

神経堤由来の組織には未分化な神経堤幹細胞から成熟した神経堤細胞まで混在しているの

で、神経堤幹細胞を神経堤由来の組織から分離することが必要である。

まず、新生児副腎髄質からの neurosphere の形成を試み、その多分化能の有無について検討した。

生後半日のラット新生児副腎を 37 度の中でトリプシンとコラゲナーゼ 4 によって消化した後、ピペッティングにより single cell suspension を作成する。その後、細胞が plate の底に付着しないように、浮遊細胞用の plate にて self-renewal media (Chicken embryo extract, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Basic fibroblast

growth factor (bFGF) 等が豊富な培養液) 中で 10 日間培養した (37 度, CO₂ 濃度 5%) ところ, 直径約 100 μ m の neurosphere が形成された。その neurosphere が plate の底に adherent になるように, フィブロネクチンでコートされた plate の上 で differentiation media (Chicken embryo extract, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 及び Basic fibroblast growth factor (bFGF) 濃度が self-renewal media と比較して薄い培養液) にて培養し, 末梢神経細胞に特異的なマーカーである Peripherin とシュワン細胞に特異的なマーカーである GFAP (Glial fibrillary acidic protein) に対する抗体で免疫染色を施行した。

つぎに, 副腎髄質由来の交感神経系神経堤幹細胞の分離を試みた。Single cell suspension を NGF receptor subunit の P75 蛋白の細胞外ドメインに対する抗体である抗 p75 抗体と反応させた後, FITC を conjugate した二次抗体と反応させる。セルソーターを使って, p75 が強く発現する分画 (p75 high population) を分離した。そして, 分離された p75 high population を self-renewal media 中で, 細胞が adherent になるようにフィブロネクチンでコートされた plate 上で 7 日間培養し (O₂1%, CO₂6.5%), その後 differentiation media の中で 5 日間培養した。そして, Peripherin 及び GFAP に対する抗体で免疫染色を施行した。

研究結果

末梢神経細胞に特異的なマーカーである Peripherin とシュワン細胞に特異的なマーカーである GFAP (Glial fibrillary acidic protein) に対する抗体で Neurosphere を免疫染色したところ, 神経細胞とシュワン細胞が共存していた。

このことから, 副腎髄質には多分化能を有する交感神経系神経堤幹細胞が存在するものと考えられた。そして, FACS で分離された P75 陽性細胞の中に少数ながら, 神経堤幹細胞が存在することが証明された。しかし, plating efficiency (1つのウェルに入れた p75 high 細胞の数のうち, 生き残った細胞の割合) が非常に低く, 3% 程度であった。そして, 神経細胞とシュワン細胞が共存していたコロニー (交感神経系神経堤幹細胞由来のコロニー) はその 1/3 程度であり, 全体として p75 high population における幹細胞の frequency は約 1% 程度と推測された。

考 察

Plating efficiency が低い原因は細胞の調整と培養方法に問題があると考えており, Plating efficiency を上昇させることを努めている。

結 論

新生児ラット副腎に交感神経系神経堤幹細胞が p75 を強く発現する population 内に存在することを証明した。

終わりに

アメリカから帰国後, 研究資金に恵まれないう状況になりましたが, 財団法人大阪癌研究会より平成 17 年度研究助成金を助成していただき, 非常にありがたく感じました。この場をお借りして, 深謝いたします。そして, 貴財団のさらなる発展を心よりお祈り申し上げます。

* 愛知医科大学医学部 病理学講座 助教授
平成 17 年度一般学術研究助成金交付者