

## 論文の審査の結果の要旨

長船 健二

長船健二氏は「未分化細胞を用いた腎臓形成に関する研究」においていくつかの優れた結果を得ている。

現在多くの臓器において発生生物学の知見に基づき、基礎生物学的及び応用生物学的な臓器再生の研究が盛んに行われている。しかし、この研究が始まる前の段階では、未分化細胞より哺乳類の腎細胞を形成する研究は全く成果が得られていなかった。長船氏は両生類の未分化細胞より試験管内で初期の腎臓である前腎の一部が形成される系の研究から着手し、哺乳類の未分化細胞より腎臓を形成する研究に展開した。

長船氏の成果は第一に、アフリカツメガエル受精卵の未分化細胞塊であるアニマルキャップをアクチビンとレチノイン酸で処理した外植体の中に前腎の導管が形成されることを示したことにある。この系において前腎ネフロンの内、腎管と糸球体が形成されることが既に示されていたが、導管が形成されているかどうかは不明であった。長船氏は免疫染色にて処理した外植体内に腎管特異的抗体 3G8 と導管特異的抗体 4A6 で別個に染まる管構造が含まれていること、この 3G8 及び 4A6 抗原の発現は正常胚と同じ時間的パターンを呈すること、さらにアニマルキャップを 0.6-0.7mm 角の大きさに切除したもの、あるいは腹側半球より切除したものでは 90%以上の高頻度で 4A6 陽性の管構造が形成されること、などを示した。また、電子顕微鏡による微細構造の観察から処理した外植体内に正常胚の導管の特徴である管腔側に絨毛をまばらに有する管構造が存在すること、そして *in situ hybridization* にて外植体内に腎管には発現せず導管にのみ発現するマーカー遺伝子である *Gremlin* 及び *c-ret* を発現する管構造が存在することを示した。長船氏の実験からアニマルキャップをアクチビンとレチノイン酸で処理することにより試験管内で前腎の導管が高頻度に形成されること、そして両生類においては未分化細胞より腎管、糸球体のみならず導管も加え前腎ネフロンのすべてのコンポーネントが形成されることが明らかとなった。

また、第二の成果は、将来的に哺乳類の胚性幹(ES)細胞などの未分化細胞より腎細胞を形成する目的にて、マウス後腎の上皮系前駆細胞のみが選択的に増殖あるいは尿細管や糸球体上皮に分化する *in vitro* 及び *in vivo* の系を確立したことにある。尿細管や糸球体に最終的に分化する未分化細胞の集団であるマウス胎生 11 日の後腎間充織を個々の細胞に解離し、マウス後腎の尿管芽由来の cell line である UB cell を feeder layer として培養することにより、胎児ウシ血清存在下では間充織に含まれる前駆細胞の内、Flk-1, VE-cadherin 陽性の内皮系前駆細胞が、無血清では Pax-2, Sall 1 陽性の上皮系前駆細胞が選択的に増殖する *in vitro* 系を確立した。また、尿細管に分化可能な上皮系前駆細胞の存在を *in vitro* で確認する方法として、解離した後腎間充織の細胞塊に GFP

等で追跡可能とした細胞を含ませ器官培養条件にてトランスフィルター上で胎児脊髄と共培養することで、この細胞が GFP 陽性の尿細管に分化することを確認できる系を確立した。また、糸球体や尿細管上皮に分化可能な上皮系前駆細胞の存在を *in vivo* で確認する方法として、生後 0 - 3 日目の新生マウス腎に移植した細胞がホストのネフロンの中で尿細管及び糸球体上皮に分化することを確認できる系を確立した。以上の 3 つの *in vitro* 及び *in vivo* の系はいずれも上皮系前駆細胞が単一細胞レベルより増殖あるいは糸球体や尿細管の上皮に分化することが確認できるため、フローサイトメトリーにて選別される単一の細胞にも適用可能である。よって ES 細胞等の未分化細胞の中より腎臓の上皮に分化しうる前駆細胞を単離する目的に用いることが可能である。

このように長船氏の行った研究は、両生類においては未分化細胞より試験管内で前腎ネフロンが形成されうることを示し、そして哺乳類の未分化細胞より腎細胞を形成する基礎となる、前駆細胞を選択的に単離そして増殖させる系を確立した研究であり学問上大きな価値がある。

したがって、本審査委員会は博士（理学）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。