

## 論文要旨

### Induction of Pancreatic Tissues from Mouse Embryonic Stem Cells

(マウス ES 細胞からの膵臓組織誘導)

論文提出者氏名

中西未央

#### 【背景】

胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞は哺乳類初期胚の内部細胞塊に由来し、あらゆる種類の細胞へと分化する能力 (多能性) をもち、未分化な状態を維持したまま長期にわたって培養することができる。これまでの研究により、ES 細胞から様々な細胞を特異的に分化させる培養系が開発された。このような分化系は、胚発生における細胞の分化誘導や特異化の制御機構を研究するための培養モデル系として有用である。とりわけ ES 細胞から膵臓の細胞を誘導する培養系は、将来の糖尿病患者に対する再生医療への応用だけでなく、膵臓発生機構解析のための分化モデルや医薬品候補化合物の評価系としても期待されている。

ES 細胞を分化させる一般的な方法として、胚様体と呼ばれる細胞塊を形成させる方法、他の細胞と共培養する方法、および単層培養系で分化させる方法が知られている。細胞塊の形成は分化に必要な細胞間相互作用を促進させる反面、特定の細胞のみを誘導する場合には、細胞塊内部の細胞の不均一性が障害となる。これに対して、単層培養系での分化は隣接する細胞による影響が少なく、各細胞を比較的均一な条件下で分化させることが可能である。また多くの分化誘導法は、成長因子や誘導因子の供給源としてウシ胎児血清 (FBS) を使用してきた。しかし血清の使用にはロットごとの差異や同定されていない多くの誘導因子が含まれる等の深刻な欠点があり、近年、血清を使用せずに特異的な分化に必要な因子を同定する試みが始まっている。

本研究において、私はマウス ES 細胞から膵臓の細胞を高効率に誘導する新しい培養系の確立を目的とし、異なる特徴をもった 2 つの培養系を開発した。まず、私は膵臓発生機構の解析に利用可能な分化誘導系を構築するため、膵臓発生に必須の因子であるレ

チノイン酸とアクチビンを用いて、ES 細胞の細胞塊から外分泌細胞、導管、内分泌細胞をすべて含む膵臓様組織を分化させる培養系を開発した(Nakanishi et al., 2007) (第一章)。次に、より安定で高効率な膵臓分化誘導系へと発展させるため、膵臓の前駆細胞が含まれる内胚葉に着目し、マウス ES 細胞を、無血清培地中で単層培養し、内胚葉の細胞を誘導する方法を開発した。このような膵臓の前駆細胞を高純度で取得できれば、より均一な膵臓組織の誘導が可能になると考えられる (第二章)。

## 【第1部 マウス ES 細胞から膵臓様組織を分化誘導する培養系の開発】

膵臓は、マウスの発生過程において初期内胚葉の前方領域に由来する。膵臓を構成する各細胞 (消化酵素を分泌する外分泌細胞、消化酵素を十二指腸へと導く導管、ホルモンを分泌する内分泌細胞) は、すべて共通の前駆細胞から分化すると考えられている。これまで培養系で ES 細胞から膵臓の細胞を誘導した報告は、いずれも内分泌細胞にのみ注目しており、膵臓組織全体を誘導するものではなかった。しかも、膵臓では発現しない神経マーカー陽性細胞を使用する極めて人工的な方法であり、膵臓発生のモデル系としては不適切であった。

私は ES 細胞のコロニーを剥離して形成した細胞塊を、血清代替物とレチノイン酸・アクチビンを添加した無血清培地中で培養して分化誘導した。レチノイン酸・アクチビン処理によって、ES 細胞塊における初期内胚葉マーカー遺伝子および膵臓外分泌細胞、導管、内分泌細胞の各マーカー遺伝子発現量が著しく増加する一方、膵臓で発現が抑制される遺伝子 *Sonic hedgehog* の発現は減少した。免疫組織化学的な解析により、処理した ES 細胞塊においてアミラーゼ陽性の細胞、インスリンまたはグルカゴン陽性細胞、および導管様構造の形成が観察された。電子顕微鏡を用いた解析により、これらの細胞内には多量の顆粒が存在するなど、その微細構造は膵臓外分泌細胞、内分泌細胞および導管細胞の特徴と一致することが確認された。これらの結果は、レチノイン酸・アクチビン処理した ES 細胞から外分泌細胞、導管、内分泌細胞をすべて含む組織が誘導されたことを示唆する。

次にレチノイン酸およびアクチビンによる膵臓分化誘導の濃度依存性を、定量的 RT-PCR 法および免疫染色によって検討した。0.1  $\mu\text{M}$  のレチノイン酸存在下において、低濃度 (10 ng/ml) アクチビンとの共処理はアミラーゼ陽性細胞を増加させ、より高濃度 (25 ng/ml) のアクチビンとの共処理はインスリン陽性細胞を増加させた。したがって、アクチビンの処理濃度が、本実験系における外分泌細胞と内分泌細胞の誘導を調節していると考えられる。

レチノイン酸・アクチビン共処理による膵臓組織の誘導効率を検討した結果、0.1  $\mu\text{M}$  レチノイン酸および 25 ng/ml アクチビンによる分化誘導の結果、膵臓分化マーカー *Pdx1* の発現が検出される ES 細胞塊の割合は 43 % であり、30 % の細胞塊でインスリン陽性細胞が観察された。また、インスリン陽性細胞が観察された細胞塊に占めるインスリン産生細胞の割合は、5.0 % であった。

本研究は、マウス ES 細胞を用いて試験管内で、膵臓外分泌細胞、導管、内分泌細胞をすべて含む組織を分化誘導した初めての報告である。この実験系において、レチノイン酸とアクチビンが顕著な膵臓分化誘導能を持つ一方、誘導された組織は膵細胞以外の

様々な細胞を含む不均一な細胞から構成されていることが示唆された。

## 【第2部 マウス ES 細胞から内胚葉の細胞を誘導する系の開発】

次に、より安定で高効率な腭臓分化誘導系へと発展させるため、私は腭臓の前駆細胞が含まれる内胚葉に着目した。腭臓は、マウスの発生過程において初期内胚葉の前方領域に由来する。内胚葉は原腸陥入の際に中胚葉とともに原条 (primitive streak: PS) から形成される。PS 発生の分子機構については未解明な部分が多いが、変異マウスをもちいた近年の研究の結果、Wnt シグナルと TGF- $\beta$ シグナルが PS の発生に不可欠であることが示唆されている。本研究では、成分既知の無血清培地を使用して、単層培養した ES 細胞から内胚葉の細胞を誘導する新しい方法を開発した。

Wnt-3aによるES細胞からのPS誘導 最初に、WntシグナルとアクチビンシグナルがES細胞のPS分化に与える影響を調べた。Wnt-3aとアクチビン(ともに 5-50 ng/ml)を添加した無血清培地中で単層培養したES細胞では*brachyury*や*goosecoid*などのPSのマーカー遺伝子発現量が特異的に上昇した。特にWnt-3aで処理した細胞では発現量の上昇が著しく、免疫染色でも 80 % の細胞が*brachyury*陽性であった。さらに、Wnt-3a処理した細胞から細胞塊を形成させ、血清を含む培地中で培養した結果、PS以外に由来する神経細胞へと分化する割合が、未分化のES細胞から形成させた細胞塊と比較して有意に低下した。この結果は、Wnt-3a処理がES細胞をPSへと誘導し、それ以外の細胞系譜への分化能を制限した事を示唆する。

レチノイン酸およびアクチビンによるES細胞の内胚葉誘導 次に、ES細胞から内胚葉の細胞を選択的に誘導するため、3日間 50 ng/ml Wnt-3a存在下で培養した細胞を様々な培養条件で培養した。初期内胚葉分化マーカー遺伝子*Sox17* および内胚葉前方マーカー遺伝子*Onecut1* 等の発現量を指標として検討をおこなったところ、先行研究において内胚葉誘導を促進することが報告されていたアクチビンを添加しても内胚葉マーカーの発現量は上昇しなかったが、レチノイン酸を添加すると内胚葉マーカーの発現量が顕著に上昇した。さらに、レチノイン酸とアクチビンを共処理した場合、*Sox17*の発現は相乗的に促進された。免疫染色の結果、1  $\mu$ Mレチノイン酸と 10 ng/mlアクチビン処理開始 2 日後、*Sox17* と*Onecut1* が、ES細胞の 11 %および 25%で検出され、一方PSと中胚葉の分化マーカーである*brachyury*陽性細胞は大幅に減少した。これらの結果は、レチノイン酸とアクチビンがPSから内胚葉への選択的な分化を促進した事を示唆する。

本実験系は細胞塊形成や他の細胞との共培養、遺伝子導入等をもちいずに、無血清培地において内胚葉の細胞を誘導した新しい方法である。誘導された細胞が内胚葉組織を形成する分化能をもつかは現在検討中だが、この培養系は Wnt-3a およびレチノイン酸・アクチビンの腭臓発生機構における役割の解析のために有用なモデルとなる可能性がある。さらに、本研究の成果は腭臓内分泌細胞のような医療にとって有用な内胚葉性組織を ES 細胞から産生するための重要な過程となると思われる。

