

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 中西 未央

論文題目 Induction of Pancreatic Tissues from Mouse Embryonic Stem Cells
(マウス ES 細胞からの膵臓組織誘導)

生物の発生過程における膵臓形成について研究するために、これまでは遺伝子変異動物や膵臓の初代培養を利用して研究がおこなわれてきた。しかし、遺伝子変異動物をもちいた解析は膵臓発生を制御する未知の因子の探索や大規模な評価には適さず、また初代培養は安定した分離や長期間の培養が難しく再現性の高い実験結果を得るのは困難だった。胚性幹細胞 (ES 細胞) は、体を構成するほぼ全ての細胞へと分化する能力 (多能性) をもち、この能力を維持したまま無制限に培養を続けることが可能である。これまでに ES 細胞から試験管内で様々な種類の細胞を分化させる培養法が研究されている。

もし試験管内で ES 細胞を膵臓へと分化させることができれば、遺伝子変異動物より時間的コストがかからず、また初代培養よりも安定的に、膵臓発生を制御する因子を効率良く探索・評価することが期待できる。さらに、試験管内で誘導された膵臓の細胞は、医薬品開発や再生医療へと応用することも期待される。そこで論文提出者は、試験管内で ES 細胞の膵臓分化を誘導する培養法の開発を目的として、研究を行なった。

最初に、ES 細胞塊を利用した膵臓組織誘導法の検討について述べられている。ES 細胞のコロニーを剥離して形成させた細胞塊を浮遊培養した結果、外胚葉、中胚葉、および膵臓へと分化する内胚葉の各分化マーカーの発現上昇がみとめられた。続いて、カエルの未分化細胞であるアニマルキャップを膵臓に分化させた先行研究をふまえ、レチノイン酸とアクチビンが ES 細胞の膵臓分化に与える影響を検討した。内胚葉分化マーカー *Sox17* が発現する形成後 4 日目の細胞塊を 2 日間、0.1 μM レチノイン酸と 10 ng/ml アクチビンのいずれか、あるいは両方を添加した培地中で処理した後、細胞塊を培養皿に接着させて培養を続けた。処理後の三胚葉と膵臓の各分化マーカーの発現を RT-PCR 法によって調べた結果、外胚葉および中胚葉マーカーの発現に処理による差はみられなかったのに対し、内胚葉マーカー *Sox17*、膵臓内分泌細胞マーカー *Insulin*、*Glucagon*、*Pancreatic polypeptide*、*Somatostatin* および膵臓外分泌細胞マーカー *Amylase 2* の発現はレチノイン酸・アクチビン共処理による顕著な上昇がみられた。また組織学的な解析により、レチノイン酸・アクチビン共処理した細胞塊の内部において、内分泌細胞マーカー *Insulin* 陽性、*Glucagon* 陽性、あるいは外分泌細胞マーカー *Amylase* 陽性の細胞が観察され、さらに上皮細胞によって形成された膵臓導管様の構造もみとめられた。

次いで、レチノイン酸・アクチビンの処理濃度が膵臓分化誘導に与える影響について述べられている。各濃度のレチノイン酸 (0, 0.1 または 1 μM) およびアクチビン (0, 10 ま

たは 25 ng/ml) で処理した ES 細胞塊における膵臓マーカーの発現を定量的 RT-PCR 法と免疫染色によって検討した結果、レチノイン酸のみで処理した細胞塊において、膵臓マーカーの発現量は無処理の細胞塊より増加したが、アクチビンのみで処理した細胞塊では変化がなかった。また、レチノイン酸濃度は一定 (0.1 μ M) でアクチビン濃度を変化させた場合、低濃度 (10 ng/ml) アクチビンとの共処理は外分泌細胞を、より高濃度 (25 ng/ml) のアクチビンとの共処理は、内分泌細胞を著しく増加させた。この結果は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ことを示している。

次いで、本培養系における膵臓組織の誘導効率について述べられている。各細胞塊における膵臓分化マーカー *Pdx-1* の発現を RT-PCR 法によって調べた結果、0.1 μ M レチノイン酸・25 ng/ml アクチビン共処理した細胞塊の 43% で *Pdx-1* 発現が検出された。さらにインスリン陽性細胞の誘導効率を免疫染色により調べた結果、30% の細胞塊でインスリン陽性細胞がみとめられ、各細胞塊に占めるインスリン陽性領域の割合は平均で 5% であった。これらの結果は、レチノイン酸とアクチビンが ES 細胞の膵臓分化を明らかに誘導する一方、細胞塊には膵臓以外の細胞も多く含まれることを示している。

そこで論文提出者は次に、膵臓発生の各過程の制御因子をさらに詳細に探索・評価するため、細胞塊形成の影響を排した新しいアプローチで、膵臓を分化誘導することを目的に研究を行なった。細胞塊を形成させると細胞間相互作用により分化が誘導される反面、得られる分化誘導作用は同定・制御が困難であるため、分化過程解析の妨げとなった。また、細胞塊には分化状態の異なる様々な細胞が含まれ、これが膵臓以外の細胞への意図しない分化の原因となると考えられた。このような問題点を克服するため、論文提出者は ES 細胞を無血清・成分既知の培地 (ESF 培地) 中で、単層培養して分化させることを考えた。これにより、細胞間相互作用や培地中の未知の成長因子の影響を減らし、各誘導因子が分化に与える影響を明瞭に解析することが期待できる。さらに各細胞の環境が均一であることから、ES 細胞から中・内胚葉の前駆細胞である原条の細胞、原条の細胞から内胚葉へと分化誘導する培養条件を、各段階の分化状態を解析しながら検討することができ、結果として、より高効率に膵臓組織を誘導することが可能になると考えた。

まず ES 細胞を中胚葉と内胚葉の前駆細胞である原条の細胞へと分化させる条件検討について述べられている。遺伝子変異動物をもちいた先行研究により原条・内胚葉分化への関与が示唆されていた Wnt-3a あるいはアクチビンを加えた ESF 培地中で ES 細胞を単層培養し、各分化マーカーの発現変化を定量的 RT-PCR 法によって調べた。その結果、Activin による発現変動は僅かであったのに対し、50 ng/ml の Wnt-3a により、原条の細胞で強く発現する *Brachyury*、*Foxa2*、*Goosecoid* が処理開始 3 日目までに顕著に発現上昇する一方、外胚葉の分化マーカー *Sox1* の発現は ES 細胞よりも減少した。免疫染色により原条の細胞の誘導効率を調べた結果、50 ng/ml の Wnt-3a で 3 日間処理した ES 細胞の 61% が *Goosecoid*

陽性で、80%が Brachyury 陽性であった。

生体の発生において、原条に含まれない細胞は外胚葉を形成し、神経や表皮へと分化する。したがって、ES 細胞が原条の細胞へと分化すれば、同時に外胚葉由来の神経などへ分化する細胞は減少することが予想される。そこで、ES 細胞を 50 ng/ml Wnt-3a で 3 日間処理後、先行研究を参考に血清存在下で細胞塊を形成させる方法で神経分化を誘導し、Wnt-3a 処理による神経誘導効率の変化を調べた。その結果、未分化な ES 細胞からは 63%で神経マーカー β 3tubulin 陽性細胞が誘導されたのに対し、Wnt-3a 処理後の細胞では 27%に減少した。

Wnt-3a 処理時の各細胞内シグナル伝達経路の活性化状態を調べた結果、Wnt canonical 経路の活性化 (GSK3 のリン酸化状態低下と細胞内 β -catenin 量の増加) がみられた。

次いで、Wnt-3a によって原条の細胞へと分化した ES 細胞を、膵臓の前駆細胞を含む内胚葉へとさらに分化させる方法の検討について述べられている。50 ng/ml Wnt-3a 存在下で 3 日間培養した細胞を、レチノイン酸 (0, 0.25, 1 または 5 μ M) とアクチビン (0, 5, 25 または 100 ng/ml) 存在下でさらに 2 日間培養し各マーカー遺伝子の発現変化を調べた。その結果、アクチビンのみの処理では内胚葉初期分化マーカー *Sox17* の発現に変化はみられなかったが、レチノイン酸と共処理することによって、発現量が相乗的に増加した。原条の細胞からは内胚葉と中胚葉が分化するが、原条と中胚葉の分化マーカー *Brachyury* の発現量は処理後、著しく減少し、中胚葉に由来する血管や筋肉の分化マーカー発現にも大きな変化はみられなかった。免疫染色の結果、*Brachyury* 陽性細胞はレチノイン酸・アクチビン処理によって 79%から 3%に減少した一方、内胚葉で発現する *Onecut1* および *Sox17* の陽性細胞は、レチノイン酸・アクチビン処理前は検出されなかったのに対して、処理後それぞれ全細胞の 23%および 11%で発現が検出された。さらに、膵臓の初期分化マーカー *Pdx1* の発現にも処理による顕著な上昇がみられた。

以上の結果をまとめると、本研究では、試験管内でマウス ES 細胞から膵臓組織を分化誘導することを目的とし、アプローチの異なる 2 つの培養系を開発した。第 1 の培養系は ES 細胞塊をレチノイン酸・アクチビン共処理し、培養系で膵臓の内分泌細胞だけでなく、外分泌細胞と導管構造をすべて含んだ組織を誘導することに初めて成功した。第 2 の培養系は、膵臓の前駆細胞をふくむ内胚葉の細胞を成分既知の培地中で、しかも細胞塊形成を経ずに初めて誘導した。従来の遺伝子変異動物をもちいた研究の結果からでは、膵臓発生のどの過程にどの成長因子が必要であるか詳細は不明であったが、この系において Wnt-3a が原条の細胞への分化を、レチノイン酸・アクチビンが原条の細胞から内胚葉への分化を誘導することが示された。特にレチノイン酸の初期内胚葉分化への関与についてはこれまで報告されておらず、初期内胚葉分化のレチノイン酸シグナルによる制御を示唆する新たな知見である。

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