

論文内容の要旨

論文題目

Induction of ciliated cells from mouse embryonic stem cells and the analysis of the differentiation mechanisms

(マウス胚性幹細胞を用いた繊毛細胞の分化誘導とそのメカニズムの解析)

氏名 西村 佑介

繊毛細胞は呼吸器系や生殖器官、脳室など生体内の様々な器官に存在し、主に物質の輸送に寄与している。繊毛細胞の機能が低下すると、呼吸器系では気管支拡張症、生殖器官では不妊症、脳室では水頭症が発症することから、繊毛細胞は生体内で重要な働きを担っていると考えられる。繊毛の形成過程の研究は電子顕微鏡を用いてよく行われてきたが、どのような因子がその形成過程を制御しているのか、また、繊毛細胞への細胞運命の決定はどのように行われるのかについては不明な点が多い。これまでの繊毛細胞の分化の研究は主に初代培養を利用した方法で行われてきた。しかしながら、初代培養では発生初期の細胞分化の過程を解析することは困難であるため、発生初期分化を解析できる培養法の確立が必要であった。

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は分化全能性を持つことから、様々な細胞や組織の発生過程を解明するための有力なツールとして注目されている。ES 細胞の *in vitro* での主な分化誘導の手法の一つとして、胚様体を用いる手法がある。胚様体とは *in vitro* で ES 細胞の細胞塊を形成させることで三胚葉に分化させたものであり、胚様体の形成は正常な胚発生を反映していると考えられているため、胚様体を用いた繊毛細胞の分化誘導系の確立は繊毛細胞の発生初期分化を解析する上で非常に有用である。

第一章において私はマウス胚性幹細胞を用いた繊毛細胞の分化誘導法の確立を行った。牛胎児血清 (FBS) は ES 細胞から様々な細胞種へ分化誘導する際に広く用いられている。私はまず FBS 培地を基礎培地として様々な成長因子を添加し、培養条件の検討を行った。しかしながら、いずれの場合も繊毛マーカーはほとんど発現せず、繊毛細胞の分化は認め

られなかった。ここで私は、FBS は ES 細胞の分化誘導系に広く用いられているが、FBS 培地では繊毛細胞を分化誘導しにくいために、これまで繊毛細胞への分化誘導の報告がなかったのではないかと考えた。そこで次に私は様々な無血清培地 [Insulin-transferrin-selenium-A (ITS-A) 培地、B-27 培地、Knockout serum replacement (KSR 培地)] を用いて培養条件の検討を行った。繊毛細胞マーカー遺伝子である *Foxj1* の発現を RT-PCR で調べたところ、いずれの無血清培地でも発現が上昇した。特に KSR 培地を用いた場合には *Foxj1* の強い発現が認められ、繊毛様運動を示す細胞が観察された。この細胞の同定を行ったところ、これらの細胞は繊毛様構造を持ち、さらに電子顕微鏡による観察の結果、運動毛に特有の微小管配列である 9+2 構造が観察されたことから、この細胞は繊毛細胞であることが確認された。

分化誘導された繊毛細胞は繊毛の形態から二種類に分類できた。一方は繊毛の長さが比較的長く、繊毛の数が少ない細胞 (Type I)、もう一方は繊毛の長さは比較的短く、繊毛の数が多き細胞 (Type II) であった。繊毛細胞は生体内の様々な器官に存在しているが、一細胞から多数の繊毛が生えていること、9+2 構造を持つことから、分化誘導された繊毛細胞は脳室、呼吸器系、生殖器官の繊毛細胞であることが考えられた。そこで、脳室の繊毛細胞で発現している *Musashi1* の免疫染色を行ったところ、Type I の繊毛細胞は陽性、Type II の繊毛細胞は陰性であった。この結果は Type I の繊毛細胞は脳室の繊毛細胞であることを示している。さらに、KSR 培地で培養した胚様体の遺伝子発現を RT-PCR で調べた結果、呼吸器系マーカー遺伝子である *TTF-1* や *SP-C* の発現が認められたことから、Type II の繊毛細胞は呼吸器系もしくは生殖器官の繊毛細胞であることが示唆された。

また、繊毛細胞の分化効率を FACS を用いて調べたところ、FBS 培地では 1% 以下であったのに対し、KSR 培地では約 10% であった。そこで、繊毛細胞の分化効率を上昇させる目的で、様々な成長因子での処理を行った結果、いずれの成長因子も分化効率を上昇させる効果は認められなかったものの、BMP が繊毛細胞への分化を著しく抑制する効果を持つことが明らかになった。この BMP の繊毛細胞の分化に対する抑制効果は胚様体接着後の 2 日間に限定されていた。さらに BMP は繊毛細胞の分化を抑制する一方で、呼吸器系上皮細胞の一種であるクララ細胞のマーカー遺伝子 *CC10* の発現を上昇させた。これらの結果は BMP が繊毛細胞とは別の細胞系譜に分化させた結果、繊毛細胞の分化が抑制された可能性を示唆している。

第二章において私は牛胎児血清の繊毛細胞の分化に対する抑制機構の解析を行った。第一章で、細胞生存の最少培地である ITS-A 培地での *Foxj1* の発現が FBS 培地でのそれよりも高かったことから、FBS には繊毛細胞の分化を抑制する因子が含まれていることが予想された。そこで KSR 培地に様々な濃度の FBS を添加したところ、繊毛細胞マーカーの発現は FBS 濃度依存的に減少したことから、FBS は繊毛細胞の分化を抑制する因子を含むことが示された。また、この FBS の繊毛細胞の分化に対する抑制効果は胚様体接着直後の 2 日間に限定されていた。このように、FBS の抑制効果を持つ時期が BMP のそれと一致していたことから、FBS に含まれる繊毛細胞の分化抑制因子は BMP である可能性が考えられた。

BMP シグナルは BMP により活性化されたレセプターが、細胞内シグナル伝達分子である Smad1/5/8 をリン酸化し、Smad4 とヘテロダイマーを形成し核内へ移行することで下流の遺伝子発現を制御する。まず Smad1 のリン酸化を調べた結果、FBS 存在下では Smad1 がリン酸化されていた。この結果は FBS が BMP シグナルを活性化できることを示している。次に私は抑制型 Smad として知られている Smad7 を用いて BMP シグナルを抑制することを試みた。テトラサイクリン制御によって一過性に Smad7 を強制発現できる ES 細胞を樹立し、Smad7 を強制発現させると、FBS 培地においても各種繊毛マーカーの発現が上昇し、さらに繊毛細胞も観察された。この分化した繊毛細胞は Type I の繊毛細胞であり、Type II の繊毛細胞は認められなかった。これらの結果より、FBS は BMP シグナルを介して繊毛細胞への分化を抑制していると考えられ、Type I の繊毛細胞の分化は BMP シグナルをオフにするだけで十分であるが、Type II の繊毛細胞の分化は他のシグナルも関与している可能性が考えられる。

第三章において私は、本研究で確立した繊毛細胞への分化誘導系を利用し、繊毛関連遺伝子 (*Foxj1*, *Foxa2*, *Centrin4*) の繊毛細胞の分化における機能の解析を行った。*Foxj1* は繊毛形成に必須の転写因子であり、欠損すると繊毛が消失することが知られている。*Foxj1* を発現させた結果、KSR 培地、FBS 培地で培養した胚様体共に、多くの繊毛マーカーの発現レベルは上昇し、さらに免疫染色により繊毛細胞が確認された。これらの結果は、*Foxj1* は様々な繊毛マーカー遺伝子の発現を制御し、*Foxj1* の発現のみで繊毛細胞へ分化させる能力を持ち得ることを示している。

また、*Foxa2* の繊毛細胞の分化への影響についても調べた。*Foxa2* は呼吸器系の形成に必須の転写因子であるが、繊毛細胞の分化との関わりには不明な点が多い。*Foxa2* を発現させた場合においても、FBS を含む培養条件で *Foxj1* を含む多くの繊毛マーカーの発現上昇が認められた。*Foxj1* は単独で多くの繊毛マーカーを上昇させる能力を持つため、*Foxa2* は *Foxj1* の発現を介して、繊毛細胞の分化が促進された可能性が考えられる。また、呼吸器系マーカー遺伝子の発現上昇が認められたことから、*Foxa2* により呼吸器系への分化が促進された結果、繊毛細胞の分化が促進された可能性が考えられる。

Centrin は中心小体に局在するタンパク質であり、マウスでは 4 つのアイソフォームが同定されている。*Centrin4* は繊毛細胞に特異的に発現することが知られているが、その機能は知られていない。そこで、私は *Centrin4* を強制発現、ノックダウンの実験を行った。しかしながら、*Centrin4* を強制発現させても、繊毛細胞の分化の促進は起こらず、また、ノックダウンを行っても繊毛細胞の分化の阻害は起こらなかった。

本研究において私は、マウス ES 細胞を無血清培地で接着培養することで繊毛細胞が分化することを示した。また、FBS は繊毛細胞の分化を抑制する効果を持ち、その効果は BMP シグナルを介していることを明らかにした。さらに、私はマウス ES 細胞からの繊毛細胞への分化誘導系を利用し、繊毛細胞関連遺伝子の解析を行い、*Foxj1* と *Foxa2* が繊毛細胞の分化を促進すること、*Centrin4* が繊毛細胞の分化に必須ではないことを示した。本研究で確立されたマウス ES 細胞を用いた繊毛細胞の分化誘導系は、これまで困難であった発生初期の繊毛細胞の分化メカニズムの解析に有用であると考えられる。