

氏 名	か とう たけ お 加 藤 竹 雄
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3022 号
学位授与の日付	平 成 18 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	A neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. (Neurosphere 由来因子である Cystatin C は ES 細胞から神経幹細胞への分化をサポートする)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 山 中 伸 弥

論 文 内 容 の 要 旨

ES 細胞はあらゆる細胞、組織への分化する多分化能と、自己増幅能を有する細胞であり、再生医療において有用な細胞として注目されている。近年、ES 細胞から種々の組織系列への分化誘導の研究が盛んに行われるようになっているが、特定の組織系列への特異的誘導、更には成熟細胞ではなく未熟細胞である組織幹細胞への誘導に関する基盤技術開発は再生医学、再生医療の発展に必須である。今回、私は ES 細胞と神経幹細胞とを共培養する事によって、無血清下にて効率良く神経幹細胞へ分化誘導する事ができた。更にその神経幹細胞から分泌されるタンパク質である Cystatin C がこの分化誘導の過程において重要な役割を持つ事が示唆された。

GFP で標識された ES 細胞を分離した Primary neurospheres の細胞と無血清、浮遊下で21日間共培養した。21日目に形成された sphere を分離し、GFP で抽出した後、再度7日間、無血清浮遊培養を施行して形成された ES 細胞由来の sphere の特徴を解析した。この sphere は神経幹細胞として定義される神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統に分化する多分化能と、少なくとも9継代まで自己増殖する自己増幅能を示す事を示された。更に RT-PCR 法によってその形成された sphere は他の系統の遺伝子の発現は認められず、神経幹細胞に類似した遺伝子発現が認められた。

Primary neurosphere culture の培養上清を加える事によって、無血清浮遊培養下で ES 細胞は神経幹細胞との共培養によって形成された sphere と同様の性質を有する neurosphere を形成する事が可能であった。ことから、神経幹細胞から分泌する因子(NDF:Neurosphere-derived factor)が ES 細胞を神経幹細胞へ分化誘導する上で重要な働きを持つ事が示唆された。そこで、その培養上清中の NDF の精製、解析を行ったところ、NDF はタンパク質であり、そのタンパク質の1つが Cystatin C である事が判明した。さらに Cystatin C を加える事で ES 細胞を効率良く、神経幹細胞へ分化誘導する事が可能である事が判明した。この Cystatin C を加えることによって形成された ES 細胞由来の神経幹細胞を新生児マウスの脳室内へ移植したところ、脳室周囲に生着し、かつ腫瘍形成は認められなかった。Cystatin C を加えず形成された ES 細胞由来の sphere は多分化能、また自己増幅能も認められなかったことから、ES 細胞から神経幹細胞への分化過程において重要な役割を担っている事が推測された。

以上の結果から、無血清培養条件下で、同定された因子である Cystatin C を用いて、効率よく ES 細胞より神経幹細胞を作成する基盤技術を開発した。ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞は新生児マウスの脳室内移植を施行したところ、腫瘍形成なく生着する事が確認された。この基盤技術は、従来の方法と比し安全、かつ効率良く神経幹細胞へ誘導することが可能であることから、今後の ES 細胞を用いた中枢神経疾患における再生医療において非常に有用であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、ES 細胞と初代神経幹細胞とを共培養する事によって、無血清下に効率良く神経幹細胞へ分化誘導する基盤技術の検討を行った。

GFP で標識された ES 細胞を初代神経幹細胞と無血清、浮遊下で21日間共培養した。21日目に形成された sphere を分離し、GFP で抽出した後、再度7日間、無血清浮遊培養を施行して形成された ES 細胞由来の sphere の特徴を解析した。この sphere は神経幹細胞として定義される多分化能と、自己増幅能を有する事が示された。

神経幹細胞の培養上清を加える事によって、neurosphere を形成する事が可能であったことから、神経幹細胞から分泌する因子が ES 細胞を神経幹細胞へ分化誘導する上で重要な働きを持つ事が示唆された。そこで、その培養上清中の目的因子の精製、解析を行ったところ、その1つが Cystatin C であり、Cystatin C を加える事で ES 細胞を効率良く、神経幹細胞へ分化誘導する事が可能である事が判明した。Cystatin C を加えず形成された ES 細胞由来の sphere は多分化能、また自己増幅能も認められなかったことから、ES 細胞から神経幹細胞への分化過程において重要な役割を担っている事が推測された。

以上の結果から、無血清培養条件下で、同定された因子である Cystatin C を用いて、効率よく ES 細胞より神経幹細胞を作成する基盤技術を開発した。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成18年10月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた者である。