

京都大学	博士（医学）	氏 名	池田 華子
論文題目	Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells (胚性幹細胞から神経網膜前駆細胞への分化誘導)		
(論文内容の要旨)			
マウス胚性幹細胞（ES 細胞）から神経網膜前駆細胞への試験管内での分化条件を検討した。ES 細胞を、SFEB(serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates)という浮遊培養法で分化させると、90%以上の細胞が神経細胞に分化し、しかもその多くが前方の中樞神経（前脳）の特徴をもつことがわかっていた。網膜組織は、発生の初期の段階で、前脳（間脳）の一部が突出した眼胞から分化することが知られている。したがって、SFEB 法を改変することで、ES 細胞から網膜細胞（特に視細胞）を分化誘導することが可能になるのではないかと考えた。 Rx は眼領域に特異的に発現する転写因子であることより、この発現を指標にいろいろな条件を試みた。その結果、SFEB 法に、0 日目から 5 日目まで Wnt の阻害剤である Dkk と Nodal の阻害剤である Lefty を、3 日目から 5 日目まで血清を、4 日目から 6 日目までアクチビンを加えることで (SFEB/DLFA 法)、マウス ES 細胞からもっとも効率よく、Rx 陽性を示す細胞が分化誘導されることがわかった (分化 8 日目、全細胞の 16%)。この条件で誘導された Rx 陽性細胞は、Pax6 や Otx2 をも共発現しており、Ki67 や BrdU 取り込みに陽性を示す、分裂期の細胞であり、神経網膜の前駆細胞としての特徴と一致した。 そこでさらに培養期間をのばし、視細胞の前駆細胞で特異的に発現する Crx や、視細胞で特異的に発現するロドプシンを発現する細胞の出現を調べたが、ごくまれに見られるに過ぎなかった。幼弱な網膜前駆細胞に Crx 遺伝子を強制発現させるとロドプシンを発現することが知られていたため、SFEB/DLFA 処理をした ES 細胞由来の細胞に、レンチウイルスを使用して Crx を強制発現させた。その結果、多くの細胞でロドプシン蛋白が発現することがわかった。 ついで、マウス胎仔網膜との共培養にて生体内での分化環境に擬似させることで、遺伝子導入なしに ES 細胞由来の細胞を視細胞へ分化させることができるか試みた。その結果、36%もの ES 由来細胞がロドプシン陽性となり、さらに、視細胞の他のマーカーであるリカバリンをも発現していた。このことより、適切な条件を整えれば、SFEB/DLFA 法で分化誘導された神経網膜前駆細胞は、効率よく視細胞に分化することがわかった。 最後に、ES 細胞由来のロドプシン陽性細胞が、移植された際に移植網膜に定着する能力をもっているかを調べるため、網膜の器官培養を用いた実験を行った。器官培養された胎仔網膜の下に、分化誘導された ES 由来の細胞を置き、12 日間培養したところ、ES 由来の細胞は、網膜の各層に入り込んでいた。そのうち 10%の細胞が、視細胞層に存在し、その 37%ではロドプシンが陽性であった。一部の細胞では、視細胞の光受容に大切な外節様の構造をも認めた。興味深いことに、ロドプシン陽性の ES 由来の細胞は、ほぼすべてが視細胞層に存在していた。このことより、ES 細胞由来の視細胞は、選択的に網膜の視細胞層に定着することが明らかになった。さらに、網膜の内顆粒層に侵入した細胞の一部では、ミュラーグリアや双極細胞のマーカーを発現し、神経節細胞層に侵入した細胞の一部では、神経節細胞のマーカーを発現していた。 このように、マウス ES 細胞を SFEB/Dkk/Lefty/血清/アクチビンで処理することで、神経網膜前駆細胞が効率に誘導され、それらの細胞はさらに、視細胞へと分化可能であることが明らかになった。			

(論文審査の結果の要旨)			
網膜変性疾患の多くは視細胞の変性による不可逆的な視力低下を特徴とするため、視細胞を試験管内で効率よく産生できれば、病態の解明・治療に貢献すると考えられる。しかしこれまで、E S 細胞から網膜細胞への効率よい分化は困難であった。本論文ではSFEB（serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates）という神経前駆細胞の分化方法に改変を加え、マウス E S 細胞から網膜細胞への効率よい分化を試みた。 SFEB法にDkk、Lefty、血清、アクチビンを加えると、眼領域に特異的な遺伝子であるRxを発現する細胞が、効率よく分化する事がわかった。この細胞は、Pax6を共発現し、神経網膜前駆細胞としての特徴を示した。胎仔網膜との共培養により、この細胞からロドプシン陽性の視細胞が効率よく分化した。また、胎仔網膜の器官培養との共培養では、E S 由来の細胞は網膜の各層に取り込まれ、視細胞様の形態を示すものも存在した。以上から申請者は、マウス E S 細胞をSFEB/Dkk/Lefty/血清/アクチビンで処理する事で、神経網膜前駆細胞が高率に誘導され、それらの細胞は視細胞へと分化可能であり、移植に際して定着する能力をもつ事を明らかにした。 以上の研究はE S 細胞からの神経網膜前駆細胞の効率よい分化誘導法の解明に貢献し網膜再生医療の発展に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとみとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成20年3月18日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			