

氏 名	た だ しん すけ 多 田 真 輔
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2960 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 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	Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture (マウス ES 細胞分化系における中内胚葉の同定, 中内胚葉から胚性内胚葉・中胚葉への分化誘導法の確立)
論文調査委員	(主 査) 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 中 辻 憲 夫

論 文 内 容 の 要 旨

内胚葉と中胚葉への二分化能をもつ中内胚葉 (Mesendoderm) という概念は, 線虫やゼブラフィッシュにおいてすでに確立されている。一方マウス初期発生においても, 原始線条前方端から内胚葉と中胚葉の一部が生じることが, 移植実験などにより明らかにされている。このことはマウスの“オーガナイザー”領域に内胚葉かつ中胚葉への二分化能をもつ中内胚葉が存在している可能性を示唆している。しかしながら, この領域の細胞を十分に獲得することが非常に困難であるなどの点から, マウス胚における中内胚葉の存在やその分化経路について, より詳細に検討することができなかった。実際, 肝細胞や膵β細胞が発生する前方内胚葉は中内胚葉から分化するため, 中内胚葉を同定することは中内胚葉から内胚葉への分化経路の評価に極めて重要であり, 将来的には再生医療のための成熟内胚葉系細胞誘導法の確立につながると考えられる。そこでマウス ES 細胞分化系において, 中内胚葉を選択的に誘導かつ同定し, 内胚葉・中胚葉へいたる分化経路を確立することを目的とし, 以下の研究を行った。

まずオーガナイザー遺伝子の一つ Goosecoid (以下 Gsc) に着目した。Gsc 遺伝子座に GFP マーカー遺伝子を導入したヘテロの ES 細胞を作製し, 選択的に Gsc が誘導される培養条件を検討した。フローサイトメトリーによる解析, オーガナイザー遺伝子の発現パターンやテトラプロイドキメラ胚の作製により, GFP と Gsc の発現が一致していることを確認した。この ES 細胞を無血清下でアクチビンを加えコラーゲン type IV 上で二次元培養することにより, 分化4日目には65%, 分化6日目には93%の Gsc 陽性細胞を選択的に誘導することに成功した。また Gsc 陽性細胞の分化経路は, E-cadherin (以下 ECD) と PDGFRα (以下 αR) の発現によって定義された。この分化条件において分化4日目に Gsc⁺ECD⁺αR⁺ 細胞分画が選択的に誘導され, さらに1-2日間で Gsc⁺ECD⁺αR⁻ 分画と Gsc⁺ECD⁻αR⁺ 分画に分化していった。Gsc⁺ECD⁺αR⁻ 分画は Foxa2, Sox17 などの内胚葉系マーカーを特異的に発現し, 肝細胞への分化条件でアルブミン陽性細胞が誘導された。Gsc⁺ECD⁻αR⁺ 分画は Cadherin-11 や VEGFR2 などの中胚葉系マーカーを特異的に発現し, 骨細胞や血管内皮細胞などの中胚葉系細胞へ分化する能力をもつことが示された。さらに, 分化4日目の Gsc⁺ECD⁺ 細胞分画の single cell 培養にてクローナル解析を行い, この分画が内胚葉・中胚葉への二分化能をもつことを証明した。

以上の結果, アクチビンを含んだ無血清培養条件下において選択的に誘導された Gsc⁺ECD⁺αR⁺ 分画を中内胚葉と定義し, Gsc⁺ECD⁺αR⁻ 胚性内胚葉と Gsc⁺ECD⁻αR⁺ 中胚葉へ分化することを示した。また Gsc⁺ECD⁺ 分画の細胞を血清含有条件下で培養することにより, 内胚葉系マーカーの発現が維持された, 長期間継代可能な内胚葉系培養細胞株を確立した。更には, ノックインなどの手法を使用せず wild-type の ES 細胞を用いた場合においても, ECD や αR の発現によって中内胚葉を純化しうることも確認した。

従って, マウス ES 細胞から中内胚葉を選択的に誘導可能なこの培養系は, 成熟内胚葉系細胞へ向かう次の分化段階において必要な培養条件を検討するのに非常に有用であり, 今後ヒト ES 細胞の分化誘導法にも応用しうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

マウス胚初期発生において、オーガナイザー領域に内・中胚葉への二分化能をもつ中内胚葉が存在する可能性が示唆されているが、その存在や分化経路の詳細な検討はなされていない。そこで申請者らは、マウス ES 細胞分化系において中内胚葉を選択的に誘導かつ同定し、内・中胚葉へいたる分化経路を確立することを目的とし研究を行なった。

まずオーガナイザー遺伝子 Goosecoid (Gsc) に着目し、Gsc 遺伝子座に GFP マーカー遺伝子を導入したヘテロの ES 細胞を作製した。この ES 細胞を無血清下にアクチビンを加えコラーゲン IV 上で培養すると、Gsc が選択的に誘導された。さらにフローサイトメトリー解析, fate 解析, single cell アッセイなどにより、同培養条件下において分化誘導された 4 日目の Gsc+E-カドヘリン(ECD)+PDGFR α (α R)+細胞分画を中内胚葉と定義し、次いでこの中内胚葉が Gsc+ECD+ α R-胚性内胚葉と Gsc+ECD- α R+中胚葉に分化していくことを証明した。最終的に、wild-type ES 細胞を用いた場合においても ECD や α R の発現によって中内胚葉を純化できることも確認した。

以上の研究は、マウス ES 細胞分化系における中内胚葉の同定及び胚性内胚葉・中胚葉への分化誘導法の解明に貢献し、再生医療のための成熟内胚葉系細胞分化誘導の確立やヒト ES 細胞分化系への応用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認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年2月25日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。