

氏 名	わた なべ き いち 渡 邊 毅 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2862 号
学位授与の日付	平 成 17 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Directed Differentiation of Telencephalic Precursors from Embryonic Stem Cells. (胚性幹細胞からの終脳前駆細胞の分化誘導に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 山 中 伸 弥

論 文 内 容 の 要 旨

近年の両生類を中心とした分子発生学的研究により、Chordin などの神経誘導因子が同定され、初期神経発生の分子機構が明らかになってきた。一方、哺乳類の初期神経発生の分子機構についてはほとんどわかっていない。原因として、胎生であること、胚が小さいことに加えてアフリカツメガエルでよく用いられるアニマルキャップアッセイのような *in vitro* の実験系が哺乳類には存在しなかったということが考えられた。マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は、一つの個体を形成するあらゆる種類の細胞に分化しうる能力を持つ。従って ES 細胞を用いた *in vitro* の分化系は哺乳類の神経誘導を研究する実験系として有用であると考えられた。

ES 細胞から神経を分化させる最も古くから知られる方法は血清存在下でレチノイン酸を加える方法である。しかし、レチノイン酸は神経誘導活性以外に神経組織の後方化活性も有しているため終脳などより前方の神経細胞の誘導は困難であった。一方、以前我々によって確立された SDIA 法は ES 細胞を PA6 と呼ばれるフィーダー細胞と共培養することによってほぼ選択的に神経細胞を分化誘導することができる。しかし、やはり SDIA 法では終脳は誘導困難であった。理由として、フィーダー細胞由来の何らかの終脳分化に対して抑制的な因子の存在が考えられた。そこで、より不確定要素を減らした実験系として、レチノイン酸やフィーダー細胞等を用いずに、ES 細胞から神経細胞を分化誘導する系を確立し考察を加えた。

いくつかの血清を用いない培養条件の検討の結果、KnockOut Serum Replacement を用いた培養液中で ES 細胞を浮遊培養すると、細胞塊を形成し効率よく増殖することが明らかとなった。またこの条件で 5 日間培養すると約 70% の細胞が初期神経上皮のマーカーである Sox1 陽性細胞であった。この方法を SFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates) 法と命名し、さらに詳細な解析を行った。まず SFEB 培養条件において Dkk (Dickkopf)-A1 を用いて Wnt シグナルを、Lefty-A を用いて Nodal シグナルを抑制すると、神経分化の効率は 90% に上昇した。

次に、分化した神経細胞に対して各領域特異的マーカーで免疫染色した結果、Dkk-1 や Lefty-A を加えない条件下で、分化 10 日目において約 15% の細胞が終脳前駆細胞特異的マーカーである Bfl 陽性細胞であった。*in vivo* において、先述の Wnt シグナルや Nodal シグナルは神経の後方化シグナルとしても知られている。そこで、Dkk-1, Lefty-A を用いてこれらのシグナルを阻害したところ、Bfl 陽性細胞の割合は 30% 以上に上昇した。

次に、分化誘導された Bfl 陽性細胞が既知の神経個性付け因子に対する反応性を有するかどうか検討した。*in vivo* において Bfl 陽性の終脳前駆細胞のうち背側の細胞は Pax6 陽性、腹側の細胞は Gsh2 や Nkx2.1 陽性であることが知られている。まず、SFEB 分化後期に背側化因子である Wnt3a を培養液に加えたところ、Bfl 陽性細胞中の Pax6 陽性細胞が増加し、逆に Nkx2.1 陽性細胞は減少した。一方で、腹側化因子である Shh を加えると Nkx2.1 陽性細胞が増加し、逆に、Pax6 陽性細胞が減少した。

以上より本研究によって、①レチノイン酸やフィーダー細胞を用いない ES 細胞からの神経分化系の確立、②既知の神経個性付け因子に反応性を有する終脳前駆細胞の誘導、以上のことが示された。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の初期神経発生分子機構については有効な *in vitro* の実験系が存在しないため不明な点が多かった。最近、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）を用いた方法は *in vitro* での神経分化を再現する新しい実験系として注目されているが、その分化制御は困難である点も未だ多い。本研究では、無血清培地中で ES 細胞塊を浮遊培養することで、これまでしばしば使用されてきたレチノイン酸やフィーダー細胞を用いることなく ES 細胞から神経細胞を分化誘導する方法、「SFEB 法」を確立した。さらに分化初期に Wnt シグナルおよび Nodal シグナルを抑制することで 90% の効率で神経分化させることに成功した。また同時に、これまでの方法では分化誘導が困難とされてきた終脳細胞について、その前駆細胞のマーカーである Bfl を示標に、35% の効率で分化誘導することに成功した。また、このようにして誘導された Bfl 陽性終脳前駆細胞は、Wnt や Shh などの神経個性付け因子に対する反応性を持つことも示された。たとえば、分化誘導後期に wnt シグナルを加えることで終脳背側領域（大脳皮質）の前駆細胞に、また Shh を加えることで終脳腹側領域（大脳基底部）の前駆細胞に分化することが示された。このように本研究では、(1)レチノイン酸やフィーダー細胞を用いない ES 細胞からの神経分化系の確立、(2)胎児の終脳前駆細胞と同様のマーカー発現や反応性を示す細胞の ES 細胞からの分化誘導、に成功した。

以上の研究は、哺乳類における初期神経分化分子機構の解明に貢献し、また今後大脳発生の分子機構や大脳に関連した疾患発症機序の解明に寄与する可能性が高い。

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17年2月21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。