京都大学	博士（医学）	氏　名	林　英樹
論文題目	Meningeal cells induce dopaminergic neurons from embryonic stem cells (髄膜細胞は ES 細胞からドーパミン産生神経を誘導する。)		

（論文内容の要旨）

骨髄間質細胞に由来する細胞株である PA6 との共培養により ES 細胞から中脳ドーパミン産生神経が誘導され、Stromal cell-derived inducing activity(SDIA)法と呼ばれる。これまで、SDIA 法を用いてサル ES 細胞からドーパミン産生神経を誘導し、パーキンソン病モデルのサルに移植することにより機能が改善することが報告されており、今後の臨床応用が期待される。しかし、PA6 細胞はマウス由来であるため、臨床に応用するためには SDIA 法の機序を解明し、定義された因子を使用しなければならない。

まず、将来、硬膜・くも膜・軟膜に分化するマウス胎生 14 日の髄膜細胞を一次培養した。髄膜細胞のフィーダーを作成してマウス ES 細胞との共培養を行うと、ドーパミン産生神経（tyrosine hydroxylase:TH 陽性）が誘導されることを発見した。マウス ES 細胞からドーパミン産生神経への誘導効率は全細胞に対する TH 陽性率で 14.8%であった。En1, Pitx3, Nurr1, AADC, Girk2 の免疫細胞染色を行い、誘導された TH 陽性細胞が中脳由来であることを確認した。高濃度カリウム刺激によるドーパミンの放出を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて評価し、誘導されたドーパミン産生神経が正常な機能を有することを確認した。また、ヒト ES 細胞でも免疫細胞染色および RT-PCR にて中脳ドーパミン産生神経への分化を認め、HPLC にてドーパミンが放出されることを確認した。

次に、マウス胎生 14 日から生後 2 日の発生段階の異なる髄膜細胞とマウス ES 細胞を共培養して免疫細胞染色、HPLC 、RT-PCR にて評価を行った。発生が進んだ髄膜ほど ES 細胞から誘導される神経細胞（Tuj1 陽性）を増加させたが、全神経細胞に対するドーパミン産生神経の割合および ドーパミン定量においては胎生 18 日の髄膜細胞が最も高いドーパミン産生神経の誘導効率を示した。RT-PCR にてドーパミン産生神経のトランスポーターである DAT が胎生 18 日の髄膜細胞で強く発現していることから、胎生 18 日の髄膜細胞はドーパミン産生神経を成熟させる作用が強いものと考えられた。また、ドーパミン産生神経誘導に重要な既知の遺伝子である Shh, FGF-8, Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a, TGF-β3 の発現を RT-PCR にて確認したところ、髄膜細胞と PA6 細胞の両方に Wnt-5a と TGF-β3 のmRNA の発現が認められた。異なる時期の髄膜細胞における Wnt-5a と TGF-β3 のmRNA の発現量を real-time RT-PCR を用いて定量した。mRNA の発現量とドーパミン産生神経の誘導能を比較すると TGF-β3 では相関を認めなかったが、Wnt-5a においては胎生 18 日目で発現量が最も多く相関を認めた。

Wnt-5a の SDIA 法における働きを調べるために、Matrigel 上での ES 細胞の培養を行った。ヘパリンで回収した PA6 の conditioned medium を加えるとドーパミン産生神経が誘導されるが、Wnt5a の抗体で中和するとドーパミン産生神経の誘導が抑制された。また、Wnt5a を培地に添加することによりドーパミン産生神経が濃度依存性に誘導されることを示した。

これらの結果より、髄膜細胞は ES 細胞をドーパミン産生神経に誘導し、Wnt5a がドーパミン産生神経の誘導に重要な役割を担っていることが示された。今後、SDIA 法の機序の解明が進むことにより、完全合成培地による ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導方法の確立が期待される。

（論文審査の結果の要旨）

骨髄間質細胞であるPA6との共培養によりES細胞から中脳ドーパミン産生神経が誘導され、Stromal cell-derived inducing activity (SDIA)法と呼ばれる。パーキンソン病に対する移植治療への応用が期待されるが、PA6はマウス由来であって臨床には使えないためSDIA法の機序の解明が必要である。

マウスおよびヒトES細胞をマウス胎生14日の髄膜細胞と共培養すると、中脳ドーパミン産生神経が誘導された。ドーパミン産生神経誘導に重要な6つの遺伝子のうちWnt-5aとTGF-β3が髄膜細胞とPA6細胞に共通して発現していた。胎生14日から生後4日の髄膜細胞で比べると、胎生18日で最も高い誘導能を認め、Wnt-5aの発現量はこの誘導能に相関していた。また、マトリゲル上でES細胞の培養を行うとPA6馴らし培地の添加でドーパミン産生神経が誘導されるが、この効果はWnt-5aの中和抗体で抑制された。また、培地にWnt-5aを添加すると濃度依存性にドーパミン産生神経が誘導された。

これらの結果より、髄膜細胞によるES細胞のドーパミン産生神経への分化誘導能およびSDIA法におけるWnt-5aの役割が示され、完全合成培地による神経誘導法の確立が期待される。

以上の研究はES細胞からのドーパミン産生神経誘導機序の解明に貢献し再生医学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のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成20年3月10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