京都大学	博士（医学）	氏　名	綿谷　崇史
論文題目	Minimization of Exogenous Signals in ES Cell Culture Induces Rostral Hypothalamic Differentiation (外因性シグナル因子を含まない培地を用いた胚性幹細胞から吻側視床下部組織 への分化誘導)		

（論文内容の要旨）

視床下部は生体の恒常性を制御する最高中枢であり、血圧、体温、摂食、睡眠などをはじめとする生体機能を調節している。そのため、その機能異常はホルモン異常や摂食障害など多くの疾患に関連する。近年、視床下部に関連する新規ペプチドや遺伝子機能などが解明されつつあるが、これまで試験管内での効率よい実験系が少なかったために、詳細な機能解析や疾患の研究に困難が伴っていた。

胚性幹細胞（ES 細胞）は、神経細胞などの多様な細胞に分化する能力を持つ多能性細胞であり、損傷した中枢神経の機能回復のための再生医療の材料を提供するとともに、各種 *in vitro* 解析等にも医学の研究における期待が高い。

本研究では、これまで成功していなかったES細胞から機能的な視床下部細胞の分化誘導のための条件を確立した。

マウスES細胞を用いてSFEB(Serum free culture of embryoid body like aggregates)法と名付けられている無血清培養法を行うと、90%以上の細胞が神経前駆細胞となり、そのうちの約 40%の細胞が終脳前駆細胞に分化する。視床下部は終脳のごく近傍に位置するのにも関わらず、SFEB 法、および SFEB 法に各種シグナル因子を添加した培養法において、視床下部に特異的なマーカー分子の発現は殆ど認められなかった。そこで、この培養系に視床下部分化を阻害する何らかの因子が含まれていると仮定し、SFEB 法の完全化学合成培地化を試みた。その結果、無血清細胞培養において広く添加物として用いられているインスリンが視床下部細胞への分化を抑制していた事が判明した。このインスリンなどの成長因子を全く含まない合成培地を用いて SFEB 法を行うと、終脳前駆細胞はほとんど認められず、Rax などの視床下部特異的なマーカー分子を発現する前駆細胞が著しく増加することが明らかとなった。この方法をSFEB/gfCDM(growth factor-free, chemically defined medium)法と名付けた。

次に、マウスES細胞のRax遺伝子座にGFPをノックインした細胞株を作製し、SFEB/gfCDM法にて分化した GFP 陽性視床下部前駆細胞をセルソーターにて分離し、凝集塊培養を行い免疫組織学的に解析した。すると、背側視床下部に特徴的なタンパク質であるOtpなどが発現し、長期培養によって典型的な視床下部神経内分泌細胞であるバゾプレシン産生神経へと分化することが確かめられた。さらに、高カリウム脱分極刺激によりバゾプレシン分泌も確認され、機能的なバゾプレシン産生細胞であることも確認された。また、分化培養の過程で、腹側神経細胞の分化を促進するといわれているソニックヘッジホッグを作用させると、腹側視床下部神経核に特異的な SF1 神経細胞（腹内側核）、AgRP 神経細胞（弓状核）、視床下部ドパミン神経細胞（弓状核）などの特徴を有した細胞に分化することもわかった。

一方、ヒトES細胞のSFEB培養の場合、その細胞生存のためには培地へのインスリンの添加が必須であった。しかし、インスリンの細胞内下流シグナル経路の一つである PI3 キナーゼ経路のみを薬剤にて選択的に阻害することにより、細胞の生存を維持したままインスリン存在下で視床下部前駆細胞へと分化誘導できることも明らかになった。

本研究において、ES 細胞からの視床下部神経組織への選択的分化誘導法および分離法が確立された。これらの研究成果により、重要な生理機能をもつ視床下部神経細胞を試験管内で効率よく産生することが可能となり、様々な視床下部機能異常に対する病因解明、創薬、再生医療などへの応用が期待される。

（論文審査の結果の要旨）

視床下部は生体の恒常性を制御する最高中枢であり、その機能異常は多くの疾患に関連するが、効率よい実験系が少なく研究に困難が伴っていた。本研究では、胚性幹細胞(ES細胞)から機能的な視床下部細胞を分化誘導する条件を新規に確立した。

本研究において、マウスES細胞を成長因子を含まない合成培地で浮遊培養する事により、Raxなどの特異的な遺伝子を発現する視床下部前駆細胞に、40%以上の効率で分化することが明らかとなった。また、これらの細胞には背側視床下部に特徴的な蛋白質が発現し、長期培養によって生理機能を備えたバゾプレシン産生神経へと分化することが確かめられた。この分化培養の過程でソニックヘッジホッグを作用させると、腹側視床下部に特異的な神経細胞に分化することも明らかになった。

ヒトES細胞の場合には、同方法での細胞生存のためには培地へのインスリンの添加が必須であったが、インスリンにより活性化されるシグナル経路のうち、PI3キナーゼ経路のみを選択的に阻害することによりインスリン存在下で視床下部前駆細胞へと分化誘導できることも明らかになった。

これらの研究成果により、視床下部神経細胞を試験管内で効率よく産生することが可能となり、視床下部機能障害の病因解明、創薬、再生医学などへの応用が期待される。

以上の研究は視床下部分化機構の解明に貢献し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8. 月26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