

学位論文抄録

マウスES細胞を用いた三胚葉細胞の分化と、新規膵臓細胞分化誘導系の確立
(Differentiation of the mouse ES cells into three germ layers and establishment
of novel pancreatic differentiation procedure)

樋口裕一郎

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻幹細胞制御学

指導教員

桑 昭苑 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻多能性幹細胞学

学位論文抄録

【目的】胚性幹細胞(Embryonic stem cell, ES 細胞)は初期胚に由来する多能性幹細胞で、細胞系譜の決定、可塑性などの機構について試験管内で解析できる有用なモデルとなる。当研究室ではマウス ES 細胞から膵臓系譜の細胞を誘導する系として、マウス胎仔中腎由来の細胞株、M15 を支持細胞として用いる培養系を確立した。その分化誘導に関わるシグナル群を詳細に検討した結果、培養過程に加える液性因子を変える事で、外胚葉や中胚葉系譜の細胞をも分化しうる事を見出した。そこで、M15 細胞を用いて ES 細胞から誘導した三胚葉系譜の細胞が、それぞれの特性を有しているのかを確認した。また、膵臓系譜への分化過程における基底膜構造の役割に着目し、基底膜構造を用いた新たな膵分化誘導法の確立を目的に研究を行った。

【方法】M15 細胞上で分化誘導した外胚葉、中胚葉系譜の細胞について成熟化の検討を行った。また、誘導した各胚葉系譜の細胞をフローサイトメーターを用いて純化し、その網羅的遺伝子発現解析を行う事で ES 由来各胚葉細胞の特性を比較した。膵分化誘導については支持細胞を用いない培養系として、擬似基底膜を用いる分化誘導法の確立を試みた。加えて、基底膜からの膵臓分化誘導メカニズムを解析する目的で、ラミニン、インテグリン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン遺伝子のノックダウン実験を行った。

【結果】M15 細胞上で添加する液性因子を変えて培養する事により、マウス ES 細胞は成熟した神経細胞や筋、骨、脂肪細胞へとそれぞれ分化誘導された。網羅的遺伝子発現解析の結果、誘導された神経外胚葉では前後軸、及び背腹軸に沿って特異的に発現する神経マーカーの発現が認められた。また、誘導した側板中胚葉、沿軸中胚葉についても同様に、それぞれのマーカー遺伝子の発現が確認された。擬似基底膜上において、ES 細胞は胚性内胚葉細胞、膵臓前駆細胞へと分化し、最終的にインスリン産生膵β細胞へと分化した。またラミニン、インテグリンの発現抑制、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現抑制と糖鎖の分解はそれぞれ優位に ES 細胞から膵臓系譜への分化を抑制した。擬似基底膜上で分化誘導した細胞をマウス腎被膜下に移植したところ、生体内で膵島様の構造を形成した。

【考察】M15 細胞を用いた分化誘導系において神経外胚葉、中胚葉、胚性内胚葉の細胞を効率的に産生できる事が示された。また、細胞外マトリックスが膵臓への分化誘導に関与しており、基底膜構成分子の抑制実験結果より、それらが膵臓分化の過程において非常に重要な役割を担っている事が示された。

【結論】M15 細胞を用いた分化誘導系は ES 細胞から三胚葉系譜の細胞が分化するメカニズムを解析するためのモデルとして、非常に有用である。また、今回新たに確立された擬似基底膜を用いる分化誘導法は支持細胞を全く使用しておらず、基底膜の細胞運命決定に与える系を解析するためのモデルとして、非常に優れている事が示された。