

研究テーマ**多能性幹細胞からの組織幹細胞の誘導とその分子メカニズムの解析**

1. はじめに

組織幹細胞はその多能性から細胞治療に利用する価値の高い細胞である。すでに臨床では、血液幹細胞を用いての骨髄移植という治療法が確立している。しかし、それ以外の幹細胞の臨床での利用については、多くの細胞で未だ研究段階である。これは、幹細胞固有の問題点によることが多い。幹細胞は依然としてその多くが、1 個体からの分離が困難でしかも少数しか分離できない。さらに、最も研究が進んでいる血液幹細胞ですら、試験管内での増殖方法について未だ開発途上にある。このような制限された供給力とその低さが、組織幹細胞の臨床利用に立ちほだかる壁である。一方、胚性幹細胞 (ES 細胞) などの多能性幹細胞は、幹細胞そのものの研究にも利用できるし、試験管内で発生過程の細胞系譜・分化を研究する優れた材料でもある。特にその多分化能力から試験管内で様々な細胞へと分化を誘導することができ、再生医療の細胞源としても期待されている。本研究では、この多能性幹細胞のもつ特徴をいかして、組織幹細胞の抱える問題を解決するために、ES 細胞から組織幹細胞である間葉系幹細胞を効率よく誘導する方法を確立し、その分化機構の解明を行うことを目的とする。ES 細胞などの多能性幹細胞から自由自在に組織幹細胞を誘導する技術が開発されれば、幹細胞の医療応用へ向けての研究は一気に飛躍する。

2. 方法

本研究では、まず、培養条件を検討するために、無血清培地に様々な増殖因子を添加し誘導条件を適正化する。このようにして得られた間葉系幹細胞の分化・増殖能力を検討する。次に、分子メカニズムを明らかにするために、中間段階の細胞 (神経上皮、神経堤細胞) を分離し、DNA アレイを用いて遺伝子発現プロファイルを作成する。このプロファイルを用いて、間葉系幹細胞に特異的な発現を示す遺伝子を探索し、候補分子のリストを作成する。候補分子の発現解析を行い、間葉系特異的な発現が見られたら、ノックアウトマウスの技術を用いてその機能を解析する。

3. 結果 研究成果

1. ES 細胞から間葉系幹細胞への分化誘導

研究代表者は、最近マウス ES 細胞から間葉系幹細胞を誘導できることを明らかとした。また、その分化経路において、神経上皮細胞と神経堤細胞がその前駆細胞であることを明らかとした(参考文献 1)。さらに、他の間葉系である中胚葉への分化誘導方法についても確立した(参考文献 2, 3)。そこで、これらの研究所見を基に、無血清培地を用いて間葉系幹細胞をマウス ES 細胞から分化を誘導する方法の開発を行った。その結果、無血清培地 (DMEM, DDM/F12) にレチノイン酸を加えた方法にて PDGFR α の間葉系細胞の分化を誘導することに成功した。現在この PDGFR α 陽性の間葉系細胞が間葉系幹細胞であるかどうかを検討中である。

2. PDGFR α 間葉系幹細胞特異的発現分子の探索

1) ES 細胞由来の PDGFR α +間葉系幹細胞に特異的に発現する分子の同定 (参考文献 4)

ES 細胞由来の中胚葉系細胞や分化誘導開始 9 日目の PDGFR α 陽性、陰性細胞やマウス胎仔 14.5 日目の神経上皮あるいは神経堤細胞由来の PDGFR α 陽性細胞を FACS にて純化し、DNA マイクロアレイを用いて、間葉系細胞や間葉系幹細胞に特異的な発現を示す分子の探索を行った(図 1)。特に候補分子の中から DNA に結合することが予想される分子 (既知の DNA 結合モチーフを有するもの) を選択し解析した。

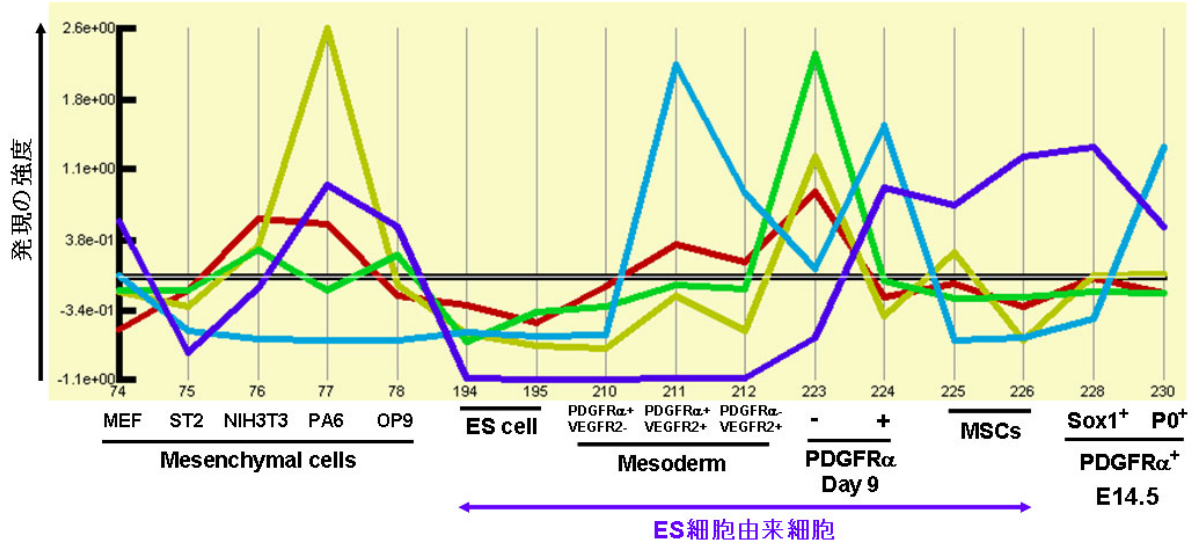


図 1 各サンプルでの遺伝子の発現のパターン、それぞれの折れ線は 1 つの転写因子に対応する。

また、発現遺伝子をサブトラクション法にて解析し、特異的に発現する分子の探索も同時に行った。

2) 候補分子の機能解析

上述の方法にて候補分子にあがった遺伝子の中から、PHD と呼ばれる DNA 結合モチーフを持ちながらまた機能の報告がない機能未知の分子について、その機構を解析するために遺伝子を破壊するノックアウトマウス(KO マウス)の作製を行った(図 2)。

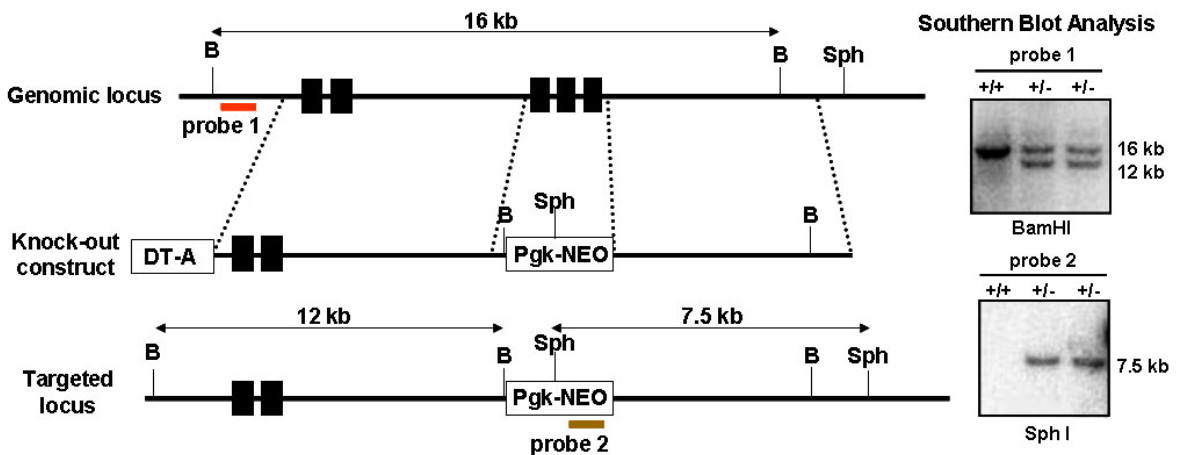


図2 KOマウス作製の遺伝子地図とサザンブロットによるKO ESクローンの確認

作製したKOマウスは、出生後すぐに死亡した。その原因は、まだはっきりしていない。現在その死因について研究を進めている。

また、間葉系細胞に対する影響を見るために14.5日目の胎仔より初代線維芽細胞 (MEF) を樹立し、その増殖能について調べた (図3)。興味深いことにKOマウス由来のMEFは、容易に不死化することが判

明した。これは、KOした分子が間葉系細胞の増殖を負に制御していることを示唆する。現在その分子メカニズムについて解析を進めている。

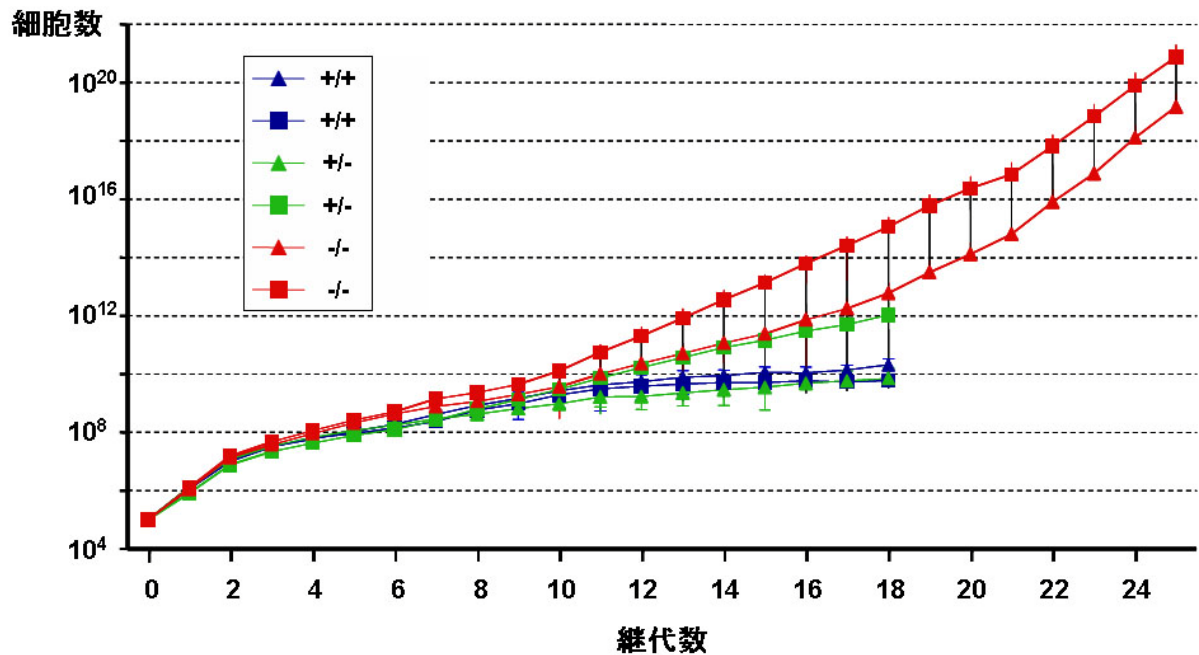


図3 初代線維芽細胞 (MEF) の増殖曲線 KOマウス由来MEFは容易に不死化する。

4. 考察 まとめ

ES細胞の間葉系幹細胞への分化誘導方法を確立し、無血清下においてもその方法を樹立した。また、この分化システムを使って機能不明分子を単離し、そのKOマウスの作製を行った。作製したマウスは出生直後致死であり、間葉系細胞の1つであるMEFが容易に不死化するという表現形を示した。現在その分子メカニズムについて解析を継続中である。本助成金があったので、この研究を進めることができた。この場を借りて深謝いたします。

5. 発表論文、参考文献

1. Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A.G and Nishikawa, S-I. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129: 1377-1388, 2007.
2. Era, T., Izumi, N., Hayashi, M., Nishikawa, S., Nishikawa, S-I. Multiple mesoderm subsets give rise to endothelial cells whereas hematopoietic cells are differentiated only from a restricted subset in ES cell differentiation culture. *Stem Cells* 26: 401-411, 2008.
3. Kitagawa, M. and Era, T. Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells. *Int J Hematol.* *In press.*
4. Takebe, A., Era, T., Okada, M., Jakt, LM., Kuroda, Y. and Nishikawa, S-I. Microarray analysis of PDGFR α + populations in ES cell differentiation culture identifies genes involved in differentiation of mesoderm and mesenchyme including ARID3b that is essential for development of embryonic mesenchymal cells. *Dev. Biol.* 293: 25-37, 2006.