

氏名(本籍)	くに さだ ゆう や (愛媛県)			
学位の種類	博 士 (理 学)			
学位記番号	博 甲 第 6488 号			
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Studies on ES/iPS Cell Differentiation into Specific Lineages by Small Molecules Related to Differentiation Signals (分化シグナルに関する低分子化合物による特定の細胞系譜への ES/iPS 細胞分化の研究)			
主 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治	
副 査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一	
副 査	筑波大学教授	博士(理学)	中 田 和 人	
副 査	筑波大学教授	博士(理学)	和 田 洋	

論 文 の 内 容 の 要 旨

ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞の分化を厳密に制御して、特定の細胞系譜へと分化誘導することは、幹細胞を創薬研究や細胞医療に用いるために非常に重要である。本研究の目的は、分化に関する低分子化合物を利用して幹細胞の分化の方向性を制御することである。

分化シグナルに関わる低分子化合物の開発は、幹細胞からの分化を制御するために非常に有益である。これまでに開発された化合物評価系では、分化に与える影響が1つの指標によって評価されており、化合物が分化に与える複雑な影響を幅広く評価するためには不十分であった。そこで第1段階として、マウス ES 細胞の多分化能を利用した化合物評価系を構築し、分化に関する低分子化合物を幅広く見出すことを目指した。本研究で構築した化合物評価系は、①マウス ES 細胞から胚様体 (Embryonic bodies) を形成させ、さらに3杯葉方向 (内胚葉、中胚葉、外胚葉) へと分化させる、②各胚葉より調整した単一細胞を、接着培養させると同時に候補化合物を添加する、③培養4日後に複数の分化マーカーの発現量をマルチプレックス定量 RT-PCR で調べる、という手順で実施した。本化合物評価系を用いて、作用既知の化合物ライブラリーである LOPAC (1280 化合物、シグマ社) を用いた化合物スクリーニングを実施した。その結果、52 個の化合物が分化マーカーの発現を変動させることが明らかになった。

ES 細胞などの胚性幹細胞と成体に存在する体性幹細胞の分化は共通のシグナルによって制御される。そこで、第2段階として、52 個の化合物がヒト間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化に与える影響を評価した。その結果、ROCK 阻害剤である Y-27632 とキナーゼ阻害剤である HA-100 が、脂肪細胞分化マーカーである *Adiponectin* と *PPAR γ* の発現を上昇させ、さらに脂肪滴の蓄積とアディポネクチンの分泌を促進した。したがって、Y-27632 と HA-100 はヒト間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化を促進することが明らかになった。次に、これらの化合物がヒト間葉系幹細胞からの骨分化に与える影響を評価した。その結果、GSK3 β 阻害剤である BIO とチミジンアナログである BrdU が、骨分化マーカーである *Runx2*、*Alpl*、*Col1a1*、*PTHrP* の発現上昇、アルカリホスファターゼ活性の上昇、カルシウム蓄積の増加を誘導した。そこで、BIO と BrdU がヒト間葉系幹細胞からの骨分化を促進すると結論した。

第3段階では、低分子化合物を用いたヒト iPS 細胞からインスリン産生細胞を誘導する方法の構築を試みた。ヒト iPS 細胞から膵β細胞への効率的な分化誘導法を確立することは、新たな糖尿病薬の開発や幹細胞を用いた1型糖尿病患者への細胞医療の進歩に大きく貢献する。ヒト iPS/ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導法については多くの報告があるが、再現よくインスリン産生細胞を分化させることは非常に困難であった。そこで、低分子化合物を組み合わせることで、安定的にインスリン産生細胞を誘導する方法の構築をめざした。

ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化を効率よく誘導する方法の開発をめざし、GSK3β 阻害剤である CHIR99021 を Activin A と同時に添加することにより、効率的に内胚葉を誘導できることを明らかにした。結果的に、70%以上の細胞が SOX17 陽性かつ FOXA2 陽性の内胚葉へと分化した。次に内胚葉から膵前駆細胞への分化誘導の効率化を目指した。膵臓への分化を誘導することが報告されている様々な因子を検討した結果、BMP 受容体阻害剤である dorsomorphin とレチノイン酸に TGFβ 受容体の阻害剤である SB431542 を添加すると、PDX1 と NGN3 の発現が顕著に上昇し、70%以上の細胞が PDX1 陽性の膵前駆細胞へと分化した。

さらに、膵前駆細胞からインスリン産生細胞への分化を誘導する低分子化合物の探索を行った。その結果、forskolin、dexamethasone、Alk5 inhibitor II の3化合物と膵臓分化でよく用いられるニコチンアミドを同時に添加することで、安定的に10%以上の細胞がインスリン産生細胞へと分化した。異なる5種類のヒト iPS 細胞株に対して本分化誘導法を用いたところ、いずれの株からも安定的にインスリン産生細胞を誘導することができた。最後に、分化させた細胞からのインスリン分泌能を調べた結果、様々なインスリン分泌促進剤に反応して、分化細胞がインスリンを分泌することがわかった。しかしながら、成熟した膵β細胞の特徴であるグルコース濃度に応答したインスリン分泌はほとんどみられず、分化させたインスリン産生細胞は成熟度が不十分であると考えられた。

以上のように、第1段階ではマウス ES 細胞を利用した化合物評価系を構築することに成功した。第2段階では、胚性幹細胞と体性幹細胞の分化に関与する化合物を幅広く同定することができた。したがって、本化合物評価系は、幹細胞からの分化に関与する化合物を見いだすための有用な手法であると結論した。第3段階では、低分子化合物を用いて、効率的かつ安定的にヒト iPS 細胞からインスリン産生細胞を誘導することが可能となった。本手法をさらに改良することで、新たな糖尿病薬の開発や将来的な細胞医療の実現に貢献することが期待される。

審査の結果の要旨

幹細胞を創薬研究や細胞医療に用いるためには、ES細胞やiPS細胞などの幹細胞の分化を厳密に制御して、特定の細胞系譜へと分化誘導することは、非常に重要である。分化に関与する低分子化合物を利用して幹細胞の分化の方向性を制御することを目的として、本研究では、マウス ES 細胞の多分化能を利用した化合物評価系を構築した。次に、この評価系でスクリーニングされた化合物を用いて、ヒト間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化と骨分化に有効な化合物を特定した。さらに、分化に影響を受ける低分子化合物を組み合わせることで、ヒト iPS 細胞からインスリン産生細胞への分化を効率的に誘導することに成功した。本研究は、ES 細胞や iPS 細胞を創薬研究や細胞医療に用いるための研究の基礎を築いたものであり、その学問的な価値は高いと結論した。

平成 25 年 2 月 13 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。