氏名（本籍）	羽鳥　真功
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博乙第　　2724　　号
学位授与年月	平成　27　年　2　月　28　日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	新規カニクイザル胚性幹（ES）細胞株の樹立と神経系細胞への分化誘導

主　査	筑波大学教授	医学博士	高橋　智
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	石井　亜紀子
副　査	筑波大学助教	博士（理学）	髙﨑　真美
副　査	筑波大学教授	理学博士	志賀　隆

論文の内容の要旨

（目的）

胚性幹（embryonic stem : ES）細胞は、未分化性と分化多能性を併せ持ち、再生治療や発生学研究の貴重なバイオリソースとして期待されている。特に、再生医療への応用にあたっては、ヒトと同じ霊長類であるサル類を用いた安全性試験や前臨床試験が不可欠であり、サル類由来の ES 細胞株の有用性は高い。しかしながら、ES 細胞は動物種や細胞株による特性の違いもあり、それぞれの ES 細胞株の特定組織への分化誘導についての情報は十分とは言えない。ヒトを含む霊長類 ES 細胞において、fibroblast growth factor 2（FGF2）は ES 細胞の自己複製能を促進する効果を示すが、マウス ES 細胞では FGF2 単独で、ヒト ES 細胞では他の分化誘導因子と協働で、神経幹細胞への分化誘導にも効果を示す。本論文では、再生医療研究に有用な新規のカニクイザル由来 ES 細胞、特に FGF2 低依存性の ES 細胞株を樹立し、神経系細胞への分化誘導に関する基本的な特性を明らかにすることを目的とした。

（対象と方法）

ES 細胞樹立のために使用した受精卵は、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて飼育されている、雌性カニクイザルへ過排卵処理を施し採取した未受精卵と、同じく雄性カニクイザルより採取した新鮮精子を用いて顕微授精（ICSI）を行い作出した。作出した受精卵を成熟培養し、得られた胚盤胞期胚から内部細胞塊（ICM）を採取し、フィーダー細胞上で培養を行った。樹立した細胞株の ES 細胞としての特性評価は、染色体分析による正常性の維持、未分化マーカーの発現解析、テラトーマ形成および組織学解析等により行った。

(結果)

始めにカニクイザルにおける過排卵処理について検討し、25IU/kg hFSH を 24 時間毎に 9 回皮下投与することで卵胞発育を促進し、36 時間後に hCG で排卵誘起する方法により多数の卵子を獲得し、これらの卵子を顕微授精（ICSI）により効率良く受精卵を作出することを明らかにした。次に、本方法により得たカニクイザル受精卵を成熟培養し、得られた胚盤胞期胚から ICM を採取し、フィーダー細胞上で培養を行った。FGF2 および human LIF、2-ME を含む ES 細胞培養液で維持培養を行った後、ES 様細胞のコロニーを FGF2 と human LIF、2-ME を除いた改変 ES（m-ES）細胞培養液の培養環境下へ継代操作を行うことで、FGF2 の添加を必要としないカニクイザル ES 様細胞を得た。この ES 様細胞は正常な染色体（42 本）と XY 性染色体を有することを確認した。また、本 ES 様細胞はアルカリフォスファターゼ（ALP）の発現が観察され、Oct-3/4、SSEA-4、TRA-1-60 および TRA-1-81 の幹細胞マーカーが陽性であった。続いて、Embryoid body（EB）およびテラトーマ形成能を検討した結果、EB 形成能を有し、免疫不全マウスにテラトーマを形成することが明らかとなり、本細胞の分化多能性が確認された。これらの結果より、従来の霊長類 ES 細胞と同様の未分化性および分化多能性を有する FGF2 低依存性カニクイザル ES 細胞株（Fld-ES 細胞）を新規に樹立することができたと考えられた。Fld-ES 細胞は 1□M RA を添加した培養条件下で神経線維状の構造が観察され、免疫蛍光抗体染色により神経細胞特異的マーカーの発現が確認された。さらに、1□M RA と 10ng/ml FGF2 を添加した培養条件下で、免疫蛍光抗体染色によりアストロサイト特異的マーカーの発現が認められた。

(考察)

本研究において、カニクイザル ES 細胞の樹立に必要なカニクイザル受精卵の効率的な作成法が確立された。新規に樹立されたカニクイザル ES 細胞、Fld-ES 株は正常な核型を保有し、FGF2 に依存することなく未分化性を維持し、分化多能性を持つことが明らかとなった。また、RA の添加により神経系細胞への分化誘導が可能であり、RA と FGF2 の添加によりアストロサイトへの分化誘導が可能であることが明らかとなった。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文で新規に樹立された FGF2 低依存性のカニクイザル ES 細胞株、Fld-ES 細胞株は、神経系細胞である神経細胞やアストロサイトへの分化誘導が可能であり、再生医療研究や発生学研究に利用可能な霊長類由来 ES 細胞株として有用であると考えられる。今後の再生医学の前臨床試験において重要なリソースになりうると考えられる。

平成 26 年 12 月 10 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論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。