



Title	ES細胞からの神経系細胞分化におけるPACAPおよびストローマ細胞の役割に関する研究
Author(s)	廣瀬, 恵
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46539
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	廣瀬 恵
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 20248 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	ES 細胞からの神経系細胞分化における PACAP およびストローマ細胞の役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 八木 清仁 教授 前田 正知 教授 土井 健史

論文内容の要旨

胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) は 3.5 日胚の内部細胞塊から樹立された細胞株であり、無限増殖能と多分化能を併せ持つ特性から、発生過程のメカニズムの理解や再生医療の実現への寄与が期待されている。これまでに ES 細胞から、造血系、神経系、筋細胞など、各臓器特異的な細胞への分化誘導法が確立されている。このような ES 細胞の自己保存と分化の制御には、微小環境 (niche) が重要であると考えられており、“幹細胞 niche” という概念が提唱されている。幹細胞 niche は、ES 細胞とストローマ細胞や細胞外マトリックス、液性因子などとの間の相互関係で成り立つと考えられている。幹細胞分化を制御するためには、細胞運命を司る分子メカニズムに関する基礎的研究を基盤とした知見の集積が重要である。しかし、現在のところ神経分化における幹細胞 niche の制御についての知見は少なく、ほとんど明らかにされていない。

ところで、神経ペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) は、1989 年に Arimura らによって下垂体のアデニル酸シクラーゼの活性化を指標として発見されて以来、脳、副腎、膵臓、精巣を始めとする、生体内の幅広い部位において多彩な生理機能を果たすことが、国内外の研究者によって明らかにされてきた。

神経系の発生過程において、PACAP およびその特異的受容体 PAC1 は、胎生中期から脳神経軸に強く発現する。特に PACAP は、post-mitotic な細胞に発現するのに対して、PAC1 受容体は中心管を取り囲む神経上皮細胞のほとんどすべてに発現し、この局在は神経新生およびグリア新生が終わる生後 4 日まで続く。PAC1 は生後も神経新生が続く側脳室周囲や嗅球などでも発現する。また、*in vivo* 胎児脳で、PACAP が神経前駆細胞の細胞周期を停止し、増殖因子の作用を阻害することが報告されている。これらのことから、PACAP の神経新生および細胞運命の決定への関与が示唆されてきている。

そこで今回私は、PACAP が神経発生に及ぼす影響を明らかにすることを目的に研究を行った。まず、神経発生の広範なステージを追うことができる、ES 細胞からの神経系細胞への分化誘導系を用いて、PACAP 関連遺伝子の発現パターンを解析し、神経系細胞分化に伴い PACAP およびその受容体遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。次に、選択的神経幹細胞培養系を用いて神経幹細胞の自己複製能および分化能に対する PACAP シグナルの役割を解析した。その結果、PACAP は神経幹細胞の自己増殖の指標である secondary sphere 形成率を減少させ、神経細胞マーカー MAP2 陽性細胞数を増加させることが示された。また、PACAP による神経分化促進作用が、3 時間の PACAP 処置においても認められたことから、PACAP 添加後 3 時間までの早い段階で、神経細胞への運命決定が行われてい

る可能性があることが示された。これらのことより、PACAP が神経幹細胞の増殖から分化への転換を促進する因子であることが示唆された。

一方、ストローマ細胞は間質細胞から樹立された支持細胞であり、サイトカインや細胞外マトリックス成分の産生によって、また、細胞表面リガンドを介した直接的な相互作用によって、機能を担う細胞の分化や機能発現を誘導・促進する。そのため、ストローマ細胞は生体内の各組織において、幹細胞 niche を提供する細胞として重要な役割を果たすと考えられている。現在までに、ES 細胞とストローマ細胞との共培養系として、SDIA (stromal cell-derived inducing activity) 法が報告されている。これは、頭蓋骨由来のストローマ細胞 PA6 を用いるものである。PA6 細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定化しても、神経分化誘導活性を示す。本分化誘導系の分化の進行に伴う神経系細胞マーカーの発現変化は、*in vivo*における発生過程における発現変化と非常に良く相関する。よって、ストローマ細胞との共培養系における神経系細胞分化誘導系は、*in vivo*における神経発生をよく反映したモデルであると考えられている。これまでに、SDIA の同定に向けた研究が進められてきているが、SDIA についての詳細な分子メカニズムは未だ不明である。

そこで私は、異なる組織に由来するストローマ細胞により構成される niche が細胞運命にどのような違いをもたらすのかについて解析を行った。これまでに、骨髄由来ストローマ細胞 ST2 細胞上で培養した ES 細胞から、B 細胞および T 細胞への分化能を持つリンパ系前駆細胞を分化誘導できることが知られている。しかし、ST2 細胞の神経分化誘導能に関する検討は未だなされていなかった。今回、マウス頭蓋骨由来ストローマ細胞である PA6 およびマウス骨髄由来ストローマ細胞である ST2 細胞を feeder 細胞として ES 細胞を分化させ、比較検討した。その結果、生細胞の ST2 細胞上では ES 細胞に対する神経分化誘導能が認められないのに対し、4%パラホルムアルデヒドで固定化した ST2 上では、PA6 および固定化 PA6 上とほぼ同様の神経分化誘導作用を示すことが見出された。これらのことより、骨髄由来ストローマ細胞 ST2 細胞の細胞膜上に神経分化誘導能を示す分子が存在し、ST2 細胞が神経分化を阻害する液性因子を産生していることを示唆した。

本研究により示された、PA6 細胞と ST2 細胞の ES 細胞の神経分化に対する異なる作用は、幹細胞に対するストローマ細胞の部位特異的な分化制御を反映していると考えられ、このような niche の存在は *in vivo*においても存在すると推定される。

幹細胞 niche に関する研究は、発生学的観点からも再生医療の観点からも重要な研究課題であり、一層の研究の進展が望まれる。

論文審査の結果の要旨

胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) は無限増殖能と多分化能を併せ持つ。ES 細胞の自己保存と分化の制御には、微小環境 (niche) が重要であると考えられており、幹細胞分化を制御するためには、細胞運命を司る分子メカニズムに関する基礎的研究を基盤とした知見の集積が重要である。しかし現在のところ神経分化における幹細胞 niche の制御についての知見は少なく、ほとんど明らかにされていない。

そこで、本研究において、液性因子として神経ペプチド PACAP に着目し、その神経発生に及ぼす影響を明らかにし、また、幹細胞 niche の観点から PA6 と ST2 の 2 種のストローマ細胞を用いた SDIA 法による神経分化誘導を検討した。

その結果、以下の知見を明らかにした。

1. PACAP、VIP および PAC1 受容体、VPAC2 受容体は ES 細胞にもわずかに発現が認められ、神経系細胞への分化が進行するのに伴い、発現上昇することを明らかにした。
2. PACAP は神経幹細胞の自己複製能を低下させ、神経細胞分化を促進することを示した。
3. ST2 細胞の細胞膜上に神経分化誘導能を持つ因子が存在することを示し、ST2 細胞が神経分化を阻害する液性因子を産生していることを示唆した。

本研究は、ES 細胞の神経分化誘導におけるシグナル系として PACAP、およびストローマ細胞による幹細胞 niche の寄与を明らかにしたものであり、博士 (薬学) の学位に値するものと判断する。