

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	滝澤佐季子
論文審査担当者	主査 中山淳 副査 池田宇一・駒津光久
論文題目 A Novel Stepwise Differentiation Of Functional Pancreatic Exocrine Cells From Embryonic Stem Cells (胚性幹細胞からの機能的な膵外分泌細胞への新たな段階的分化誘導)	
(論文の内容の要旨) 〔背景と目的〕 膵外分泌細胞は食物の三大栄養素すべてを消化することができる消化酵素を分泌している。しかし、これまで単離して培養するなど <i>in vitro</i> での研究報告は少なく、発生メカニズムの解明についても内分泌細胞に比べて研究が遅れている。哺乳動物由来の膵外分泌細胞は、 <i>in vitro</i> において機能的に培養できる系が確立されておらず、また仮に単離できたとしても、成熟した外分泌細胞を長期的に培養することは困難であることから、我々は多分化能を有する多能性幹細胞に注目した。本研究では、有用な消化酵素の産生、さらには膵臓疾患研究に役立つ目的で、マウス胚性幹 (ES) 細胞から膵外分泌細胞への分化誘導を試みた。 〔方法〕 未分化マウス ES 細胞は 0.1%トリプシンを用いて培養ディッシュから剥離した。胚様体 (EB) を形成するため、マウス ES 細胞の懸濁液をディッシュ蓋に 50 μ L ずつドロップ状に置いた後反転させ、5 日間静置浮遊培養を行った。作成した EB は、ゼラチンコートディッシュに接着、伸展させ、培地中に誘導因子を加えて分化誘導を行った。分化誘導は段階的に行い、形成した EB に対してまず activin A (Stage1)、次いで retinoic acid (Stage2) で処理をした。その後、FGF7 で 3 日間処理 (Stage3) 後、FGF7、GLP-1、nicotinamide で処理 (Stage4) し、膵外分泌細胞への分化を促した。分化誘導した細胞は、各ステージにおいて RT-PCR 法、real-time PCR 法及び免疫組織化学法などを用いて評価を行った。 〔結果と考察〕 Activin A による誘導により有意に Foxa2 陽性細胞への誘導効率が高く、Foxa2 及び Sox17 ダブルポジティブ陽性の細胞を多数確認したことから、胚体内胚葉へ誘導されていることが示された。次いで Stage2 では、レチノイン酸による誘導により腸管内胚葉マーカーである Hnf1b、Hlxb9 の発現を高率に検出し、さらに膵前駆細胞マーカー Pdx1 についても発現が検出された。Stage3 では FGF7 で誘導した細胞において、膵前駆細胞マーカー Pdx1、Nkx6.1、Hnf6 の発現を高率に検出し、Pdx1 陽性細胞を多数確認した。これらの Pdx1 陽性細胞は Foxa2 陽性細胞の集団の中に共局在しており内胚葉由来の細胞であることが示唆された。加えてカウント解析の結果から、FGF7 を添加することにより有意に Pdx1 陽性細胞が誘導されることが確認され、FGF7 による膵前駆細胞への誘導効果が確認された。Stage4 では、control に比べ、誘導因子 FGF7、GLP-1、nicotinamide を添加した細胞で消化酵素をコードする遺伝子、Amylase (AMY)、Elastase (ELA)、Carboxypeptidase A (CPA)、Chymotrypsinogen (CTRB) の発現を高率に検出し、AMY に関しては長期的に上方制御された。AMY と CPA もしくは Chymotrypsin とのダブル染色の結果、これらのタンパク質は顆粒状に染色され、同じ細胞内に共局在していた。また、誘導因子の組み合わせのうち、FGF7 の有無による評価を行ったところ、遺伝子レベルでは外分泌細胞マーカー AMY、ELA、CPA、CTRB の発現が上方制御される傾向にあり、また amylase 陽性細胞についても誘導効率が低い傾向が確認された。一方で、内分泌細胞については、Insulin、Glucagon の遺伝子発現レベルに違いが確認されなかったことから、FGF7 は膵外分泌細胞の分化に寄与する可能性が示された。加えて、誘導した細胞の培養上清中においてアミラーゼの活性を検出したことから、アミラーゼ分泌機能を有する外分泌細胞であることが考えられた。	