

氏 名	小 林 昌
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 8 1 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	BMP4 Induces Primitive Endoderm But Not Trophectoderm in Monkey Embryonic Stem Cells (BMP4 はサル ES 細胞を栄養外胚葉でなく胚体外内胚葉へと分化させる)
審 査 委 員	主 査 教 授 佐 藤 浩 副 査 教 授 村 上 節 副 査 教 授 小 笠 原 一 誠

論文内容要旨

※整理番号	586	氏名 ふりがな	こばやし まさし 小林 昌
学位論文題目	BMP4 Induces Primitive Endoderm But Not Trophectoderm in Monkey Embryonic Stem Cells (BMP4 はサル ES 細胞を栄養外胚葉でなく胚体外内胚葉へと分化させる)		
<p>目的:サル ES 細胞はヒト ES 細胞と類似の形態を示し、移植などの再生医療における霊長類のモデルとして有用である。マウス ES 細胞において、bone morphogenetic protein 4 (BMP4)は leukemia inhibitory factor (LIF)と共に未分化の維持に重要な役割を果たしている。しかしヒト ES 細胞では BMP4 と LIF の存在下では未分化を維持できず、BMP4 は胚体外組織である trophoblast への分化を促すことが報告されている。またヒト ES 細胞では basic fibroblast growth factor (bFGF)が未分化の維持に不可欠であるが、その機能についてサル ES 細胞と異なる可能性があることが報告されている。今回、ヒト ES 細胞と類似したカニクイザル ES 細胞において BMP4 がヒト ES 細胞と同様に胚体外組織への分化を促すのか、あるいはヒト ES 細胞とは異なるのかを検討した。</p> <p>方法:滋賀医科大学動物生命科学研究センターで樹立した2種類のサル ES 細胞株を用いた。マウスフィーダー細胞上にて培養した ES 細胞をコラゲナーゼ処理し、小コロニーを調製した。これらをゼラチン処理ディッシュに播種し、BMP4(1,10,100ng/ml)の存在下・非存在下で KSR 添加無血清培地を使用して培養した。3日目、7日目、14 日目に RNA を抽出し、リアリアルタイム RT-PCR (qRT-PCR)により分化マーカーの発現を調べた。発現のみられた分化マーカーについて7日目において免疫染色をおこなった。さらにフローサイトメトリーを用いて蛍光強度を検討した。</p> <p>結果:<細胞形態>BMP4 添加群において、平坦で、核が大きいほぼ均一な細胞群に分化した。一方、非添加群では不均一で繊維芽細胞や神経細胞など多様な細胞への分化がみられた。</p> <p><qRT-PCR による検討>はじめに Hand1,Cdx2,CG-βなどの trophoblast への分化を示すマーカーを調べたが、発現がみられなかった。このため、その他の系への分化の可能性を考えて検討した。まず、中胚葉への分化を示す Brachyury の発現はみられなかった。Oct4, Nanog といった未分化を示すマーカーは 3 日目より速やかに発現が減少した。その他の未分化マーカーである Sox2, Nestin は、コントロール群や BMP4添加 1ng/ml 群では下降がみられなかったが、BMP4添加 10,100ng/ml 群では速やかに下降した。これに対して、BMP4 高濃度添加群において Gata6, Gata4, LamininB1, AFP などの primitive endoderm および派生したものの分化を示すマーカーの上昇がみられた。Gata6 は primitive endoderm, Gata4 は visceral endoderm, LamininB1 は Parietal endoderm, AFP は初期の visceral endoderm のマーカーであるが、それぞれ濃度依存性に3日目より発現の増加がみられた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

また、definitive endoderm(内胚葉)への分化を示す Cxcr4 については、コントロールおよび BMP4 添加 1ng/ml 群では促進されるが、BMP4 添加 10,100ng/ml 群で抑制されることがわかった。さらに primitive ectoderm(原始外胚葉)への分化を示す fg5 についても調べたが、BMP4 10,100ng/ml 群では発現は増加しなかった。以上より、BMP4 を 10ng/ml 以上添加することにより、未分化マーカーは発現が抑制され、primitive endoderm への分化を示すマーカーの発現を促進したと考えられた。

<免疫染色> primitive endoderm への分化を示す Gata6, Gata4, LamininB1 について、7 日目において免疫染色を行ったところ、BMP4 添加群にのみ発現が認められた。それに対し、Nestin ではコントロール群の約半数に認められたが、BMP4 添加群では発現がみられなかった。

<フローサイトメトリー> Gata6 および Gata4 陽性の細胞について、フローサイトメトリーにて検討したところ、Gata6 においては3日目より陽性細胞の増加を認め、7日目では大部分の細胞が陽性になった。Gata4 でも同様の傾向が見られた。これらの結果は上記のqRT-PCR および免疫染色の結果を支持するものであった。

考察: 上記結果より、BMP4 は、未分化マーカーである Oct4, Nanog を速やかに低下させることがわかった。Sox2 は未分化マーカーでもあるが、trophoblast stem cell でも発現しており、trophoblast への分化を示す指標とも考えることができるが、BMP4 で3日目より速やかに低下していることや、その他の CDX2 や CG- β の発現もみられないことから、ヒト ES 細胞のように trophoblast へ分化を促進しないと考えられた。それとは対照的に BMP4 は、胚体外組織である primitive endoderm への分化を示す Gata6、それに派生して分化していく visceral endoderm, Parietal endoderm のマーカーである Gata4, LamininB1 の発現を速やかに促進した。さらに胚体への分化を示す Brachyury(中胚葉), Cxcr4(内胚葉), FGF5(外胚葉)それぞれのマーカーの発現も抑制していることから、BMP4 は primitive endoderm への分化を誘導していると考えられた。

結論: サル ES 細胞において、BMP4 は trophoblast への分化は誘導せず、primitive endoderm への分化を誘導することが示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	586	氏名	小林 昌
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>サル ES 細胞はヒト ES 細胞と類似の形態を示し、着床及び着床後の胚発生におけるモデルとして有用である。本研究ではカニクイザル ES 細胞における形質転換増殖因子 β スーパーファミリーに属する BMP4 の効果を検討した。BMP4 は、未分化マーカーを速やかに低下させることがわかった。BMP4 はヒト ES 細胞と異なりカニクイザル ES 細胞において trophoblast マーカーの発現を促進せず、胚体外組織である primitive endoderm への分化を示すマーカーの発現を速やかに促進した。さらに胚体への分化を示すマーカーの発現も抑制していることから、BMP4 は primitive endoderm への分化を誘導すると考えられた。</p> <p>本研究は、カニクイザル ES 細胞において、BMP4 がヒト ES 細胞と異なる働きを示すことを示した。一方、サル ES 細胞が胚発生の中の過程で有用なモデルになるかを今後さらに検討していく必要があることも示された。以上により博士 (医学) の学位を授与するに値すると評価された。</p>			
(平成 21 年 2 月 17 日)			