

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山下 智子
<p>学位論文題目</p> <p>Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells from Dissociated Monolayer and Feeder-free Cultured Pluripotent Stem Cells (分散無フィーダー培養多能性幹細胞からのオリゴデンドロサイト 前駆細胞への分化)</p> <p>共著者名</p> <p>宮本幸, 板東良雄, 小野貴士, 小林桜子, 土井彩乃, 荒木利博, 加藤洋輔, 白川峰征, 鈴木豊, 山内淳司, 吉田成孝, 佐藤直也</p> <p>PLoS One. 12巻 e0171947</p> <p>研究目的</p> <p>ヒト幹細胞を用いた脱髄疾患治療や治療薬の開発を目的とし、多くの機関で霊長類幹細胞を用いたオリゴデンドロサイトの作製が取り組まれている。これまでに、ヒト幹細胞からのオリゴデンドロサイトへの分化がいくつか報告されているが、従来の幹細胞の取り扱い法では、質の安定した細胞を短期間で大量に得ることが困難であるために応用例はほとんど報告されていない。そこで、本来の機能を有したオリゴデンドロサイトを再現性良く作製するために、我々が開発した分散無フィーダー培養法で未分化維持された霊長類幹細胞を用いてオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）調製方法の確立を試みた。</p> <p>材料・方法</p> <p>サルES細胞からの分化誘導法</p> <p>分散無フィーダー培養で未分化維持されたサルES細胞CMK6_{SFF}株およびCMK970株は、SB431542, LDN193189, Y-27632およびhuman fibronectinを含む培養液を用いてcollagen type Iコートディッシュに播種し3日間培養した。未添加の培養液で1日培養後、RAおよびSHHを含む培養液で2日間培養した</p>			

(Step 1). 細胞を剥離後, FGF2, SHH, PDGF-AA, B-27, N-2, penicillinおよびstreptomycinを含む培養液に懸濁し, 44日間スフェア培養を行った. このスフェアを単一細胞に分散させた後にpoly-L-ornithine/lamininコートディッシュに播種し接着培養を行った. 7日間後に回収した細胞を-80°Cで凍結保存した (Step 2). 細胞融解後, poly-L-ornithine/lamininコートプレートにStep2で用いた培養液で細胞を播種した. 1日または2日後に, T3, dbcAMP, SHH, Noggin, IGF-1, NT-3, B-27, N-2, penicillinおよびstreptomycinを含む培養液に交換し, 14日間培養した (Step 3).

ヒトiPS細胞からの分化誘導法

分散無フィーダー培養で未分化維持されたヒトiPS細胞A3株および#1-04株は, collagen type Iコートディッシュ播種翌日にSB431542およびLDN193189を含む培養液に交換し3日間培養した. 新しい培地に交換後さらに3日間培養し, 未添加の培養液で1日培養後, RAおよびSHHを含む培養液で2日間培養した (Step 1). その後サルES細胞の場合と同様に, 67日間のスフェア培養後に8日間接着培養を行い, 得られた細胞を凍結保存した (Step2). この凍結細胞を用いてサルES細胞の場合と同様に, 14日間培養した (Step3).

免疫染色

各種分化マーカーに対する1次抗体およびAlexa標識2次抗体を用いて免疫染色を行った.

移植実験

Step2で得られたCMK6_{SFF}由来細胞を生後2-3日のC58BL6/Jマウスの脳梁へ1匹あたり 1×10^5 個移植した.

組織染色

移植4週間後に調製した大脳皮質の切片を抗MBP抗体および抗GFAP抗体で染色し, 移植細胞は抗ヒト核抗体で認識させた.

ラット初代DRG神経との共培養

胎齢15日目SDラットの脊髄より得たDRG神経と, Step2で得られたCMK6_{SFF}またはA3由来細胞を共培養をし, 抗MBP抗体および抗neurofilament 200抗体を使って免疫染色を行った.

ウェスタンブロッティング

試料に含まれるMBPおよびCNPaseを検出した.

遺伝子発現解析

試料に含まれるMBP, PLP1, CLDN11および18Sの遺伝子発現を定量PCR法により測定した.

フローサイトメーター

抗PDGFR α 抗体を陽性細胞の割合を解析した.

成 績

サルES細胞からの機能的オリゴデンドロサイトへの分化

分散無フィーダー培養法で未分化維持されたサルES細胞CMK6_{SFF}株を使ってオリゴデンドロサイトへの分化誘導法の確立を試みた. 分化マーカーの発現を指標に検討した結果, 神経外胚葉 (Step1),

OPC (Step2) およびオリゴデンドロサイト (Step3) への分化の3段階より構成される誘導法を確立した。この分化誘導法を別のサルES細胞CMK970株に適応した場合にもオリゴデンドロサイトの誘導が確認された。さらに、Step2で得られた細胞を凍結保存した結果、凍結しなかった場合と同様にオリゴデンドロサイトが誘導され、OPCが凍結保存可能であることが示唆された。

次に、CMK6_{SFF}株由来OPCをマウス新生仔の脳皮質へ移植した。その結果、移植細胞を認識する抗ヒト核抗体陽性細胞に成熟オリゴデンドロサイトマーカーのMBPが認められたことから、*in vivo*条件下においてOPCの分化能が示唆された。

さらに、CMK6_{SFF}株から得られたOPCをラット初代DRG神経と共培養することによりMBP陽性細胞の髄鞘様構造、ならびにMBPおよびCNPase蛋白質の発現が確認され、*in vitro*条件下でのOPCの髄鞘化能が示唆された。

ヒトiPS細胞からの機能的オリゴデンドロサイトへの分化

はじめに、既存のヒトiPS細胞から分散無フィーダー培養適応A3株および#1-04株を得た。サルES細胞で確立した分化誘導法を基に、A3株を用いてヒトiPS細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導法を確立した。この方法を用いると、#1-04株からもオリゴデンドロサイトが分化誘導された。さらに、A3株由来OPCとラット初代DRG神経を共培養することで、*in vitro*条件下でのOPCの髄鞘化能が示唆された。

考 案

今回は、我々が開発した分散無フィーダー培養で未分化維持されたマウスES細胞のCMK6_{SFF}株およびCMK970株、ならびにヒトiPS細胞のA3株および#1-04株から機能的なOPCが誘導された。この分散無フィーダー培養は未分化細胞の質を安定化させ増殖性も改善することから、OPCを大量に安定して調製することが可能である。また、*in vivo*での移植試験や*in vitro*での共培養試験で凍結保存されたOPCの分化能や髄鞘化能が示唆され、短時間で機能的なオリゴデンドロサイトの調製が可能となった。

結 論

我々がこれまでに開発した分散無フィーダー培養法で未分化維持されたサルES細胞およびヒトiPS細胞から機能的なオリゴデンドロサイトが分化誘導された。さらに、分化誘導の途中で保存された凍結OPCは再生医療、ミエリン関連疾患の病態メカニズム解析や新規治療戦略確立の手がかりにつながることを期待される。




引 用 文 献

1. Ono T, Suzuki Y, Kato Y, Fujita R, Araki T, Yamashita T, Kato H, Torii R, Sato N. (2014). A single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. PLoS One. 9, e88346

参 考 論 文

1. Ono T, Suzuki Y, Kato Y, Fujita R, Araki T, Yamashita T, Kato H, Torii R, Sato N. (2014). A single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. *PLoS One*. 9, e88346
2. Yamashita T, Nishimura K, Saiki R, Okudaira H, Tome M, Higashi K, Nakamura M, Terui Y, Fujiwara K, Kashiwagi K, Igarashi K. (2013). Role of polyamines at the G₁/S boundary and G₂/M phase of the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol*. 45, 1042-1050

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	山下 智子
審査委員長 船越 洋  審査委員 渡部 剛  審査委員 川辺 淳一 			
学 位 論 文 題 目 Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from dissociated monolayer and feeder-free cultured pluripotent stem cells. (分散無フィーダー培養多能性幹細胞からのオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化)			
<p>オリゴデンドロサイトは中枢神経系で髄鞘形成を担い神経細胞を支持・栄養する重要な役割を担っている。オリゴデンドロサイトで形成される髄鞘の変性を主病態とする多発性硬化症やロイコディストロフィーなどの脱髄性疾患は、病態の分子機序が以前十分明らかでなく、治療法開発が急がれている難病であり、その病態解明とそれに基づく効果的な治療法開発が急がれている。現在世界的に脚光を浴びているのが、多能性幹細胞をオリゴデンドロサイトに分化させ解析する方法である。正常ヒト由来の細胞や患者由来の細胞を起源とする多能性幹細胞を用いることで、これらの疾患の分子病態解明を細胞培養下に詳細に解析することが可能となるため、病態の分子機序解析が大きく前進すると期待されている。しかし、従来の多能性幹細胞の培養・継代方法では短時間に均一な多能性幹細胞を調整し、オリゴデンドロサイトを得ることはできなかった。また、多能性幹細胞由来のオリゴデンドロサイトやその前駆細胞（以後 OPC と略す）を短時間に均一で十分量調整できるようになれば、脱髄疾患への再生医療への適用の可能性が増大する。これらの背景から、本研究では以下の2つを目的として研究を進めた。(1) サル ES 細胞やヒト多能性幹細胞の短時間で均一に大量に培養し、そこからオリゴデンドロサイトおよび OPC を調整する新規方法を確立し、in vitro において効率的に短時間で大量に調整できることを実証すること。(2) 大量調整した細胞を凍結融解し使用できることを示すこと。(3) 正常マウスに調整した細胞を移植することで、オリゴデンドロサイトに分化し、髄鞘化に寄与することを実証すること。</p> <p>以上の目的のため、申請者らは、まずサル ES 細胞の培養条件に検討を加えた。方法としては、従来から使用されているフィーダー細胞を用いた塊 floating culture の方法から、無フィーダー細胞下での分散単相細胞培養を行う系であり、(a) 前培養 (Step 0) (b) 神経内分泌細胞 (NE) への誘導 (Step 1) (c) OPC への分化誘導 (Step 2) (d) オリゴデンドロサイトへの分化 (Step 3) からなる。続いてヒト多能性幹細胞の培養条件に検</p>			

討を加えた。Step はサル ES 細胞と同様に Step 0 から Step 3 から構成される。この方法では、フィーダー細胞を用いず defined 培地を用いるため、従来の細胞塊を用いた培養方法に比べてバリエーションの少ない均一な細胞培養が可能であることを各種マーカーの解析で明らかとした。さらにこのようにして調整した細胞は、凍結融解しても細胞特性が変わらず、融解後約 2 週間でオリゴデンドロサイトおよび OPC に分化可能であることを示した。加えて、ラットの培養脊髄後根神経節細胞との共培養により、新しい方法で調整したオリゴデンドロサイトおよび OPC が脊髄後根神経節細胞に髄鞘を形成することが明らかとした。続いて、新しく調整した OPC およびオリゴデンドロサイトを移植した際に、in vivo で生着するかどうかを解析した。正常マウスの脳に細胞を移植すると、脳梁においてオリゴデンドロサイトが取り込まれて存在していることを免疫組織化学的方法で示した。これらの結果、新しく確立した多能性幹細胞の培養・継代・分化の方法が in vitro のみならず in vivo においても有用であることが実証された。

本研究は、多能性幹細胞の培養方法およびその分化方法に新展開を示す重要な研究成果である。種々の脱髄性難病への病態解明や薬剤スクリーニングに有用であり、細胞培養系を用いた新薬の効率的開発の分野で飛躍的発展が期待できる成果である。さらにオリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトへの分化の能力を in vivo の実例をもって示している本研究成果は、将来の神経免疫疾患の再生医療へ大きな可能性を示す画期的成果と言える。提出者はこの論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、この領域において十分な知識を有することが示された。以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。