

氏名（本籍）	嶋 田 英 輝 （ 大阪府 ）		
学位の種類	博士（再生医科学）		
学位授与番号	甲第 775 号		
学位授与日付	平成 20 年 10 月 15 日		
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells : Modulation of differentiation by FGF-20.		
審査委員	（主査）教授 中 川 敏 幸 （副査）教授 岩 間 亨      教授 塩 入 俊 樹		

## 論文内容の要旨

### 【対象と方法】

本研究では、ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）株である KhES-1 細胞を用いて分化誘導実験を行った。ドーパミン産生細胞への分化誘導法は、笹井らが開発した SDIA（Stromal cell-derived activity）法を改良した方法を用いた。ドーパミン産生細胞への分化誘導法は4つの異なる培養ステージからなる。ステージ1；KhES-1 細胞を FGF-2 存在下、未分化状態で増殖させた。ステージ2；フィーダー細胞より剥離した KhES-1 細胞を、マウスストローマ細胞（PA6 細胞）上に播種後、7日間共培養し、ネスチン陽性神経前駆細胞へと分化させた。ステージ3；PA6 細胞より ES 細胞由来神経前駆細胞を回収後、10日間浮遊培養し、ニューロスフィアを作製した。ステージ4、ニューロスフィアを培養皿に接着させ、10日間ドーパミン産生細胞への分化誘導を行った。さらに、ステージ4で各種分化誘導因子（FGF-2、FGF-20、BMP-2）を添加し、分化誘導の促進を試みた。分化誘導終了後、チロシン水酸化酵素（TH）発現ドーパミン産生細胞を蛍光免疫染色法で検出した。また、各培養ステージにおける遺伝子変化を定量 RT-PCR で解析した。分化誘導効率は、 $\beta$ チューブリンタイプ III 陽性（TUJ 陽性）成熟神経細胞を含むコロニーと、TUJ1、TH 陽性細胞を含むコロニーの存在比で算出した。

### 【結果】

分化誘導終了後、ドーパミン産生細胞の分化を蛍光免疫染色法により確認した。分化誘導後の細胞集団はヘテロな細胞集団であるが、免疫染色の結果、80%のコロニーが TUJ1 陽性神経細胞を含み、10%程度のコロニーが TUJ1、TH 陽性細胞を含んでいた。次に、定量 RT-PCR でドーパミン神経マーカー遺伝子の発現を調べたところ、ステージ4で TH 遺伝子の発現がみられた。ドーパミン神経の発生で重要な転写因子である NURR1、LMX1B、PITX3、EN1 遺伝子についても分化細胞で発現がみられた。また、分化誘導が進むに従い、未分化マーカーである OCT-4 遺伝子の発現の低下がみとめられた。

次に、分化誘導の効率を向上させるため、ステージ4において、FGF-2、FGF-20、BMP-2 を分化誘導培地に添加した。FGF-2 と FGF-20 で処理した群では未処理群に比べ、TH 陽性/TUJ 陽性細胞を含むコロニーの有意な増加がみられた。また、FGF-2、FGF-20 処理群では TH、NURR1、LMX1B、PITX3、EN1 遺伝子の有意な発現増加がみられた。一方で、FGF-2、BMP-2 単独処理群ではこれらの遺伝子の発現増加がみられなかった。

## 【考察】

本研究では、笹井らが開発した SDIA 法を改良し、ヒト ES 細胞からドーパミン産生細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の蛍光免疫染色、定量 RT-PCR の結果から、ドーパミン産生細胞が分化誘導されたと考えられる。次に、ドーパミン産生細胞への分化誘導を促進するために、FGF-2, FGF-20, BMP-2 を分化誘導培地に添加した。FGF-20 は大脳黒質に特異的に発現している成長因子で、ドーパミン神経の発生にも関与していると考えられている。また、FGF-20 が、サル ES 細胞からドーパミン産生細胞への分化を促進することが報告されている。免疫染色後の定量解析から、未処理群, FGF-2 単独処理群に比べ、FGF-2, FGF-20 処理群は有意にドーパミン産生神経の分化を促進した。さらに、定量 RT-PCR の結果から、FGF-2, FGF-20 処理群ではドーパミン神経の発生に重要な NURR1, LMX-1B, PITX3, EN1 の発現が有意に増加していた。FGF-20 はこれらのドーパミン神経分化に必要な転写因子の発現を促進することで、TH 陽性ドーパミン産生細胞への分化誘導を促進していると考えられる。

## 【結論】

本研究では、ヒト ES 細胞からドーパミン産生細胞の分化誘導を行い、FGF-20 が分化誘導を促進することを見出した。誘導したドーパミン産生細胞を、モデル動物で評価するなど更なる検討が必要であるが、ヒト ES 細胞からドーパミン産生細胞を高効率に得るために、FGF-20 は有用な分化誘導因子である。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 嶋田英輝は、ヒト ES 細胞からドーパミン産生細胞の分化誘導を行い、FGF-20 が分化誘導を促進することを見出した。FGF-20 は、ヒト ES 細胞からドーパミン産生細胞を高効率に得るために有用である。この知見は幹細胞生物学、再生医療の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

## [主論文公表誌]

Hideaki Shimada, Naoko Yoshimura, Ukiko Tsuji, Takahiro Kunisada. Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells : Modulation of differentiation by FGF-20.

J. Biosci. Bioeng. 107, 447-454(2009).