

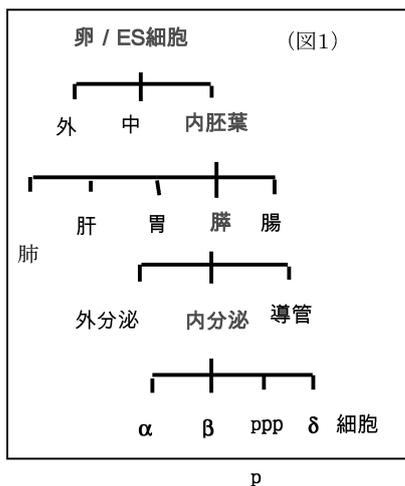
# ES細胞からの内胚葉細胞系譜制御遺伝子プロファイリング解析

● 糸 昭苑 ◆ 糸 和彦

熊本大学発生医学研究センター・幹細胞制御分野

## ＜研究の目的と進め方＞

マウスES細胞は細胞分化過程を試験管内で再現するモデル系であり、ES細胞の試験管内分化系は個体発生の細胞系譜の経路の追跡とそれぞれの分化決定過程の操作、解析が可能である点でも優れている。本プロジェクトは、内胚葉系組織への発分化の仕組みを網羅的に理解するために、胚性幹細胞（ES細胞）の試験管内分化誘導系を用いて、以下に焦点を絞り研究を進める予定：1）、ES細胞から内胚葉系への分化誘導に関わる遺伝子プロファイリング解析。2）、ES細胞由来の特定の細胞系譜へ分化した組織特異的幹細胞の選別と遺伝子発現プロファイル解析。3）、遺伝子網羅的解析結果と時空間的な発現パターンの解析結果とを総合し、特定な遺伝子に絞り込み、機能解析を行う。



## ＜研究開始時の研究計画＞

1）、膵臓への分化誘導促進ES細胞株についての遺伝子プロファイリングの解析

申請者が構築した膵臓への分化誘導の系を用いて、内胚葉誘導因子であるニワトリのmix 遺伝子 (cmix) 強制発現により内胚葉への誘導能が促進されたES細胞株を確立している。分化誘導過程におけるこの内胚葉高分化誘導株と対照株との遺伝子プロファイリングの比較解析を行うことにより、内胚葉誘導に関与する遺伝子群の同定を行う。

2）、ES細胞から内胚葉系幹細胞の分化誘導系の開発

ES細胞から膵臓までの分化誘導の過程を次の3つの素過程に分けることが出来る：a)内胚葉誘導過程、b)膵臓への組織特異的の分化決定過程、c)膵内内分泌細胞への細胞系譜の決定過程。これまで、ES細胞から膵臓への分化誘導については、膵臓の初期マーカーであるpdx-1遺伝子座にLacZ レポーター遺伝子を挿入しているES細胞株を用いて、LacZ染色でpdx-1遺伝子発現で膵への分化をモニターしてきた。LacZ レポーター遺伝子のは定量的なアッセ

イが簡便にできる利点があるが、リアルタイムで生きた細胞を解析するために、pdx-1プロモータの支配下にGFP(Green fluorescent protein)を繋いだコンストラクトを導入したES細胞株を樹立し、分化誘導によるGFPの発現を指標に膵へ分化したEs細胞由来分化細胞を純化する。

また、より上流である前腸内胚葉への分化をアッセイする系を新たに開発するために。前腸内胚葉で発現するHNF3\_マーカー遺伝子のプロモータの支配下にRFPを繋いだコンストラクトを導入したES細胞株を新たに樹立する。

3) ES細胞由来の膵幹細胞の単離同定

申請者らは、膵幹細胞のマーカー遺伝子であるpdx-1遺伝子のプロモーター支配下にGreen Fluorescent Protein (GFP)レポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスよりES細胞を最近樹立した。この方法で樹立したES細胞は、膵臓幹細胞でpdx-1遺伝子が特異的に発現されることがすでにトランスジェニックマウスで確認済みであるので、特異性の高いものと考えられる。本研究では、申請者らがこれまでに確立したES細胞から膵への効率のよい誘導条件において、このpdx-1-GFP導入ES細胞株を用いて、pdx-1を発現するES由来の膵幹細胞を生きた状態で純化する予定である。このES細胞由来のpdx-1陽性細胞について、さらに遺伝子発現プロファイリング解析により、上述の体性膵幹細胞と比較解析を行なう。そうすることにより、体性膵幹細胞との相似点や相違点、再生医療への有用性について考察できる。また、純化したES細胞由来のpdx-1陽性細胞については、さらに表面抗原を解析し、膵内内分泌細胞への分化能、及びその分化誘導制御機構について検討する予定である。

## ＜研究期間の成果＞

1) 成果の内容

我々は、膵への発分化の機序を明らかにするために、ES細胞を用いて、膵臓への分化過程を再現出来る実験系を構築している。これまでに、pdx1遺伝子座にlacZレポーター遺伝子をノックインしたES細胞を用いてきた。ES細胞から膵臓への分化誘導については、中胚葉、外胚葉由来の臓器に比べると非常に低い。これを解決するために、初期の胚様体 (EB; embryoid body) を胎児期の膵臓原基と共培養すると、膵臓への分化が誘導が促進されたことを見出した。すなわち、(i)膵臓原基とES細胞との共培養、(ii)TGF-β2の添加、(iii)ES細胞への内胚葉誘導因子c-mix遺伝子の強制発現、によってES細胞から膵への分化誘導が促進されることを明らかにした。

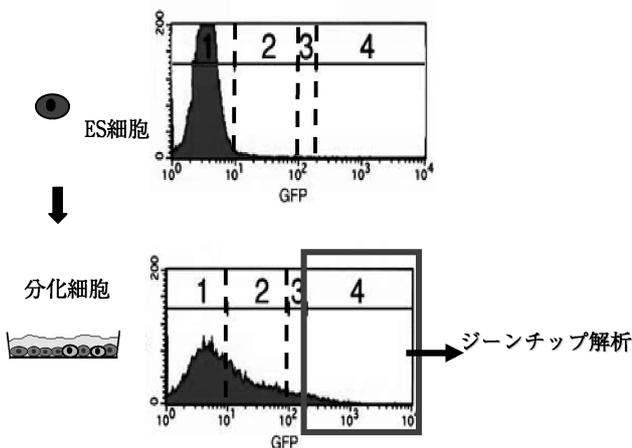
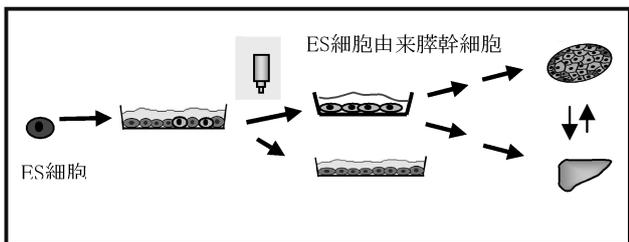
この結果は、試験管内でES細胞をある特定の方向へ分化を誘導可能であることを示したものである。

申請者らが構築したES細胞から膵への分化誘導系において、アフリカツメガエルのmix ファミリーのニワトリホモログであるc-mix遺伝子を強制発現させた結果、膵への分化誘導能が促進されたことを見出している。この結

果は、ES細胞の分化誘導の系を用いて内胚葉誘導因子のスクリーニングの系として有用であることを示したものである。

ES細胞由来の膵幹細胞をリアルタイムで追跡し、生きた細胞を純化するために、pdx-1遺伝子の発現をGFP（緑色蛍光タンパク質）で可視化した。まず、GFPが膵臓幹細胞で特異的に発現されることがすでに確認されているpdx-1-GFPトランスジェニックマウス（Gu et al., 2002）より、ES細胞株を樹立した。このES細胞株について、これまで確立した共培養系を用いて、十分に効率よくES細胞から膵へ分化を誘導することができることを確認している。

ES細胞から誘導されたpdx-1/GFP陽性細胞をセルソーターを用いて、GFP陽性細胞の蛍光強度に基づき分画した。RT-PCR法により解析した結果、GFP陽性分画にpdx-1陽性細胞が濃縮されていることが分かった。このES細胞由来のpdx-1陽性細胞について、遺伝子発現網羅的解析を行なった。我々の系で得られた膵幹細胞の遺伝子プロファイルと、既に報告されているマウス胎生7.5日目の正常内胚葉層及び膵幹細胞の遺伝子発現プロファイル（Gu et al., 2003）と比較した結果、マウス胎生7.5日目の内胚葉で発現する遺伝子プロファイルとよく似ているプロファイルであることが明らかとなった。従って、このES細胞の試験管内分化誘導の系を用いて正常発生を再現することができた。今後さらに異なるステージの内胚葉細胞系譜を純化し、その遺伝子網羅的発現解析を行なうことが期待できる。



#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究は、胚性幹細胞を用いて膵臓への分化誘導・膵再生の研究を行っている。中胚葉誘導についての研究が多くなされてきたのに対し、内胚葉誘導、内胚葉由来の臓器の発生のメカニズムについての研究は立ち遅れている。これまでには、内胚葉系の組織幹細胞に関する単離解析は国内外ではほとんどなく、将来的には器官再生へ

の応用が期待され、研究意義の高い研究分野である。本研究においてES細胞から膵への分化誘導の系を用いて、ES細胞への遺伝子強制発現により、内胚葉への分化誘導能を促進することができることを見出した。また、ES細胞から膵への効率よい分化誘導法を確立し、膵前駆細胞の純化、遺伝子発現プロファイルを世界先駆けて成功した。

最近、ES細胞から膵の再生へ、多く取り組みがされるようになってきたが、内胚葉系の発生分化、器官形成における分子的基盤の研究が依然として不十分であると言わざるを得ない。その背景には、内胚葉の分子マーカーの欠如と内胚葉系幹細胞の情報蓄積不足、という現状がある。近年、ノックアウトマウスを用いた研究により膵臓の発生分化に関与する遺伝子がいくつか同定されてきているが、いずれも膵臓原基が決定された後に関与する遺伝子ばかりであり、初期の膵の細胞系譜決定、幹細胞の機能維持に関与する遺伝子の研究が非常に少ない。ES細胞を用いた試験管内分化誘導の系は、胚発生の非常に初期の現象の解析が可能である優れたモデル系である。本研究では、膵幹細胞の系譜決定、遺伝子発現の動態に焦点を当て、ES細胞の試験管内誘導系を用いて、膵幹細胞の遺伝子発現、解析を進める点において非常に独創的である。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初の計画はほぼ達成できた。

cmix 遺伝子導入した高分化誘導能のES細胞株と対照ES細胞を用いた遺伝子プロファイリングの比較解析により内胚葉誘導に関与する遺伝子群の同定を行う予定だったが、発現に差がある遺伝子が多かったため、まだ絞り切れていない。今後は正常胚におけるこれらの遺伝子発現パターンを解析する予定である。

#### 〈今後の課題〉

今回確立したES細胞から膵幹細胞までの分化誘導の系を利用して、純化した膵幹細胞について、その性質、試験管での挙動を詳しく解析する。また、現時点では、分化誘導系が確立されたものの、内胚葉への分化誘導において機能しているシグナル分子はなにか、そのメカニズムは何かについて、依然として不明な点が多い。また、膵幹細胞から内分泌細胞あるいは外分泌細胞への分化誘導の制御がどのように行われているのかについてまだほとんど解析されてない。今後はこれらの点について焦点を絞り、さらに詳しく検討を要する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Kume, S. "Stem cell- based approaches for regenerative medicine." *Develop. Growth Diff.* 47, 393-402 (2005)
2. Kume, S. "The molecular basis and prospects of pancreatic development." *Develop. Growth Diff.* 47, 367-74 (2005)
3. Shiraki N., Lai C-J., Hishikari Y. and Kume S\*. "TGF- $\beta$  signaling potentiates differentiation of embryonic stem cells to Pdx-1 expressing endodermal cells." *Genes Cells* 10, 503-16 (2005).
4. Kodama, S., Toyonaga, T., Kondo, T., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Kawashima, J., Goto, H., Kume, K., Kume, S., Sakakida, M. and Araki, E. "Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during  $\beta$  cell regeneration in STZ-treated mice" *Biochem. Biophys.*

Res. Comm. 327, 1170-1178 (2005).

5. 0403301523

Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I. and Melton, D.A. "Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake" Science 299, 363 (2003).