

胚性幹細胞 (ES 細胞) からの 3 胚葉分化

奈良県立医科大学第 1 内科学教室

久保 篤 史

DIFFERENTIATION OF THREE GERM LAYERS FROM EMBRYONIC STEM (ES) CELLS

ATSUSHI KUBO

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University,

Received October 10, 2008

Abstract : 近年, ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) からの様々な細胞への分化の報告がなされており, 骨髄細胞由来の間葉系幹細胞なども樹立されて, 再生医療への応用が期待されている. さらに最近では, ヒト皮膚線維芽細胞からヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの樹立もあり, 倫理的問題がなく, 拒絶のない夢の再生医療にさらなる注目がなされている. これらの未分化幹細胞から臓器特異的な細胞への分化は, 胎児での胚形成と非常に似た分化段階を有していることが分かっており, まず第 1 段階として, 幹細胞からの 3 胚葉分化のメカニズムの解明が非常に重要である. これまで, ES 細胞から外胚葉, 中胚葉細胞への報告は多数あったが, 内胚葉細胞への分化についての報告はなかった. 我々は, 無血清培地条件下でアクチビンによる内胚葉分化の方法を確立し, 報告している. 本稿では, 我々の ES 細胞からの 3 胚葉分化についての研究成果と最近の知見について述べてみたい.

Key words : embryonic stem cells, germ layer, endoderm, activin, Hex

はじめに

胚性幹細胞 (ES 細胞) は, 受精卵から胎児へ成長していく途中の胚盤胞という段階で, 内部細胞塊から取り出された細胞です¹⁾. 内部細胞塊は, いずれ外胚葉, 内胚葉, 中胚葉というすべての胚葉形成を通じて, すべての体の細胞を形成していきます. この内部細胞塊を取り出し, LIF 存在下で未分化状態のまま培養できるようにした細胞が ES 細胞と呼ばれています. この ES 細胞は, 内部細胞塊由来の細胞なので, すべての 3 胚葉に分化する能力があり, 様々な組織, 臓器に分化する能力を有すると考えられています. 実際, ES 細胞を胚盤胞に戻すと, ES 細胞由来の細胞があらゆる組織に分化することで, キメラマウスが作成されます. *in vitro* で遺伝子欠損を作成した ES 細胞を胚盤胞に戻して, キメラマウスを作成し, この遺伝子欠損 ES 細胞がさらに生殖細胞にも分化することを利用して, ノックアウトマウスが作成されま

す. この技術は, 昨年度のノーベル医学生理学賞を受賞したのは記憶に新しいところです. また, ES 細胞をそのままマウスの皮下に移植すると皮膚, 骨, 腸管, 神経などの 3 胚葉由来組織に分化し, *in vivo* での多能性も証明されています. また, *in vitro* においても, ES 細胞を LIF を除いた状態で浮遊培養を行うと, ES 細胞は分化に伴って球形の胚様体 (EB) を形成します²⁾. この EB の内部で様々な細胞への分化・発生が進行します. 理論上, この ES 細胞から様々な組織に分化した細胞を移植すれば, 再生医療ができるのではないかということになります (実際は, そう簡単なことではありませんが...). この ES 細胞を再生医療に応用する利点として, 1) 上記のように多能性なので, あらゆる細胞に分化させることができる. 2) ES 細胞は, 多能性を有したまま無尽蔵に増殖可能なので, ドナー不足になりがちな細胞を理論上はいくらでも作り出せることができる. 3) 自己の ES 細胞, もしくは様々な HLA タイピングを有する ES 細胞バンク

を確立することで、拒絶反応のない移植細胞を作成することができる、と言うことができると思います。しかしながら、受精卵を壊して作成するということから、倫理上の問題は常に論じられており、アメリカではブッシュ政権の強い反対のもとで、ヒト ES 細胞については科研費による研究は今でも禁じられています。そこで、最近救世主のごとく現れたのが、京都大学の山中教授らが樹立した iPS 細胞です²⁾。皮膚細胞から作成できるために、このような倫理的問題がなく、さらに大人の皮膚から容易に自己 iPS を作るために、一気に世界的に脚光を浴びることになりました。一方で、この iPS 細胞の出現により、ES 細胞研究はさらに重要性を増しています。これまでに 10 年かかった ES 細胞研究の蓄積された知識を利用して、マウス iPS の樹立からたった 1 年でヒト iPS 細胞の樹立が世界中でなされ、その分化についても、ES 細胞技術を応用することが可能であることが報告されつつあります³⁾。これらのことから、多能性幹細胞から目的の胚葉を誘導し、さらにその胚葉から効率よくそれぞれの由来組織に段階的に分化させていく方法の確立が再生医療の進歩のために非常に重要となってくると思われま。本稿では、主にマウス ES 細胞からの 3 胚葉分化について述べさせて頂き、その応用としてこの分化システムを用いた遺伝子の機能評価システムについても述べさせて頂きたいと思ひます。

ES細胞からの中胚葉ならびに外胚葉分化

それでは、どういった方法で ES 細胞は 3 胚葉に分化可能なのでしょうが？私が 3 年間留学させて頂いた Mount Sinai School of Medicine, NY, USA (現在は、McEwen Centre for Regenerative Medicine, Toronto, Canada のディレクター)の Gordon Keller 教授は、もともと ES 細胞から血球系細胞の分化システムを構築したことで有名な研究者です。また、卵黄囊での胎児型赤血球は、内皮細胞に囲まれた blood island で発生することが知られています⁴⁾、形態的なことからこの胎児型赤血球は、この blood island の内皮細胞から分化するのではないかと仮説があり、この内皮細胞と胎児型赤血球に共通の前駆細胞であるヘマンジオブラストが存在すると示唆されていました⁵⁾。しかしながら、胎児の blood island という小さな組織でその存在を証明することは困難でした。Keller 教授らは、ES 細胞の分化システムを用いて、VEGF の receptor である Flk-1 陽性細胞から内皮細胞と血球系細胞が発生してくることを証明し、この Flk-1 陽性細胞がヘマンジオブラストであることを明らかにしました^{6,7)}。しかしながら、この時点では世界的に

みても ES 細胞からの胚葉形成を明確にし、それぞれの由来組織に分化させるというシステムや考え方はありませんでした。つまり、ES 細胞からどういった細胞ができたといったことが注目されており、その途中の胚葉形成には、重点が置かれていなかった状態でした。彼らの中心的テーマであった血球系細胞は、中胚葉由来細胞でしたので、彼らはまず ES 細胞を中胚葉に分化させる方法について取り組みました。方法としては、中胚葉で発現する遺伝子である Brachyury に着目し、この遺伝子座に GFP をノックインし、GFP を観察することで中胚葉の分化を追跡することができる ES 細胞 (GFP-Bry ES 細胞) を構築しました⁸⁾。この細胞を血清存在下で分化させると、培養 4 日目に約 90% の細胞が Brachyury 陽性になることが分かりました。つまり、血清 (血球系細胞分化用にロット・チェックされたもの) は強烈な中胚葉分化因子を含んでおり、この中胚葉細胞が血球系細胞に分化することが示されました。さらに、この Brachyury 陽性細胞から Flk-1 陽性細胞が出現し、Brachyury/Flk-1 陽性細胞からヘマンジオブラストが分化、さらにはこのヘマンジオブラストから血球系細胞と内皮細胞が分化することも明らかにしました。このシステムを用いることで、多能性幹細胞から中胚葉、さらにはその由来細胞への分化が段階的に評価できるようになりました。このことは、中胚葉、もしくはヘマンジオブラストのような前駆細胞を FACS でソートすることにより、より純度の高い細胞群を単離することを可能にしました。さらに、後にこのシステムを用いて、Brachyury/Flk-1 陽性細胞が発生の時間経過の少し遅い段階で心筋細胞にも分化することを明らかにしています。

それでは、外胚葉についてはどうでしょうか？外胚葉は、ES 細胞研究の最も早い段階から外胚葉由来細胞である神経細胞などへの分化が報告されています^{9,10)}。ES 細胞は、もともと外胚葉の特徴を有するために、特に外因的な誘導因子がないと、そのまま外胚葉へ分化するのではないかと考えられています。そこで、分化方法も先ほどの血清という分化因子を用いるのと反対で、無血清での培養条件がいろいろと確立されており、神経細胞への分化が報告されています。我々も Stem Pro34 という培地と Knockout serum replacement という 2 つの培地を組み合わせることで、ES 細胞の無血清培養条件を確立し、bIII-tubulin 陽性の神経細胞に分化させる方法を確立しました¹¹⁾。

ES細胞からの内胚葉分化

それまで中胚葉、外胚葉由来細胞への分化については、

数多く報告されていましたが、内胚葉についてはという
と肝細胞への分化についての報告がいくつかあるのみで、
内胚葉の分化条件は不明でした。その当時、私は上記シ
ステムを用いて、研究室の数人のメンバーとヘマンジオ
プラストに関わる新規遺伝子の探索というテーマを最初
の1年かけてやっており、追っていた5つの内3つが既
知遺伝子で、2つは未知遺伝子ではあるものの転写因子
ではなく、今後さらにそれを追っていくか悩んでいると
ころでした。Keller 教授は、Xenopus の animal cap assay
で中胚葉と内胚葉の共通の胚葉である中内胚葉というの
があると提唱されている¹²⁾。マウス胎児にも同様のもの
があるのではないかと一度、そちらも平行してやってみ
たらどうか？ と言って下さいました。これまた先の見え
ない仕事でしたが、Keller 教授は説得が本当にお上手で、何
となく乗せられてプロジェクトがスタートしました(結

果的には、こちらの仕事がメインとなりました)。

マウス胎児で中胚葉は、原始外胚葉の後部の primitive
streak と呼ばれる部分から発生します。この部分に
先述の Brachyury も発現しています。それでは、内胚葉
はというと、この primitive streak の前端部分に HNF3 β
という遺伝子発現が認められて、この部分が内胚葉に分
化していくことが分かっています^{13,14)}。そうすると、こ
の primitive streak の前端部分に中内胚葉があるのか？
ということになります。方法としては、いたってシンプ
ルで、先述の GFP-Bry ES 細胞を用いて、HNF3 β が
GFP-Bry 陽性の population から分化してくるかという
実験を試みました¹¹⁾。実際には、GFP-Bry が発現し始め
る分化 2.5 日目に GFP-Bry 陰性細胞群と陽性細胞群(約
6%)をソートし、再度 EB 形成させることで、分化を継
続的に促して、その遺伝子発現を解析するという方法を

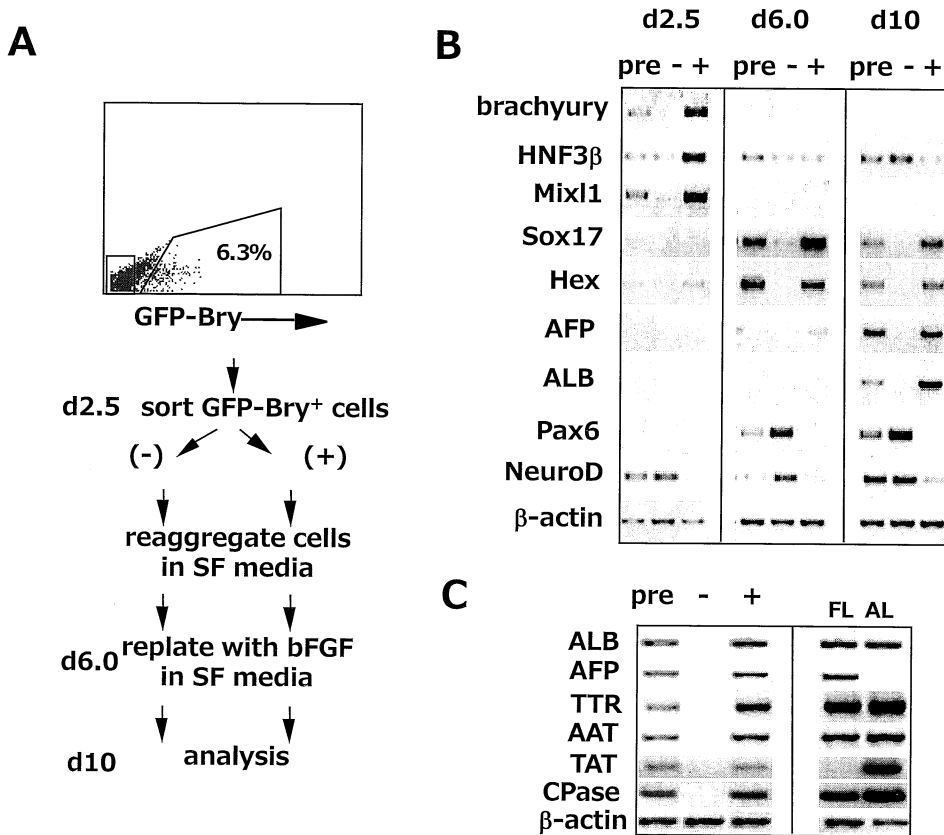


図 1. GFP-Bry 陽性細胞における内胚葉分化

培養 2.5 日目に GFP-Bry によりソートされた細胞を再度 EB 形成を行い、10 日まで継続培養を行った。pre-sort (p), GFP-Bry 陰性 (-), GFP-Bry 陽性 (+) (A) FACS による培養 2.5 日目の EB での GFP-Bry 解析 (B) 培養 2.5 日から 10 日までの RT-PCR による遺伝子発現解析 (C) さらに培養 10 日に肝臓分化の条件で 14 日まで培養し、肝細胞のマーカー遺伝子を RT-PCR で解析した。(文献 11 より改変)

とりました(図1 A). すると非常におもしろいことに血清存在下でGFP-Bryが最初に陽性になってくる分化2.5日目のBry-GFP陽性細胞でHNF3βの遺伝子発現を認めました(図1 B). しかし, このまま血清存在下で培養すると, 90%が中胚葉に分化してしまうために, この血清培養2.5日目で無血清培地に変更しました. そうしますと, 中胚葉への分化が阻害されて, Sox17やHhexなどの内胚葉で発現する遺伝子がGFP-Bry陽性細胞から出現してくることが明らかにされました(図1 B). 一方で, GFP-Bry陰性細胞からは, 神経外胚葉で発現するPax6などが発現することが分かりました. さらに, この細胞の培養を進めていくと, アルブミンなどの様々な肝細胞のマーカー遺伝子発現もGFP-Bry陽性細胞群から誘導できることが明らかにできました(図1 C). つまり, 血清で誘導される初期のBrachyury陽性細胞は, HNF3βを共発現している中内胚葉であり, この中内胚葉から肝細胞が分化してくることを明らかにすることができました.

しかしながら, この方法では十分に中内胚葉を誘導することはできません. そこで, どういった因子が中内胚

葉を誘導できるかを探索することを開始しました. 方法としては, 先述の外胚葉の分化条件である無血清培養条件を用いました. この無血清条件でES細胞を培養しても, 何の刺激因子もないために外胚葉に分化してしまいます. もし, 何らかの因子がこの無刺激状態で, 内胚葉への分化を促すことができれば, 内胚葉の分化因子とすることができます. そこで, 我々はGFP-Bry ES細胞をこの無血清条件で培養し, どの因子がBry-GFPを誘導できるかをFACSでスクリーニングするアッセイ・システムとして用いることにしました. 我々が着目した候補因子の中の1つがアクチビンでした. アクチビンは, Xenopusのanimal cap assayで, 低-中濃度で中胚葉を誘導し, 高濃度で中内胚葉を誘導することが報告されています^{12,15)}. これらのことから, 無血清培養2日目に高濃度(100ng/ml)のアクチビンを添加してみました. そうしますと, 培養5日目にアクチビンによるGFP-Bryの誘導を認めました(図2 A). また, アクチビンの濃度を変えて, 同様の実験を行いますと, 低濃度の3ng/mlでも十分にGFP-Bryの誘導は行えるということが分かりました(図2 B). 期待して内胚葉の遺伝子発現を検討し

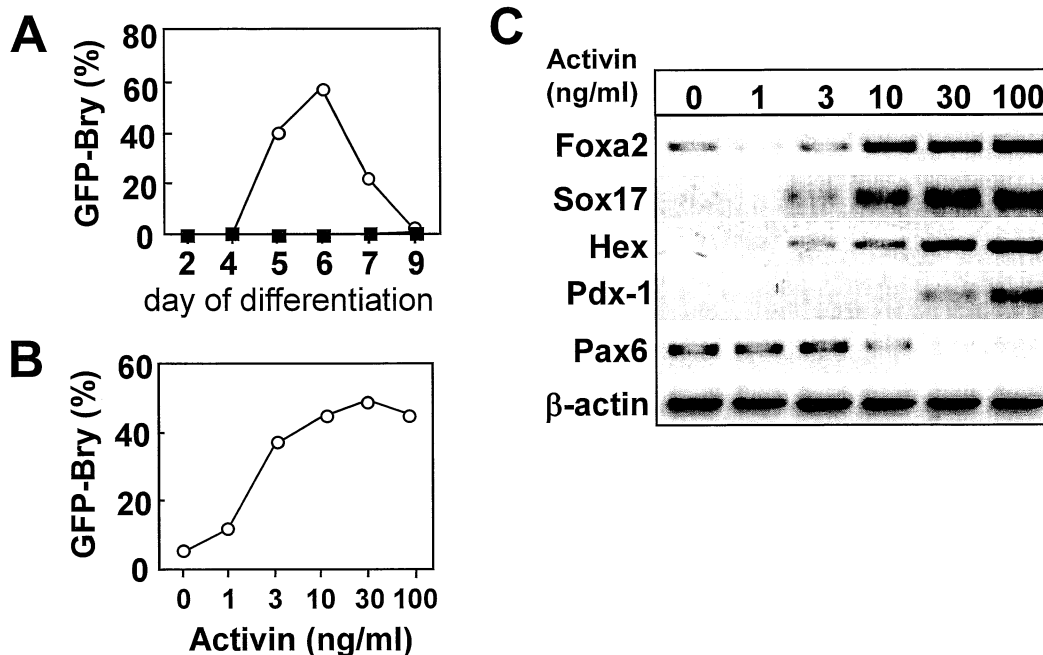


図2. GFP-Bry の発現と内胚葉誘導におけるアクチビンの効果
 ES細胞は, 無血清培地で培養されて, 2日目にアクチビン存在下で培養された. (A)100ng/mlのアクチビン存在下でのFACSによるGFP-Bry発現解析. 培養2日目から9日目までの経時的変化. (B)FACS解析でのアクチビン濃度によるGFP-Bry発現解析. (C)培養7日目のEBでのRT-PCRによる内胚葉遺伝子の発現解析. (文献11より改変)

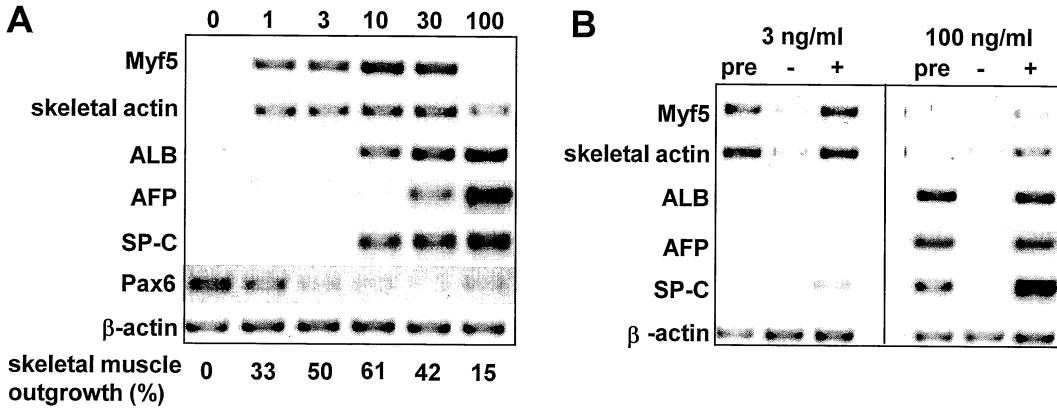


図 3. アクチビンによる骨格筋細胞ならびに肝細胞分化

ES 細胞は、無血清培地で培養されて、2-6 日目にアクチビン存在下で培養された。(A) 培養 10 日目に接着培養を行い、14 日目に骨格筋マーカー遺伝子 (Myf5, skeletal actin)、肝細胞マーカー遺伝子 (ALB, AFP)、肺マーカー遺伝子 (SP-C) ならびに神経外胚葉 (Pax6) が RT-PCR により解析された。(B) 3ng/ml もしくは 100ng/ml のアクチビン濃度で培養された培養 5 日目の EB は FACS によりソートを行い、継続的に培養した。培養 17 日目に RT-PCR によりこれらのマーカー遺伝子を解析した。(文献 11 より改変)

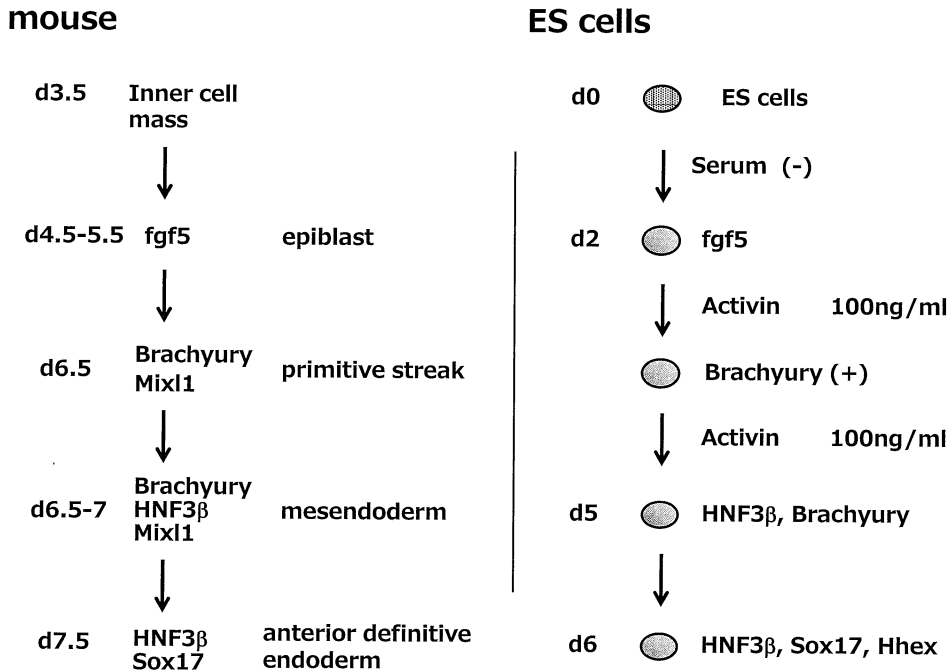


図 4. マウスと ES 細胞における内胚葉分化の比較

てみますと、高濃度のアクチピンを添加した群で、期待通りに HNF3 β , Sox17, Hhex をはじめとする様々な内胚葉のマーカ遺伝子が誘導されていることが分かりました(図2 C)。一方で、低濃度のアクチピンを添加した群では、GFP-Bry の誘導は認めるものの、内胚葉マーカ遺伝子の出現はないことが分かりました。さらに調べていくと、低-中濃度のアクチピンから誘導された細胞は、Myf5 ならびに Skeletal actin を発現する骨格筋細胞に分化し、高濃度のアクチピンから誘導された細胞は、アルブミン遺伝子発現を有する肝細胞に分化することが分かりました(図3 A)。また、これらの分化は、GFP-Bry 陽性細胞から分化していることも明らかにされました(図3 B)。つまり、同様の GFP-Bry を発現している細胞であっても、低濃度のアクチピンで誘導された GFP-Bry 陽性細胞は、骨格筋に分化し、高濃度のアクチピンで刺激された GFP-Bry 陽性細胞は、肝細胞に分化するということになり、アクチピンの濃度によりその後の分化方向が全く異なっているということが分かりました。これらの結果から、Xenopus と同様にマウスにお

いてもアクチピンは morphogen として濃度依存的に中内胚葉を誘導していることを明らかにすることができました。これらの結果は、マウス胎児での発生を模倣していると考えられ、マウス ES 細胞分化を観察することにより、マウス胎児で見られる epiblast から中内胚葉への分化、さらにはそれぞれの内胚葉組織への分化を観察できるシステムとして利用できる可能性が示唆されました(図4)。このアクチピンを用いた内胚葉分化方法は、現在広く使われており、肝細胞だけでなく、甲状腺、膵臓、肺など様々な内胚葉組織への分化方法として世界標準の方法となっており、100 以上の論文に引用されています¹⁶ ¹⁷。また、ヒト ES 細胞でも同様にアクチピンを用いて、内胚葉分化に成功しており¹⁸、iPS 細胞でも同様の方法で内胚葉を分化することができることを期待しています。

ES細胞からの3胚葉分化システムを用いたHematopoetically expressed homeobox (Hex) 遺伝子の機能解析

胎児での遺伝子機能評価は、ノックアウトマウスやト

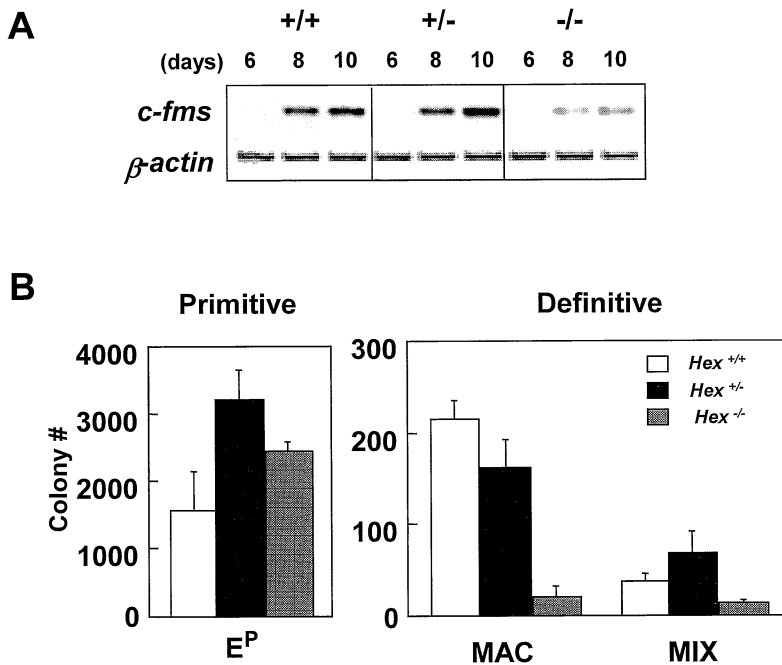


図5. Hex 遺伝子欠損 ES 細胞における血球系細胞分化
Hex 遺伝子欠損 ES 細胞を血清存在下で 6 日間培養した。Hex^{+/+} (+/+), Hex^{+/-} (+/-), Hex^{-/-} (-/-)(A)血清培養 6 日目にマクロファージ・マーカ遺伝子である *c-fms* 遺伝子を RT-PCR による遺伝子解析。(B)血清存在下で培養した EB を用いて、血球系コロニー・アッセイを行った。Ep; primitive erythrocyte, Mac; macrophage colony, Mix; mix colony (文献 22 より改変)

ランスジェニックマウスを用いて可能であるが、胎生致死に至った場合には臓器欠損や奇形など大きな変化がないとその遺伝子の機能を明らかにすることが困難な場合があります。そこで、この 3 胚葉分化システムを用いて、遺伝子の機能評価ができないか考えてみました。我々は、Hex という転写因子に注目してみました。Hex 遺伝子発現は、胎児卵黄嚢の blood island や肝臓が発生する liver bud, 内皮細胞の前駆細胞などで認められています¹⁹⁾。Hex のノックアウトマウスの解析では、脳の欠損、マクロファージの欠損、肝臓の欠損など、3 胚葉にわたり胎児発生異常を認めることが報告されています^{20, 21)}。そこ

で我々は、Hex 遺伝子を欠損した ES 細胞 (Hex^{-/-} ES 細胞) を用いて、上記のシステムで 3 胚葉分化を行い、その機能解析を行いました²²⁾。まず、我々は Hex^{-/-} ES 細胞を用いて、血球系細胞の分化アッセイを行ったところ、Hex^{-/-} ES 細胞でマクロファージで発現する c-fms 遺伝子発現の抑制 (図 5A) とマクロファージ・コロニーの著名な減少 (図 5B) を認めました。次に発現分布をみてみたところ、Bry+/Flk-1+ のヘマンジオブラストの細胞群で Hex の強い発現を認めました。さらに VEGF 存在下で出現するヘマンジオブラスト・コロニーである blast colony でも強い Hex の発現が確認されました。先ほど述

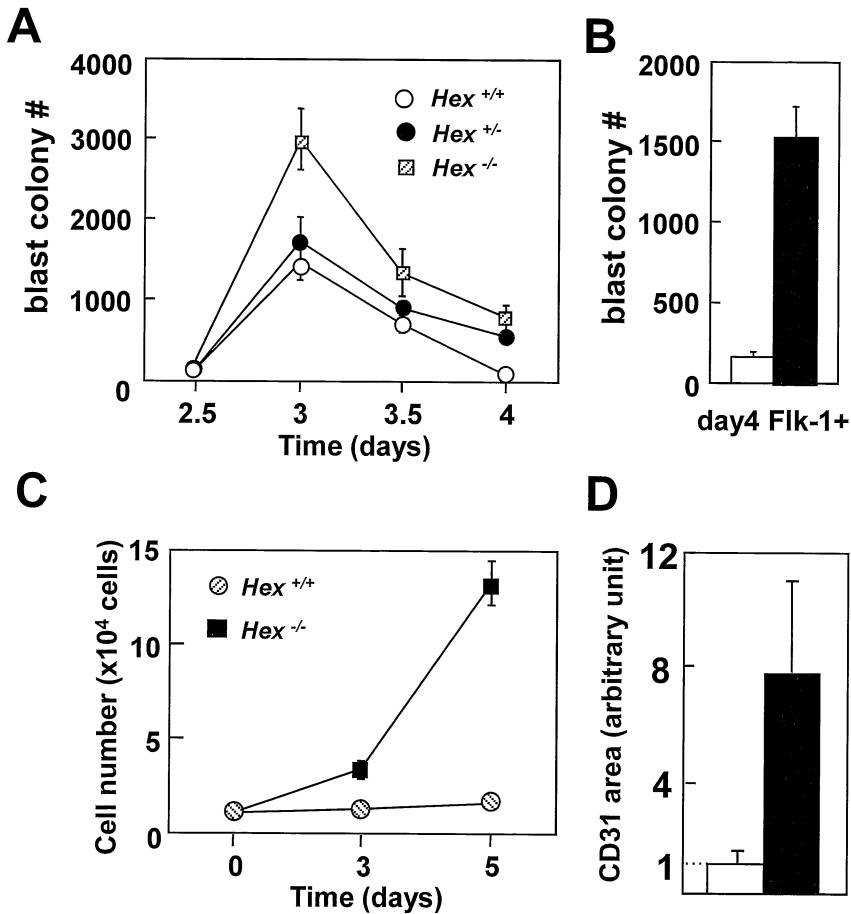


図 6. Hex 遺伝子欠損 ES 細胞におけるヘマンジオブラストならびに内皮細胞分化

(A) Hex 遺伝子欠損 ES 細胞を血清存在下で 4 日間培養して、blast colony assay (ヘマンジオブラスト・コロニー) を行った。(B) 血清培養 4 日目に Flk-1 陽性細胞を FACS でソートし、blast colony assay を行った。Open bar; Hex^{+/+}, closed bar; Hex^{-/-} (C) 培養 4 日目の Flk-1 陽性細胞は、matrigel 上で VEGF 存在下にて培養を行った。それぞれの時点で増殖細胞数が評価された。(D) matrigel での培養 5 日目に CD31 で免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で CD31 陽性面積が評価された。Open bar; Hex^{+/+}, closed bar; Hex^{-/-} (文献 22 より改変)

べたようにHexは卵黄囊のblood islandで発現していることが確認されており、Hexがヘマンジオブラストの発生に何らかの役割を果たしているのではないかと考えました。そこで、Hex^{-/-}ES細胞を用いてblast colony assayを行ったところ、blast colonyが著名に増加することが確認されました(図6A)。さらに、培養4日目のFlk-1陽性細胞を単離して同様の実験を行うと、さらにこの結果は顕著となりました(図6B)。次に、内皮細胞でのHexの役割を検討するために、内皮細胞の分化・培養系を確立しました。この方法は、血清培養4日目にFlk-1陽性細胞をFACSで単離し、VEGF存在下でmatrigel上で培養すると、CD31陽性内皮細胞とSMA陽性平滑筋細胞が出現してくるというものです。この条件で培養すると、通常は細胞増殖はそれほど見られずに、内皮細胞や平滑筋細胞への分化が中心となります。しかし、Hex^{-/-}ES細胞をこの方法を用いて分化させると、細胞増殖が非常に顕著となり、培養5日目には約15倍にも細胞数が増加することが分かりました(図6C)。さらに、この増殖細胞が何かを検討するために、CD31ならびにSMAで免疫染色を行うと、CD31陽性細胞が約10倍程度に増加していることを明らかにすることができました(図6D)。これらのことにより、ヘマンジオブラストで発現しているHexが主に内皮細胞増殖を抑制する方向で働いており、Hex遺伝子の欠損により無秩序に内皮細胞の増殖が誘導されることが明らかになりました。実際に、その後のノックアウトマウスの解析により、Hex遺伝子欠損マウスでは、血管の拡張(内皮細胞の増殖)と脆弱血管からの出血なども確認されており²⁹⁾、ES細胞での実験データを裏付けています。逆に、Hexを過剰発現させることができるES細胞(tet-Hex ES細胞)を用いて実験を行うと、先ほどとは逆に、Hexの過剰発現がFlk-1の発現抑制、ならびにblast colonyの抑制を引き起こすことが確認できました。Hexは、様々な遺伝子のrepressorとして働いているということも分かっており²⁴⁾、このrepressorとしての役割が、ヘマンジオブラストの発生段階で強く関与しているものと思われました。また、Hexの肝臓発生での働きについて検討したところ、Hex^{-/-}ES細胞からの内胚葉分化では、アルブミン遺伝子発現は認められず、逆に内胚葉誘導時にHexを過剰発現させることで、肝細胞への誘導を促進することができることが示されました(投稿準備中)。また、我々は共同研究として、同様のシステムを用いてKlf6遺伝子の血球系細胞発生における機能解析についても成功しています²⁵⁾。

ES細胞からの内胚葉分化についての最近の知見

アクチビンにより内胚葉が誘導できるという報告の後、ES細胞からの内胚葉への分化についても目覚ましい進歩が見られています。まず、内胚葉細胞のsubpopulation解析が行われ、内胚葉細胞にはc-kit, CXCR4, E-cadherinなどのいくつかの表面マーカーが発現しており、これらのマーカーにより内胚葉細胞を単離することができるようになりました^{26, 27)}。これらの方法で解析すれば、私が確立したアクチビンによる内胚葉分化条件では、約20%の細胞が内胚葉に分化していることが分かりました。さらに、Keller教授の研究室では、さらに内胚葉分化誘導条件を改良し、50-60%の細胞を内胚葉に誘導できる新しい分化条件を確立されています²⁷⁾。この条件で、BMP4を添加することで、内胚葉から肝細胞への効率的な分化を促し、実際にこの肝細胞をマウスの肝臓に移植し、生着させるというところまで報告しています。また、ES細胞を用いた再生医療で、当初から期待の高かった膵β細胞への分化についても進展が見られました。膵β細胞への分化は、糖尿病治療への応用が期待されており、当初から多くの研究者がしのぎを削っていました。その中で最初の報告は、ES細胞から外胚葉に分化させて、神経細胞に分化させたときにinsulin2の遺伝子発現を認めたというものでした²⁸⁾。しかしながら、マウスにはinsulin1とinsulin2という2つのインスリン遺伝子があり、膵β細胞では両方のインスリン遺伝子が発現しているのに対し、脳などの神経細胞でもinsulin2の遺伝子発現があることから、この細胞は神経由来のインスリン産生細胞であると考えられました。また、免疫染色によるインスリン染色も、培養メディアウムに含まれるインスリンの取り込みであるという結論になり、研究は振り出しに戻ってしまいました²⁹⁾。最近では、やはり膵臓は内胚葉由来臓器であるので、内胚葉誘導を行った後に、膵臓への分化を試みるという方法がとられています。D'Amourらは、アクチビンにより内胚葉を分化したのちに、膵分化に関わる様々な誘導因子を段階的に加えることで、insulin1とinsulin2遺伝子両方を発現する細胞の分化に成功しています³⁰⁾。これらの細胞は、インスリンを分泌するのみでなく、C-peptideの分泌も認め、KCLやcAMP刺激によりC-peptideの分泌が亢進することが示されました。しかしながら、糖反応性は認めずに、さらなる分化・成熟が必要であることが示されました。最近、同グループは、これらの細胞を糖尿病マウスに移植すると、生体内で細胞のさらなる分化が促されて、糖反応性を含む血糖降下作用を有することを示しました³¹⁾。

iPS 細胞の樹立に伴い、再生医療の分野はますます今後脚光を浴びるものと思われまふ。しかしながら、実際に患者さんの治療に応用するには、奇形腫の問題など様々な解決すべき問題もあり、まだしばらく時間がかかるように思ひます。一方で、これらのシステムは、生体のシステムを *in vitro* で再現することができるという点で非常に興味深く、薬剤のスクリーニングや発生機構を解明する上でも非常に有用であると考えられています。現在私は、内胚葉からの膵臓への分化システムの構築に取り組んでおり、ES 細胞を用いて膵ペータ細胞分化機構を明らかにし、薬剤スクリーニングに用いることができるような *in vitro* システムの構築をできればと考えております。さらにこれらの研究を通して、いつかは糖尿病治療にも応用できるような成果が得られることを夢見て、今後がんばっていきたくて考えております。

謝 辞

ES 細胞研究について、留学中ご指導して頂きました Gordon Keller 教授ならびに Keller 研究室のメンバーに深謝申し上げます。また、留学前後ご指導頂きました米増國雄前教授(前公衆衛生学)、現在ご指導頂いております斎藤能彦教授、大学院の時より研究の手ほどきをして頂いた岩野正之先生、ならびにこれまで一緒に研究をして頂いた多くの奈良県立医科大学の諸先生方へ感謝申し上げます。

文 献

- 1) Keller, G.M. : *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7** : 862-969, 1995.
- 2) Takahashi, K. and Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006.
- 3) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda K. and Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007.
- 4) Haar, J.L., Ackerman, G.A. : Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. *Anat. Rec.* **170** : 437-455, 1971.
- 5) Sabin, F.R. : Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contributions to embryology* **9** : 213-262, 1920.
- 6) Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C. and Keller, G. : A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125** : 725-732, 1998.
- 7) Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., Palis, J. and Keller, G. : Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* **432** : 625-630, 2004.
- 8) Fehling, H.J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G. and Kouskoff, V. : Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* **130** : 4217-4227, 2003.
- 9) Okabe, S., Forsberg_Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M. and McKay, R.D. : Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech. Dev.* **59** : 89-102, 1996.
- 10) Brustle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karam, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D. and McKay, R.D. : Embryonic stem cell-derived glial precursors : a source of myelinating transplants. *Science* **285** : 754-756, 1999.
- 11) Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J.M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H.J. and Keller, G. : Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* **131** : 1651-1662, 2004.
- 12) Rodaway, A. and Patient, R. : Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* **105** : 169-172, 2001.
- 13) Wells, J.M. and Melton, D.A. : Vertebrate, endoderm development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15** : 393-410, 1999.
- 14) Sasaki, H. and Hogan, B.L. : Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* **118** : 47-59, 1993.
- 15) Smith, J.C., Price, B.M., Van Nimmen, K. and Huylebroeck, D. : Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* **345** : 729-731, 1990.

- 16) Lin, R.Y., Kubo, A., Keller, G.M. and Davies, T.F. : Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro. *Endocrinology* **144** : 2644-2649, 2003.
- 17) Ku, H.T., Zhang, N., Kubo, A., O'Connor, R, Mao, M., Keller, G. and Bromberg, J.S.: Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro. *Stem Cells* **22** : 1205-1217, 2004.
- 18) D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E. and Baetge, E.E. : Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **23** : 1534-1541, 2005
- 19) Bedford, F.K., Ashworth, A., Enver, T. and Wiedemann, L.M. : HEX; a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids. Res.* **21** : 1245-1249, 1993.
- 20) Barbera, J.P.M., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D. and Beddington, R.S.P. : The homeobox gene Hex is required in definitive endoderm tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127** : 2433-2445, 2000.
- 21) Keng, V.W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T., Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M., Sato, M. and Noguchi, T. : Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of monocyte lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276** : 1155-1161, 2000.
- 22) Kubo, A., Chen, V., Kennedy, M., Zahradka, E., Daley, G.Q. and Keller, G. : The homeobox gene HEX regulates proliferation and differentiation of hemangioblasts and endothelial cells during ES cell differentiation. *Blood* **105** : 4590-4597, 2005.
- 23) Hallaq, H., Pinter, E., Enciso, J., McGrath, J., Zeiss, C., Bruecker, M., Madri, J., Jacobs, H.C., Wilson, C.M., Vasavada, H., Jiang, X. and Bogue, C.W. : A null mutation of Hhex results in abnormal cardiac development, defective vasculogenesis and elevated Vegfa levels. *Development* **131** : 5197-5209, 2004.
- 24) Nakagawa, T., Abe, M., Yamazaki, T., Miyashita, H., Niwa, H., Kokubun, S. and Sato, Y. : HEX acts as a negative regulator of angiogenesis by modulating the expression of angiogenesis-related gene in endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **23** : 231-237, 2003.
- 25) Matsumoto, N., Kubo, A., Liu, H., Akita, K., Laub, F., Ramirez, F., Keller, G. and Friedman, S.L. : Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood* **107** : 1357-1365, 2006.
- 26) Tada, S, Era, T., Furusawa, C, Sakurai, H, Nishikawa, S, Kinoshita, M., Nakao, K. and Chiba, T : Characterization of mesendoderm : a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* **132** : 4363-4374, 2005.
- 27) Gouon_Evans, V., Boussemart, L., Gadue, P., Nierhoff, D., Koehler, C.I., Kubo, A., Shafritz, D.A. and Keller, G. : BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **24** : 1402-1411, 2006.
- 28) Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. and McKay, R. : Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292** : 1389-1394, 2001.
- 29) 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.
- 30) D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, MA., Kroon, E., Carpenter, M.K. and Baetge, E.E. : Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **24** : 1392-1401, 2006.
- 31) Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., Agulnick, A.D., D'Amour, K.A., Carpenter,

M.K. and **Baetge, E.E** : Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells gener-

ates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2008.