

主論文の要旨

**Improved methods for the differentiation of
hypothalamic vasopressin neurons using mouse
induced pluripotent stem cells**

マウス人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いた
視床下部バソプレシンニューロンの改善した分化誘導法

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

（指導：有馬 寛 教授）

光本 一樹

【緒言】

視床下部は、身体機能の恒常性調節に必要不可欠である。視床下部ニューロンを用いる研究は、十分な数の細胞を確保しつつ機能を維持する点で技術的な問題があった。解決策の1つとして、胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞など、多能性幹細胞の利用が挙げられる。

胚発生中の臓器形成は複雑なプロセスで構成されるが、これを *in vitro* でモデル化することを可能としてきた。我々の同僚はこれまでに、ES細胞の三次元培養法による神経分化法を確立し、**serum-free culture of embryoid body-like aggregates with quick re-aggregation (SFEBq)** と呼ばれている。SFEBq を使用して、我々と同僚は、マウスおよびヒト ES 細胞からのバソプレシン陽性ニューロンなどの視床下部ニューロンの分化培養法を開発し、これらの系を利用した分析用の *in vitro* モデルを開発した。これらの視床下部誘導法は、胚発生において視床下部が神経板の最も吻側部に由来するという原理に基づいている。最吻側を実現するために、培養初期分化段階で外因性パターン化因子を厳密に除去した培地（gfCDM）を用いることが吻側視床下部様前駆細胞の形成に重要である。我々の培養方法は、分化細胞からバソプレシン（AVP）分泌を達成した、すなわち機能的な視床下部ニューロンを分化出来る唯一の技術である。

視床下部モデルとして利用するために、機能性の再現に加えてもう一つ重要なのが、分化効率である。我々の方法は、既報と比較して高い AVP ニューロンへの分化効率を達成していた。しかし、誘導細胞を *in vitro* モデルとして簡便に使用できるようにするには、更に効率を高めるための技術的な改善が必要であった。

本研究では、マウス iPS 細胞から視床下部 AVP ニューロンへの分化誘導効率を改善させることを目的とした。

【対象および方法】

C57BL/6J マウス胎児（E12.5）の線維芽細胞よりマウス iPS 細胞株を樹立した。

液体窒素で凍結保存中のマウス iPS 細胞を解凍し、マイトマイシン C 処理した mouse embryonic fibroblast (MEF) をフィーダー細胞として、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) および Y27632 を含む培地にて培養した。翌日、Y27632 を含まない維持培地に交換した。マウス iPS 細胞のコロニーをトリプシン-EDTA 処理で剥離し、ピペッティングにて単一細胞に分離、PBS にて洗浄後、非コーティングディッシュ上の Y27632 を含む維持培地に懸濁した。マウス iPS 細胞は4日後には浮遊凝集体を形成した。これら浮遊凝集体を回収、再びトリプシン-EDTA 処理することで解離した単一細胞を新たな維持培地に懸濁した。これらの継代手順を4日ごとに繰り返した。

形成した浮遊凝集体を凍結保存液 CELLBANKER1 にて凍結し、液体窒素で気相保存した。4日後、それらを解凍、継代し、新たに形成された浮遊凝集体を免疫組織化学的に評価した（Fig1 D, E）。

上記方法にて未分化維持されたマウス iPS 細胞による浮遊凝集体を、トリプシン-EDTA 処理で単一細胞に解離し、Y27632 を含む gfCDM 培地へ懸濁後に 96 ウェルプレ

ートへ播種した。5%CO₂、37°Cの培養下で細胞は自律的かつ迅速に凝集した。7日後に、マウス Fibroblast growth factors (Fgf) 8b および未分画ヘパリンを gfCDM 培地に添加し、10 日後に培地の半分を Fgf8b、未分画ヘパリン、CNTF を含む DFNB 培地(DMEM high glucose: F12 mixed 1:1, with N2 and B27) に置換した。

13 日後、凝集体を Transwell 培養プレートに移し、底部ウェルを Fgf8b およびヘパリン添加 DFNB 培地で満たした。以降、培地は 1 日おきに交換した。26 日後以降、培地交換の頻度は毎日とした。分化誘導した AVP ニューロンを免疫組織化学、FACS、RT-PCR、KCL 刺激による AVP 分泌試験により評価した。

【結果】

一般に、マウス ES/iPS 細胞の維持培養では、MEF の代わりにゼラチンまたはマトリゲルが頻用されている。ゼラチンコーティングを使用した従来の接着培養では、未分化細胞コロニーの周囲に神経およびグリア細胞へ分化したと考えられる細胞が多数観察された (Fig1. B)。ゼラチンコーティングされたディッシュと比較して、MEF コーティングされたディッシュ (Fig1.A) では、特徴的な丸いドーム状の形状を示す多くのコロニーが形成された。しかし、ES/iPS 細胞由来の分化組織を *in vitro* モデルとして使用する場合、MEF の混入は望ましくない。そのため、初回の継代後は MEF を使用せず、代わりに新しい継代方法を開発した (Fig1. B)。新しい浮遊培養法では、細胞塊の大部分が未分化細胞で構成されていた (Fig1. B, C)。少数の分化した細胞は培養ディッシュの表面に付着しているため (Fig1.B)、これらの分化した細胞が次継代へ混入することを避けることが可能である。免疫組織化学染色では、Method2 の浮遊培養法が、未分化状態を維持するのに最も適していることが示された (Fig1. C)。未分化マーカーの発現は、凍結保存し解凍した (Fig1. D.)後も維持された (Fig1.E)。

分化誘導法の改善については、ひとつは Y-27632 を分化誘導初期に添加することである。Y-27632 添加により iPS 凝集体の成長が促進された (Fig. 2.A., Fig. 3.)。もうひとつは、分化誘導後期に Fgf8b とヘパリンで処理することである。Fgf8b とヘパリン添加により、AVP 前駆体マーカーである *Orthopedia homeobox(Otp)* と *POU Class 3 Homeobox 2(Pou3f2)* の発現が増加し (Fig. 2.B)、AVP ニューロンの陽性率が増加した (Fig. 2.B)。Fig2 に示すように AVP 陽性細胞は、従来の方法では散発性に認められたが、Fgf8b およびヘパリン処理により AVP 陽性細胞が神経核様に集簇した (Fig. 2.B)。KCl 刺激による AVP 分泌は、Fgf8b およびヘパリン処理した群でより分泌量が多かった (Fig2. C)。免疫組織化学および RT-PCR により、分化した AVP ニューロンおよび他の視床下部ニューロンが以前の報告と類似していることも示された。

【考察】

ES 細胞および iPS 細胞は、再生医療、発生学的な基礎研究、および疾患研究に利用できるため、分化方法の確立は重要である。これまで、いくつかの報告で、視床下部ニューロンの多能性幹細胞からの分化が示されていた。本研究では、AVP ニューロン

分化効率を上昇させる2つの重要なポイントを見出した。

第一の改善点は、未分化状態の維持を従来の方法よりも効率的にしたことである。On MEF 培養と浮遊球培養を組み合わせ、マウス iPS 細胞の未分化状態維持と増殖能を改善した。LIF はマウス多能性幹細胞の未分化性維持に不可欠であるが、十分ではない。本研究では、未分化状態を維持するのが比較的困難な性質を持つマウス iPS 細胞株を用いた。以前の報告では、MEF がアクチビン A と TGF β 1 を分泌することが示されている。他の報告では、アクチビン-Nodal-TGF β シグナル伝達の内因的に活性化されたオートクリンループが ES 細胞の自己複製を促進することが示されている。以上の理由で、解凍直後には MEF を利用することにした。その後の維持培養には、MEF の混入を避ける目的で、浮遊培養にて凝集塊を形成させる方法を採用した。凍結融解作業を経た後でも未分化状態を維持することが可能であることから、将来的に大量培養を容易にする可能性がある。

第二点として、分化手順の改善を行った。従来法では、胚の視床下部部位発生を再現することに焦点を合わせ、初期胚発生時の神経板の最も吻側部分を目標に最小限の位置情報を含む培地を使用した。本研究では、まだ考慮されていない視床下部分化誘導の後期に焦点を当てた。AVP の分化に直接関連している転写因子が Otp、Single-minded homolog 1(Sim1)、Pou3f2 であること、Fgf8 が視索上核 (SON) において Otp 発現を増加させるために必要であること、さらに、Fgf8-hypomorphic マウスにおいて AVP ニューロンの低下を認めたとの報告がある。Fgf8b を用い、その添加時期と濃度を最適化して、Otp 陽性細胞と AVP ニューロンの数を増加させた。Fgf8 と FGFR1 の発現パターンはヒトで保存されていることが報告されており、Fgf8 シグナル伝達は視床下部下垂体軸の発達に重要であることから、今後、ヒト iPS 細胞の培養に適用できると期待される。また、疾患特異的 iPS 細胞を使用して、遺伝子変異によって引き起こされる神経変性難病である家族性中枢性尿崩症などの疾患モデルを確立することも期待される。

【結語】

浮遊培養法による未分化維持培養法の改良と Fgf8b による Otp の誘導効率向上により AVP ニューロンへの効率的な分化誘導法の確立に成功した。