

学位論文抄録

ナノファイバーによるRac1活性化を介したマウスおよびヒトにおける胚性幹細胞および人工多能性幹細胞の肝細胞分化

(The hepatic differentiation of embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell of murine and human through Rac1 activation on synthetic nanofiber scaffold)

山添 太士

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器内科学

指導教員

佐々木 裕 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 消化器内科学

桑 昭苑 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 多能性幹細胞学

学位論文抄録

[目的] 胚性幹細胞 (Embryonic stem, ES) 細胞や人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞は多能性分化能、無限増殖能、自己複製能に特徴される細胞群であり、再生医療におけるドナー不足を解決できる魅力的な細胞ソースである。著者が所属している多能性幹細胞分野では、マウス胎仔中腎由来細胞株である M15 細胞との共培養による細胞間相互作用による分化誘導や、細胞外マトリックス成分であるラミニンを強制発現した擬似基底膜を用いた細胞-マトリックスの相互作用による分化誘導の促進作用を明らかにしてきた。マウスおよびヒトにおける ES 細胞および iPS 細胞の肝細胞分化誘導を効率化するための最適な細胞足場環境を探索し、その分化効率化を促す分子メカニズムを同定することを目的とした。

[方法] 完全合成基材であるナノファイバーは、未分化の ES 細胞を増殖促進し、初代培養細胞の機能維持に優れていると報告されている。そこで再生医療および研究利用のために、未同定物質を含むウシ胎児血清を用いない合成培地で分化誘導を確立し、一般的に用いられている細胞外マトリックス成分であるゼラチン・コラーゲンタイプ I・ファイブロネクチン・マトリゲルを使用した肝分化誘導効率を各発生段階における分化マーカーを指標として PCR 法ならびに免疫細胞化学的解析用いて比較検討した。また、ナノファイバーにおける分化誘導効率化に寄与する分子機構の同定を行った。

[結果] マウス ES および iPS 細胞はナノファイバー上で、通常の個体発生時に見られるような過程を模倣して、内胚葉への初期分化、肝臓系譜への運命付け、肝機能獲得する成熟化という肝分化誘導を行うことができた。

この分化誘導方法を用いて、他の代表的な培養基材であるゼラチン・コラーゲンタイプ I・ファイブロネクチン・マトリゲルとの比較においても、内胚葉分化誘導効率、肝細胞分化マーカーの上昇、肝機能が有意に高かった。

また ES 細胞がドーム状になるという細胞形態変化がナノファイバー上で見られ、細胞骨格を制御する Rho ファミリーの Rac1 が活性化していた。

Rac1 の活性化阻害剤である NSC23766 を用い、分化途中の様々なタイミングで Rac1 活性阻害を行ったところ、分化初期においては内胚葉分化マーカーである *Forkhead box A2* (*FoxA2*) が、後期においては肝細胞分化マーカー *Alphafetoprotein* (*Afp*) や *Albumin* (*Alb1*) が低下した。

[考察] マウスおよびヒトにおける ES および iPS 細胞をナノファイバー上で合成培地を用いて肝細胞へ分化誘導することが可能である。

マウス ES 細胞を用いた実験において、ナノファイバーの誘導効果は他の一般的な細胞外マトリックス成分より効率がよかった。また、その分子機構として Rac1 の活性化が寄与しており、Rac1 の活性化は分化過程のいずれの時期においても重要であることが示唆された。

[結論] ナノファイバーは Rac1 を活性化することで、マウスおよびヒトにおける ES および iPS 細胞の肝細胞分化を促進している。