

平成27年2月

長谷川輝 学位論文審査要旨

主 査 久 留 一 郎
副主査 難 波 栄 二
同 二 宮 治 明

主論文

P19 cells overexpressing Lhx1 differentiate into the definitive endoderm by recapitulating an embryonic developmental pathway

(Lhx1を過剰発現させたP19細胞は、胚発生の経路を再現することによって胚体内胚葉に分化する)

(著者：長谷川輝、白吉安昭)

平成27年 Yonago Acta medica 掲載予定

参考論文

1. Electrophysiological properties of prion-positive cardiac progenitors derived from murine embryonic stem cells

(マウス胚性幹細胞より誘導されたプリオン陽性心筋前駆細胞の電気生理学的な特徴)

(著者：藤井裕士、池内悠、倉田康孝、池田信人、Udin Bahrudin、李佩俐、中山祐二、遠藤涼、長谷川輝、森川久未、三明淳一郎、吉田明雄、日高京子、森崎隆幸、二宮治明、白吉安昭、山本一博、久留一郎)

平成24年 Circulation Journal 76巻 2875頁～2883頁

学位論文要旨

P19 cells overexpressing Lhx1 differentiate into the definitive endoderm by recapitulating an embryonic developmental pathway

(Lhx1を過剰発現させたP19細胞は、胚発生の経路を再現することによって胚体内胚葉に分化する)

胚発生の間にあるエピブラストは最後の多能性領域であり、エピブラストから三胚葉が形成される仕組みを解明することは重要である。しかし、その発生メカニズムはあまり知られていない。過去の研究では、胚性幹細胞での実験からLIM homeobox 1 (Lhx1)がエピブラスト発生に関係していることを報告している。しかし、胚性幹細胞を使用した実験では、エピブラストは一過性に存在するのみであり、エピブラスト発生の仕組みを理解するには不十分であった。そこで、エピブラストの特徴を保持しているモデル細胞を使用してLhx1とエピブラストの発生の仕組みを解明するために本研究を行った。

方法

エピブラストモデル細胞としてP19細胞を使用した。C末端にHAタグを持つLhx1のcDNAを発現ベクターに組み込み、P19細胞に遺伝子導入し、発現株を樹立した。この発現株の遺伝子発現量をリアルタイムPCR法によって定量した。また、レポーターアッセイや抗SMAD抗体によるウエスタンブロッティング法によりNodalシグナルの活性化を検討した。一方で、Lhx1に対するshRNAを組み込んだレンチウイルスベクターをP19細胞に感染させ、ノックダウン株も樹立し遺伝子発現を確認した。

結果

P19細胞は、エピブラストの特徴を持っており、Lhx1の発現はほとんどなかった。Lhx1を過剰発現させたP19細胞は、直ちに内胚葉様への細胞形態の変化を示した。遺伝子発現を観察すると、オーガナイザーマーカーのCer1及びGscの発現が有意に上昇した。また、細胞形態が内胚葉様に変化したことから、内胚葉マーカーの発現も確認したところ、Gata4、Gata6とFoxa2の有意な発現上昇が確認された。内胚葉は、胚体外と胚体内組織系列に分別され、分化にはNodalシグナルが関係する。この過剰発現株では、胚体外内胚葉マーカーは確認されず、Nodalシグナルの活性化が確認されたことから、Nodalシグナルの活性化によ

って胚体内胚葉が誘導されたことが分かった。Lhx1をノックダウンさせたP19細胞は、野生型と比較して形態的・遺伝子的変化を観察できなかった。つまりLhx1はP19細胞の維持への関与は無いことが分かった。

考 察

本研究で、Lhx1がエピブラストモデル細胞であるP19細胞を胚体内胚葉へ分化誘導することがわかった。胚体内胚葉はエピブラストの前方原条から出現し、その特異化はNodalシグナルやSox17の発現によって制御される。Lhx1を過剰発現させたP19細胞は、内胚葉マーカーのGata4、Gata6、Foxa2の発現上昇とともにSox17の発現の上昇やNodalシグナルの活性化を示した。また、胚体内胚葉マーカーと一緒にオーガナイザー関連マーカーのCer1とGscも発現誘導された。このように、Lhx1を過剰発現させたP19細胞は、胚発生での胚体内胚葉経路を再現して、胚体内胚葉に分化している。Lhx1の欠失は、臓側内胚葉、原条、新生の中胚葉、オーガナイザー由来の中内胚葉の異常が確認され、結果として頭部の短縮化がもたらされる。これらは、Lhx1欠失によりLhx1の下流に存在する遺伝子Amotが影響を受け、胚の一部の前方移動が障害され、前後軸の不形成が起きることが原因の一つであると知られている。このように、Lhx1は間接的に胚体内胚葉の発生や原腸陥入時の細胞移動に関係している。Lhx1を過剰発現させたP19細胞が、胚体内胚葉と前方臓側内胚葉マーカーの発現を伴う内胚葉形態を示したことは、この細胞が前方原条様の中内胚葉細胞から胚体内胚葉か前方臓側内胚葉へ直接分化したと推測することができる。これらのことから、Lhx1はエピブラストもしくは前方原条の発生を制御できる因子であると考えている。

結 論

Lhx1を過剰発現させたP19細胞は、前方原条様の中内胚葉から胚体内もしくは臓側内胚葉に直接分化する。このことから、Lhx1はエピブラストもしくは前方原条の発生を制御できる因子であると考えられる。また、P19細胞とLhx1を過剰発現させたP19細胞は、頭部形成や三胚葉それぞれの細胞への特異化のメカニズムを研究するための有用なモデルである。