



Title	Sequential introduction and dosage balance of defined transcription factors affect reprogramming efficiency from pancreatic duct cells into insulin-producing cells
Author(s)	宮下, 和幸
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34271
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	宮下 和幸
論文題名 Title	Sequential introduction and dosage balance of defined transcription factors affect reprogramming efficiency from pancreatic duct cells into insulin-producing cells (転写因子の導入時期および導入量は膵管細胞からインスリン産生細胞へのリプログラミング効率に影響する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>非β細胞に複数の転写因子を導入し、インスリン陽性細胞へと分化転換させることに成功したという報告が散見されるが、これらの報告における分化転換の効率は未だ低く、将来の糖尿病再生医療へ応用する上ではその効率化が肝要である。この問題点を克服するため、非β細胞に複数の膵臓特異的転写因子を導入する際に、各転写因子の導入時期、各転写因子の導入量を調整することにより、インスリン産生細胞への分化転換効率を改善しうる、という仮説を立て、検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>膵前駆細胞からインスリン産生細胞への分化転換効率を可視化、定量化することを目的とし、膵前駆細胞由来レポーター細胞株を作製した。マウスインスリンプロモーター(MIP)の支配下に赤色蛍光蛋白(DsRed-E5)を連結させたMIP-RFPを、マウス膵癌由来細胞株であるmPac細胞に組み込んでstable cell lineを作製した(mPac-MIP-RFP細胞)。mPac-MIP-RFP細胞にPdx1、Neurog3、Mafaの3つの転写因子を発現誘導し、インスリン陽性細胞が赤色蛍光を呈することを確認した。この細胞株にPdx1、Mafa、Neurog3を、1)各転写因子の導入時期、2)転写因子の導入ベクタの構造、3)各転写因子の導入量を変えて発現誘導し、インスリン陽性細胞へ分化転換した細胞の割合を比較検討した。</p> <p>まず、転写因子の導入時期について検討を行った。アデノウイルスは各転写因子と同時にeGFPを発現するため、アデノウイルスが感染した細胞を標識することができる。1種類の転写因子発現アデノウイルスを感染させた12時間後に、残り2種類の転写因子を発現誘導し、36時間後にGFP陽性細胞数およびRFP陽性細胞数を計測し、アデノウイルス感染細胞に対するインスリン陽性細胞数の割合を比較した。その結果、Pdx1を他の2つの転写因子に先行して発現誘導させた細胞では、Neurog3やMafaを先行して発現誘導した細胞に比して分化転換効率が上昇していた。Real Time RT-PCRによりインスリン遺伝子の発現量を定量的に評価した場合も同様の結果であった。</p> <p>次に転写因子の導入ベクタの構造について検討を行った。より効率的にインスリン陽性細胞へ分化転換させるため、Pdx1、Neurog3、Mafaの3つの転写因子を2A-peptideを利用して共発現できるアデノウイルスを作製した。mPac-MIP-RFP細胞にこのアデノウイルスを感染させ、3つの転写因子を発現させた。同様にアデノウイルス感染細胞に対するインスリン陽性細胞数の割合を比較したところ、分化転換効率はさらに上昇していた。</p> <p>最後に転写因子の導入量について検討を行った。これら3種類の転写因子のうち1種類の導入量を増加させることでさらに分化転換が効率化するかを検討するため、共発現アデノウイルスに加えて、いずれか1種類の転写因子をコードするアデノウイルスをmPac-MIP-RFP細胞に同時に感染させ72時間後に分化転換効率を測定した。その結果、3種類のうち1つの遺伝子を過剰に発現させても分化転換効率は上昇せず、Mafaを多く発現させた場合には分化転換効率は有意に減少していた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>MIP-RFPを発現し、インスリン産生細胞をRFPで検知可能とするstable cell line(mPac-MIP-RFP細胞)を樹立した。この細胞を使用することで容易にインスリン産生細胞を検知することが可能となり、複数の転写因子の導入時期や導入量を調節することがインスリン産生細胞への分化転換の効率化に重要であることが明らかとなった。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 宮下 和幸

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 下村 伸一郎
	副 査	大阪大学教授 伸藤 壽記
	副 査	大阪大学教授 宮崎 純一

論文審査の結果の要旨

複数の転写因子を非 β 細胞に導入することによりインスリン陽性細胞への分化転換に成功した報告が散見されるが、分化転換効率は未だ低いままである。本論文では、この問題点を解明するため、インスリン産生細胞への分化転換効率を可視化、定量化を可能とする膵前駆細胞由来レポーター細胞株を作製、Pdx1、Neurog3、Mafaを様々なタイミングで発現誘導し、インスリン陽性細胞への分化転換効率を比較検討したものである。その結果、Pdx1をMafa、Neurog3に先行して発現させると分化転換効率が上昇した。次に、Pdx1、Neurog3、Mafaを一つのコンストラクトで同時に発現できるアデノウイルスを作製したところ分化転換効率はさらに上昇した。しかし、これら3種類のうち1種類の転写因子の導入量のみ増加させても分化転換効率は上昇せず、Mafaの導入量のみを増加させた場合には分化転換効率は低下した。以上のように、転写因子の導入時期や導入方法を調整することでインスリン陽性細胞への分化転換が効率化できることを報告した。今後の糖尿病再生医療に大いに役立つと期待されるものであり、学位に値するものと認める。