Osaka University Knowledge Archive

Title	遺伝子導入技術を利用したヒトES /iPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発
Author(s)	稲村, 充
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58561
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【8】

氏　　名	稲村　充（いなむら　みつる）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２４５１５　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	**遺伝子導入技術を利用したヒトES /iPS細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　水口　裕之 （副査） 教　授　岡部　勝　　教　授　八木　清仁　　教　授　橋本　均

論　文　内　容　の　要　旨

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）やヒト人工多能性肝細胞（iPS細胞）は、肝細胞等のあらゆる細胞に分化することから、薬物の*in vitro* 毒性スクリーニング系に応用することが期待できる。しかしながら、従来の分化誘導法では、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から肝細胞への分化効率は不十分である。本研究では、まず内胚葉や肝細胞で特異的に発現する遺伝子FOXA2遺伝子のプロモーターを解析し、内胚葉の発生・分化に関与する新規遺伝子を探索するとともに、同定した遺伝子を用いてヒトES細胞やヒトiPS細胞から内胚葉や肝細胞を分化誘導することを試みた。さらに、肝分化に必須の遺伝子HEXを導入することにより、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から肝幹前駆細胞への分化促進効果について検討した。そして最後に、転写因子HEXが調節する標的遺伝子を新たに同定することにより、HEX遺伝子を発現させることにより肝分化が促進されるメカニズムの解明を試みた。

内胚葉特異的遺伝子FOXA2遺伝子の転写調節を担っている転写因子を同定するために、組織特異的な活性を有するプロモーター領域の同定を行った結果、FOXA2非発現ヒト子宮頸ガン細胞株HeLa細胞では活性を有さず、FOXA2発現ヒト肝ガン細胞株HepG2細胞においてのみ有意な活性をもつプロモーター候補を複数得ることができた。さらに、転写開始点付近において転写抑制的に働く部位を見出した。これらの配列に結合する可能性のある因子を探索した結果、抑制的な因子の候補として、RUNX1/AML1遺伝子が挙げられた。RUNX1遺伝子は標的遺伝子の転写調節領域にあるコンセンサス配列に結合し、転写を制御していることが知られている。そこで、FOXA2遺伝子のプロモーター領域に存在するRUNX1コンセンサス配列に対して置換変異を導入した結果、HepG2細胞においてFOXA2プロモーター活性が著しく上昇し、RUNX1遺伝子はFOXA2遺伝子の転写を負に制御していることが示唆された。次に、RUNX1遺伝子の転写制御能を阻害するRUNX1-DN（ドミナントネガティブ）変異体をHepG2細胞やHeLa細胞に対して導入した結果、FOXA2遺伝子のプロモーター活性が上昇し、RUNX1遺伝子がFOXA2遺伝子の転写を負に制御していることが明らかとなった。次に、RUNX1遺伝子のFOXA2プロモーター領域への結合性を調べるために、クロマチン免疫沈降法を行った結果、RUNX1遺伝子はFOXA2プロモーター領域に直接結合することが明らかとなった。さらに、ヒトiPS細胞にActivin Aを添加して分化誘導させた中内胚葉に対してRUNX1-DN変異体を導入した結果、FOXA2などの内在性の内胚葉遺伝子の発現量を上昇させることができた。以上の結果から、RUNX1遺伝子はFOXA2プロモーター領域に直接結合することにより、その転写を負に制御していることが示された。これは、RUNX1遺伝子が内胚葉分化を抑制する可能性を示唆しており、新たな内胚葉への分化誘導法を提示することができた。

次に、肝細胞への分化効率を改善するため、ヒトES細胞やヒトiPS細胞由来の内胚葉に肝臓の発生・分化に必須の遺伝子HEXをアデノウイルスベクターを用いて導入した結果、培養9日目に、肝幹前駆細胞マーカーであるAFP陽性細胞が出現した。培養12日目（遺伝子導入6日後）には、AFP陽性あるいはALB陽性のコロニーが生じ、周辺領域にCK7陽性細胞が検出された。肝幹前駆細胞からは実質細胞である肝細胞と非実質細胞である胆管上皮細胞が発生することが知られているため、HEXを内胚葉に発現させることにより肝幹前駆細胞が分化誘導され、その由来細胞である肝細胞と胆管上皮細胞が発生したと考えられる。さらに、肝幹前駆細胞が最も効率良く分化誘導された9日目の培養細胞を用いて、既に報告されている肝成熟化プロトコールに従って9日間培養を行った結果、HEX遺伝子を発現させることにより分化誘導された肝細胞は、CYP3A4を胎児肝組織と同程度発現していることが明らかとなった。さらに、CYP3A4の誘導薬剤であるrifampicinを分化誘導された肝細胞に作用させた結果、CYP3A4の活性が著明に増加したことから、分化誘導された肝細胞は薬物応答能も有していることが明らかとなった。しかしながら、CYP3A4に加えてCYP2D6等の発現量は成体肝組織と比較して低いものであった。したがって、内胚葉にHEX遺伝子を発現させることにより分化誘導された細胞は胎児期の肝細胞に近い薬物代謝能を有しているものの、成体肝細胞と比較して未成熟な細胞であると考えられる。今後、機能性の高い肝細胞への成熟化が課題となるであろう。

最後に、HEX遺伝子による肝分化促進機構を解明するため、ChIP-seq法により肝分化過程におけるHEXの標的遺伝子の同定を試みた。ヒトiPS細胞から分化誘導させた肝幹前駆細胞を用いてChIP-seqを行った結果、HEX標的候補遺伝子としてTGFBR3を抽出することができた。内胚葉から肝細胞への運命決定には、HEX遺伝子に加えてBMPシグナル等が必須であり、HEX遺伝子を過剰発現させた場合にも、液性因子BMP4非存在下では肝分化が促進されないことが報告されている。一方、TGFBR3ノックアウトマウスは胚性致死であり、肝臓の形成不全が観察される。TGFBR3受容体に結合するリガンドとしては、TGFβ、BMP、Activin等が知られている。以上の知見を総合すると、HEX遺伝子はTGFBR3遺伝子の転写制御を介して、内胚葉を肝分化能力が高い細胞、すなわち液性因子に対する応答性が高い細胞へと変化させる

ことにより、肝分化を促進していることが推測される。まず、HEX遺伝子の過剰発現によるTGFBR3遺伝子の発現変動を解析したところ、培養6日目の内胚葉に対してHEXを遺伝子導入した群において、TGFBR3遺伝子の発現量が有意に増加した。さらに、TGFBR3受容体のリガンドであるBMP4を添加した場合、特に肝分化マーカーAFP等の発現量増加がみとめられた。したがって、HEX遺伝子がTGFBR3遺伝子の転写を活性化させ、その後BMP4等のシグナルに対する応答性を高めることにより、肝分化を促進させている可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）やヒト人工多能性肝細胞（iPS細胞）は、肝細胞等のあらゆる細胞に分化することから、薬物の*in vitro* 毒性スクリーニング系に応用することが期待できる。しかしながら、従来の分化誘導法では、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から肝細胞への分化効率は不十分である。本研究では、まず内胚葉や肝細胞で特異的に発現する遺伝子FOXA2遺伝子のプロモーターを解析し、内胚葉の発生・分化に関与する新規遺伝子を探索するとともに、同定した遺伝子を用いてヒトES細胞やヒトiPS細胞から内胚葉や肝細胞を分化誘導することを試みた。さらに、肝分化に必須の遺伝子HEXを導入することにより、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から肝幹前駆細胞への分化促進効果について検討した。そして最後に、転写因子HEXが調節する標的遺伝子を新たに同定することにより、HEX遺伝子を発現させることにより肝分化が促進されるメカニズムの解明を試みた。そして、以下のような結論を得た。

1. RUNX1はFOXA2のプロモーター領域に直接結合することにより、転写を負に制御する内胚葉分化調節因子であることが明らかとなった。

2. ヒトES細胞やヒトiPS細胞由来の内胚葉に対してHEXを過剰発現させることにより、肝実質細胞や胆管上皮細胞へと分化可能な肝幹前駆細胞を効率良く分化誘導することが可能となった。

3. HEXは肝分化過程において、TGFBR3のプロモーター領域に直接結合し、転写を正に制御することにより、肝分化を促進している可能性が示された。

以上、本研究では、未分化なヒトES細胞やヒトiPS細胞から内胚葉、あるいは内胚葉から肝細胞への各過程の分化に寄与する新規因子を同定するとともに、遺伝子導入技術を駆使した肝細胞の高効率分化誘導法の開発に成功した。本研究で確立した肝細胞への高効率分化誘導法は、薬物の新規 *in vitro* 毒性スクリーニング系構築の基盤技術となるばかりではなく、肝分化のメカニズム解明に対しても有用であるため、極めて意義深く、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。