The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒトiPS細胞を用いたin vitro肝発生モデルにおけるHNF4αアイソフォームの機能解析
Author(s)	塙, 守史
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61688
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　塙　守史　）	
論文題名	ヒトiPS細胞を用いたin vitro肝発生モデルにおけるHNF4αアイソフォームの機能解析

論文内容の要旨

ヒト人工多能性幹細胞（human induced pluripotent stem cells ; human iPS cells）は無限の増殖能とあらゆる体細胞に分化できる多能性を有していることから、創薬や再生医療への応用が期待されている。また、ヒトiPS細胞やヒト胚性幹細胞（human embryonic stem cells ; human ES cells）のような多能性幹細胞はin vivoにおける発生を模倣して様々な体細胞に分化することから、ヒトの発生メカニズム解明にも有用である。例えば、ヒトES/iPS細胞は適切な時期に適切な液性因子を加えることによって、in vivoの発生を模倣して、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を経て肝細胞へと分化できることから、ヒトの肝発生の分子メカニズムの解明にも応用できると考えられている。本研究ではヒトiPS細胞を用いたin vitro肝発生モデルにおける分子メカニズムの解明を目指した。

肝細胞の分化過程は様々な転写因子によって制御されているが、その詳細な分子メカニズムは十分に理解されていない。そのため、私は肝臓の発生に必須のhepatocyte nuclear factor 4 alpha（HNF4α）に着目した。HNF4αは肝発生の初期から発現し、肝臓ではE8.5から成体まで発現し続ける転写因子である。肝臓特異的にHNF4αを欠損したマウスは、肝機能に関わる様々な遺伝子の発現が欠失することや、ヒトES/iPS細胞を用いた肝細胞分化誘導において、HNF4αをshRNAでノックダウンすると肝特異化が起こらないことから、HNF4αは肝分化に必須と言える。しかしながら、肝特異化過程以前の発生過程におけるHNF4αの役割は明らかにされていない。また、HNF4αは６種類以上のアイフォソームの存在が報告されており、P1プロモーターから転写される1A exonを有するHNF4α1/2/3（HNF4α-1A)と、P2プロモーターから転写される1D exonを有するHNF4α7/8/9（HNF4α-1D)に大別される。しかしながら、肝特異化過程以前の発生過程におけるHNF4α-1AとHNF4α-1Dの機能的な違いや発現プロファイルは明らかにされていない。そこで本研究では、ヒトiPS細胞から内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を介して肝細胞へ分化するそれぞれの分化過程におけるHNF4α-1AおよびHNF4α-1Dの発現プロファイルの取得と、内胚葉分化過程におけるアイソフォームの機能的な違いの解析、内胚葉分化過程においてHNF4αが働く分子メカニズムの解明を試みた。

ヒトiPS細胞から肝細胞へとin vitroで分化誘導する肝発生モデルにおいて、HNF4αアイソフォームがどのような発現プロファイルを示すのかをreal-time PCRや蛍光免疫化学染色法を用いて解析した。HNF4α-1D（HNF4α7/8/9）は内胚葉分化過程において発現が上昇し、HNF4α-1A（HNF4α1/2/3）は内胚葉細胞から肝幹前駆細胞への肝特異化過程において発現が上昇した。ヒトiPS細胞を用いたin vitro肝発生モデルを解析することで、肝特異化過程以前におけるHNF4αアイソフォームのプロファイルを初めて明らかにした。次に、内胚葉細胞においてHNF4α-1Dが発現するという新しい知見に着目して、内胚葉分化過程における各HNF4αアイソフォームの機能を解析した。HNF4α-1Dをヒト iPS細胞に過剰発現させ内胚葉細胞に分化させると、内胚葉遺伝子の発現が上昇する一方、HNF4α-1Aの過剰発現によって内胚葉遺伝子の発現が抑制された。また、内胚葉分化過程における内在性のHNF4αの機能を解析するために、HNF4αのノックダウン実験を行った。内胚葉分化過程においてHNF4αをノックダウンすると、内胚葉遺伝子の発現が抑制された。また、ノックダウン実験に用いたshRNAはすべてのHNF4αアイソフォームをターゲットとしており、HNF4α-1Dの発現低下が内胚葉分化の抑制をもたらすことを示すために、HNF4αノックダウン条件下でHNF4α-1Aを導入する実験を行った。HNF4α-1Aの導入によっては内胚葉分化の抑制がレスキューされず、内胚葉分化においてHNF4α-1Dが重要な役割を担い、内胚葉分化に促進的に働くことが示唆された。最後に、HNF4αが内胚葉分化を促進する分子メカニズムの解明を試みた。プロモーター領域にHNF4αの結合配列を持つLefty1がHNF4αのターゲット遺伝子の候補として考えられ、ヒトiPS細胞から分化誘導した内胚葉細胞を用いてChIPアッセイを行った結果、予想HNF4α結合配列をもつ領域で強い

シグナルが得られた。また、様々な長さのLeftyのプロモーターをクローニングしてルシフェラーゼアッセイを行った結果、予想HNF4α結合配列をもつプロモーターにおいて、HNF4α-1D(HNF4α8)の導入によってプロモーター活性が大きく増強された。以上の結果から、HNF4αがLefty1のプロモーター領域に結合して転写活性を増強することが明らかとなった。また、内胚葉分化過程におけるLefty1のノックダウン実験を行うと、Lefty1のノックダウンによって内胚葉遺伝子の発現量が低下し、Lefty1が内胚葉分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

これらの結果から、内胚葉分化過程においてHNF4α-1Dが発現し、HNF4α-1DがLefty1の発現を直接調節することで内胚葉分化を促進することを明らかにした(1)。ヒトES/iPS細胞はin vivoにおける発生を模倣してin vitroで様々な体細胞に分化することから、多くの研究でヒトの発生メカニズムの解明に利用されている。ヒトの発生を分子レベルで解明することで、in vitroでよりin vivoに近い細胞を再現して提供することが求められる再生医療や創薬にも応用が可能となるとともに、発生生物学をはじめ、生命科学研究に貢献することを期待する。

【参考文献】

1. Hanawa M., Takayama K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Promotes Definitive Endoderm Differentiation From Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Reviews & Reports, in press.

様式7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　塙　守史　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	水口　裕之
	副 査　教 授	八木　清仁
	副 査　教 授	土井　健史

論文審査の結果の要旨

ヒトiPS細胞は無限の増殖能とあらゆる体細胞に分化できる多能性を有していることから、創薬や再生医療への応用が期待されている。また、ヒトiPS細胞やヒトES細胞のような多能性幹細胞はin vivoにおける発生を模倣して様々な体細胞に分化することから、ヒトの発生メカニズム解明にも有用である。現在、ヒトES/iPS細胞は適切な時期に適切な液性因子を加えることによって、in vivoの発生を模倣して、内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を経て肝細胞へと分化できることから、ヒトの肝発生の分子メカニズムの解明にも応用できると考えられている。肝細胞の分化過程は様々な転写因子によって制御されているが、その詳細な分子メカニズムは十分に理解されておらず、申請者は肝臓の発生に必須のhepatocyte nuclear factor 4 alpha（HNF4α）に着目した。HNF4αは肝臓の発生に必須と言われる転写因子で、HNF4αは６種類以上のアイフォソームの存在が報告されており、HNF4α1/2/3 (HNF4α-1A)と、HNF4α7/8/9 (HNF4α-1D)に大別される。しかしながら、肝特異化過程以前の発生過程におけるHNF4α-1AとHNF4α-1Dの機能的な違いや発現プロファイルは明らかにされていない。そこで、申請者はヒトiPS細胞から内胚葉細胞、肝幹前駆細胞を介して肝細胞へ分化するそれぞれの分化過程におけるHNF4α-1AおよびHNF4α-1Dの発現プロファイルの取得と、アイソフォームの機能的な違いの解析に取り組み、以下の結果を得た。

（1）　ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 肝発生モデルにおける HNF4α アイソフォームの発現プロファイルを明らかにした。HNF4α-1D（HNF4α7/8/9）は内胚葉分化過程において発現が上昇し、HNF4α-1A（HNF4α1/2/3）は内胚葉細胞から肝幹前駆細胞への肝特異化過程において発現が上昇することを示した。

（2）　HNF4α アイソフォームの機能的差異を明らかにした。内胚葉分化過程において HNF4α-1D が内胚葉分化に促進的に働き、HNF4α-1A は抑制的に働くことを示した。

（3）　内胚葉分化過程において HNF4α が機能する分子機序の一端を明らかにした。HNF4α が Lefty1 のプロモーターを直接制御して転写を活性化させ、内胚葉分化を促進していることを示した。

以上、本研究ではヒトiPS細胞を用いて肝発生の分子メカニズム解明を目指し、HNF4αアイソフォームの発現プロファイルの取得と、HNF4αアイソフォームの機能的な解析を行った。ヒトES/iPS細胞はin vivoにおける発生を模倣してin vitroで様々な体細胞に分化することから、多くの研究でヒトの発生メカニズムの解明に利用されている。ヒトの発生を分子レベルで解明することで、in vitroでよりin vivoに近い細胞を再現して提供することが求められる再生医療や創薬にも応用が可能となるとともに、発生生物学をはじめ、生命科学研究に貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。