OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Generation of a TALEN-mediated, p63 knock-in in human induced pluripotent stem cells
Author(s)	小林, 由紀
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72555
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

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）小林　由紀

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	西川 伸一
副　査	大阪大学教授	高島 成二
副　査	大阪大学教授	玉井 克人

論文審査の結果の要旨

ヒト角膜上皮細胞の発生機序を解明するために、発生初期に発現する上皮幹細胞マーカーであるΔNp63α遺伝子を標識した細胞株が上皮系列の系譜解析に有用であると考えた。そこで、本研究ではΔNp63α (p63) Knock-inヒトiPS細胞株を樹立し、そのiPS細胞株の機能性の確認、標識細胞の単離及び性状評価を行ったものである。本iPS細胞株は、未分化性を維持した株であり、この株を用いることで内在的に発現するp63がEGFPによって標識され、その細胞の単離と可視化が可能となった。また本iPS細胞株は眼関連細胞を誘導する方法（SEAM法）に基づいて、角膜上皮細胞への分化が可能であった。この樹立した株は角膜を含めた上皮系細胞への分化誘導法の探索やその上皮の発生系譜の解析に有用であり、新規上皮再生医療治療法の確立に大きく貢献できるものである。
上記のような理由から本研究は学位に値するものと認める。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	小林　由紀
論文題名 Title	Generation of a TALEN-mediated, p63 knock-in in human induced pluripotent stem cells （p63 knock-in ヒトiPS細胞の樹立とその機能解析）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

我々の研究室では、重篤な角膜上皮疾患に対して、ヒトiPS細胞を用いた新規角膜上皮再生治療法を開発に取り組んできた。これまでに、多能性幹細胞から眼関連細胞を分化誘導する方法（SEAM法）を確立し、角膜上皮細胞及びその原基細胞の分化誘導が可能であることを示しているが、その発生時期や由来など、詳細な発生機構については明らかではない。ΔNp63αは角膜上皮を含む重層上皮幹細胞マーカーであることが知られている。ヒト角膜上皮細胞の発生機序を解明するためには、発生初期に発現する*ΔNp63α*遺伝子を標識した細胞株が、角膜上皮を含む上皮系列細胞の系譜解析に有用であると考えた。そこで、本研究では、ΔNp63αにEGFPを付加したヒトknock-in iPS細胞株を樹立し、そのiPS細胞株の未分化性を含む機能性の確認、標識細胞の単離及び性状評価を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ゲノム編集技術であるTALENの手法を用いて、ヒトiPS細胞（1383D2株）に対してΔNp63α (p63) knock-in ヒトiPS細胞を樹立した。両alleleにEGFPがKnock-inされた細胞株を獲得し、それらは多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現とアルカリフォスファターゼ活性を有していたことから、未分化状態を維持したヒトiPS細胞であることを確認した。次にこの株を用いて、SEAM法で角膜上皮分化を誘導したところ、誘導後約2週間において*p63*発現に伴う*EGFP*発現をqPCRと免疫染色にて確認し、さらにFACSにより単離したEGFP陽性細胞の主なisoformが*ΔNp63α*であることをqPCRにより明らかとした。分化誘導後（10-12週間）において、単離したp63-EGFP陽性細胞から作製した上皮細胞シートを免疫染色にて確認したところ、角膜上皮マーカーであるK12及びPAX6を発現し、またタイトジャンクションマーカーであるZO-1を発現していたことから、バリア機能を有する機能的な角膜上皮細胞シートであると考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

TALENの手法を用いて、p63 KI-hiPS細胞株の樹立に成功した。本iPS細胞株は、p63遺伝子の両alleleにEGFPがknock-inされており、内在的なp63発現の可視化とその発現細胞の単離が可能であった。さらに、この細胞株は、野生型の細胞株と同様に、正常なSEAMが形成され角膜上皮への分化が可能であった。p63 KI-hiPS細胞の樹立は本研究が初めてであり、角膜上皮を含めた上皮系細胞への分化誘導法の探索やその発生系譜の解析に有用であると考えられた。