



Title	Selective Laminin-Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Distinct Ocular Lineages
Author(s)	柴田, 峻
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76223
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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		柴田 峻	
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学寄附講座教授	林 晃平
	副 査	大阪大学教授	辻川 えり
	副 査	大阪大学寄附講座教授	玉井 貴人

論文審査の結果の要旨

本研究は、多能性幹細胞の分化誘導に用いる足場として基底膜タンパク質ラミニンのアイソフォームの影響や役割について、iPS細胞を用いた眼細胞分化誘導法を利用して、詳細に解析したものである。iPS細胞からの自律的な眼細胞分化において、ラミニンE8断片のアイソフォームの選択によりその方向性を制御可能であることを明らかにした。ラミニン211E8、およびラミニン332E8を用いた場合、それぞれ神経堤細胞、角膜上皮細胞の分化誘導を促進可能であることを明らかにした。また、ラミニン511E8を用いた場合には、コロニーの中心領域において神経外胚葉、周辺領域にて表面外胚葉が誘導されるという特徴的な分化パターンには、コロニー内での細胞密度勾配とYAPタンパク質の局在が関与することを明らかにした。本研究では、iPS細胞-基質（ラミニンアイソフォーム）間の相互作用の違いが細胞運動性、コロニーの形態、細胞密度に影響し、眼発生において重要なシグナルを制御することを示した。これらの知見は、多能性幹細胞の分化に関する新たな知見をもたらす研究である。

上記のような理由から本研究は学位の授与に値すると考えられる。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	柴田 峻
論文題名 Title	Selective Laminin-Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Distinct Ocular Lineages (ヒト人工多能性幹細胞の異なる眼系譜への選択的ラミニン指向性分化)
論文内容の要旨 〔目 的 (Purpose)〕 ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を含むヒト多能性幹細胞は、無限増殖および三胚葉分化が可能であるため、発生学研究、薬剤開発、再生医療において有用な細胞である。多能性幹細胞の分化における運命決定には、増殖因子を含む培地中の可溶性成分の他、細胞外マトリックス (ECM) 等の培養基質が寄与することが知られる。ECMは幹細胞の増殖や分化を調節し、幹細胞ニッチの維持に重要な役割を果たす。基底膜の主要成分であるECM蛋白質ラミニンは、α ($\alpha 1-5$)、β ($\beta 1-3$)、γ ($\gamma 1-3$) 鎖サブユニットから成るヘテロ三量体蛋白質であり、そのα、β、γ 鎖の組み合わせにより多様な構造形態を示す。ラミニンは多能性幹細胞の未分化維持・増殖を支持可能であり、多能性幹細胞の培養に広く用いられている。近年、特定のラミニンアイソフォームが、特定の体細胞の増殖・分化に効果的であることが報告されている。林らは、ラミニン511のE8断片 (LN511E8) を用いて、眼全体の発生を模倣するiPS細胞由来の同心円状の多層構造の作製に成功し、「Self-formed ectodermal autonomous multi-zone (SEAM)」と命名した (Hayashi et al. Nature 2016)。SEAMは、神経、網膜、水晶体および角膜上皮細胞等多様な眼関連細胞を含有する。しかしながら、SEAM発生におけるラミニンの役割や同心円層構造形成機序は不明であった。そこで、多能性幹細胞から眼系統発生における足場の役割に着目し、他の種類のラミニンアイソフォームの眼分化への影響を検討するとともに、SEAM分化機序を解明することを本研究の目的とした。 〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕 培養皿上に5つのラミニンアイソフォーム (111, 211, 332, 411, 511) のE8断片を被覆し、ヒトiPS細胞に対して自律的眼細胞分化を誘導した。典型的な同心円上の多層構造は、LN511E8上での分化誘導でのみ生成され、他の4つのアイソフォーム上では異なる構造が形成された。qRT-PCR、マイクロアレイ、免疫染色、フローサイトメトリーによって分化細胞の発現解析を行ったところ、特に、LN332E8上での分化では、多数のE-cadherin陽性の上皮細胞が存在し、角膜上皮前駆細胞マーカーのSSEA-4/ITGB4共陽性細胞の割合が他のアイソフォームと比較して最も高かった。さらに、LN332E8上では、LN511E8上での分化誘導期間の半分である6週の分化培養により、角膜上皮細胞シート作製可能な角膜上皮前駆細胞の確保が可能であった。一方、LN211E8上ではp75/SOX10/ITGA4陽性の神経堤細胞が多く分化していることがわかった。分化初期における遺伝子・タンパク質発現解析により、LN211E8はWntシグナル経路を活性化することが明らかになった。LN211E8上での分化において、Wnt阻害剤 (IWP-2) によりWntシグナル経路を阻害すると神経堤細胞分化が阻害された。一方、神経堤分化効率の低いLN511E8上での分化において、Wnt活性化剤 (CHIR99021) 処理により、神経堤細胞の割合が上昇した。次に、LN332E8とLN511E8上における分化過程の細胞の挙動を調べた。タイムラプス観察により、LN332E8上では、iPS細胞が放射状に遊走し、iPS細胞コロニーが拡大した。一方、LN511E8上では、インテグリンを介したアクチン収縮により、コロニーの中心に凝集したままiPS細胞が増殖を続け、特に中央部で細胞が高密度になっていた。この高細胞密度領域では、転写共役因子YAPが核外に局在し、神経外胚葉マーカーであるN-cadherinやPAX6が発現した。一方、周縁部の低細胞密度領域ではYAPが核内に局在し、表面外胚葉マーカーであるE-cadherinが発現していた。細胞密度の上昇およびYAP活性の阻害により、神経外胚葉分化が促進された。 〔総 括 (Conclusion)〕 ヒトiPS細胞からの眼系譜への細胞分化が、基質として用いるラミニンアイソフォームの選択により調節可能であった。さらに、基質とiPS細胞に発現するインテグリンとの結合親和性が、細胞運動性、細胞間相互作用、および細胞密度に影響を与え、WntシグナルおよびYAPシグナルの関与とともに、iPS細胞の運命決定に寄与することを示した。また、コロニーの中心領域において神経外胚葉、周辺領域にて表面外胚葉が形成されるというユニークな配置を有するSEAM形成に細胞密度の勾配とYAPの関与が示された。	