



Title	Efficient Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells into Alveolar Epithelium Type II with a BRD4 Inhibitor
Author(s)	桃實, 徹
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/77602
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 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	桃實 徹
論文題名 Title	Efficient Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells into Alveolar Epithelium Type II with a BRD4 Inhibitor (BRD4インヒビターを用いたマウス誘導型多能性幹細胞からII型肺胞上皮細胞への効率的な分化誘導法の確立)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>誘導型多能性幹細胞 (iPS細胞) からII型肺胞上皮細胞 (ATII) への分化誘導法に関して複数の報告があるが、その分化誘導効率のさらなる改善が必要とされる。BETファミリータンパク質 (主にBRD4) 阻害剤であるJQ1は癌細胞由来細胞株の細胞増殖を抑制し、その作用機序として<i>cMYC</i>の発現を低下させることが報告されている。胚性幹細胞や脂肪幹細胞に関しては、<i>cMyc</i>以外にも<i>Klf4</i>、<i>Pou5f1</i>、<i>Sox2</i>、<i>Nanog</i>などの多くの多能性マーカー遺伝子の発現が低下することも報告されている。今回、我々はJQ1を用いて残存未分化マウスiPS細胞を除去する方法について検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>マウスiPS細胞_iPS-MEF-Ng-20D-17細胞株 (20D-17) を、これまでの報告を参考にして胚様体法と段階的分化誘導法 (iPS細胞→胚性内胚葉→前方前腸→腹側前方前腸→II型肺胞上皮細胞) で26日間 (0-26日目) かけてATIIへと分化誘導した。Activin A 20 ng/ml、Wnt3a 10 ng/mlの4日間投与 (3-7日目) により<i>Cxcr4</i>、<i>Sox17</i>、<i>Foxa2</i>の上昇を認め、胚性内胚葉への分化誘導を確認した。次にNoggin 100ng/ml、SB431542 5uMの2日間投与 (7-9日目) により<i>Pax9</i>、<i>Tbx1</i>の上昇と<i>Sox2</i>の再上昇を認め、前方前腸への分化誘導を確認した。次にWnt3a 20 ng/ml、FGF10/KGF/EGFそれぞれ5 ng/mlの7日間投与 (9-16日目) により<i>Nkx2-1</i>の上昇を認め、腹側前方前腸への分化誘導を確認した。TTF-1陽性細胞は全細胞の36.2±5.9%であった。さらにWnt3a 20 ng/ml、FGF10/KGFそれぞれ5 ng/mlの10日間投与 (16-26日目) により<i>Sftpc</i>、<i>Sftpb</i>の上昇を認め、II型肺胞上皮細胞への分化誘導を確認した。proSPC陽性細胞は17.1±1.5%であった。</p> <p>一方、未分化マウスiPS細胞に対するJQ1の効果を検討した。0.2 μM以上のJQ1添加で未分化マウスiPS細胞の増殖を抑制し、0.2 μMのJQ1投与により多分化能マーカーである<i>Klf4</i>、<i>Pou5f1</i>、<i>Sox2</i>、<i>cMyc</i>が低下することを確認した。26日間 (0-26日目) かけて胚様体法と段階的分化誘導法で分化誘導した前記の細胞群を回収し、さらにマトリゲルで14日間 (26-40日目) 3次元培養した。3次元培養の間にJQ1を4日間 (28-32日目) 添加して残存未分化iPS細胞の除去を試みた。3次元培養のみで40日目のmRNA <i>Sftpc</i>の発現は26日目と同レベルに維持されたが、JQ1添加によりさらに増加した。JQ1を添加した細胞群では、多分化能マーカーの<i>Pou5f1</i>、<i>Sox2</i>の低下を認め、残存未分化iPS細胞 (Nang-GFP陽性細胞) の減少を認めた。JQ1を添加した細胞群の40日目のproSPC陽性細胞は39.4±16.8%であった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>胚様体法と段階的分化誘導法を用いてマウスiPS細胞よりATIIへ分化させることが可能であり、さらにJQ1を添加した3次元培養で残存未分化iPS細胞が除去され、ATIIへの分化誘導効率を改善した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 桃實 徹	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 新石 康
	副 査 大阪大学教授 奥山 宏臣
	副 査 大阪大学教授 熊 御 淳
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>誘導型多能性幹細胞 (iPS細胞) からII型肺胞上皮細胞 (ATII) への分化誘導法に関して複数の報告があるが、分化誘導効率のさらなる改善が必要とされる。発表者らはBETタンパク (Bromodomain (BRD) and extraterminal domain (BET) protein) 阻害剤であるJQ1を用いた方法について検討した。実験1で、既報告を参考にした胚様体法と段階的誘導法で、マウスiPS細胞_iPS-MEF-Ng-20D-17細胞株 (20D-17) を26日間 (0-26日目) かけてATIIへ分化誘導した。分化誘導効率は17.1%であった。実験2で、JQ1の未分化iPS細胞の増殖抑制効果を確認した。実験3で、実験1で得た細胞群をさらに14日間 (26-40日目) マトリゲルで3次元培養し、その間にJQ1を4日間 (28-32日目) 投与した。その結果、分化誘導効率が39.4%に上昇した。iPS細胞からATIIへの分化誘導法に重要な示唆を与える報告と考えられ、学位に値するものと認める。</p>	