



Title	Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periorbital mesenchymal cells
Author(s)	大久保, 徹
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/81896
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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大久保 徹
論文題名 Title	Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periocular mesenchymal cells. (眼周囲間葉細胞の単離を可能とするPITX2-EGFPレポーターヒトiPS細胞株の作製とその検証)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 ヒト人工多能性幹(iPS)細胞を含む多能性幹細胞は再生医療の細胞源として有用である。iPS細胞から誘導した、網膜色素上皮細胞、ドパミン神経前駆細胞、角膜上皮細胞はすでにヒトへの移植が実施されている。一方、網膜細胞や、角膜上皮細胞以外の眼を構成する他の様々な細胞の安定的な誘導方法が報告された例は少ない。神経堤細胞を由来とする眼周囲間葉(Periocular mesenchymal, POM)細胞からは、角膜内皮、角膜実質、虹彩間葉、毛様体筋、線維柱体、強膜等、眼を構成する多様な組織が誘導される。特に、角膜内皮細胞、角膜実質細胞を安定的に誘導することが可能となれば再生医療等への応用が可能となり、臨床的意義も高いと考えられる。しかしながら、POM細胞を選択的に単離する方法が存在しないため、POM細胞およびそれらの派生細胞の発生機構を詳細に調べるのが困難であった。 <i>Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2)</i> 遺伝子はPOM細胞で発現する転写因子である。本研究では、POM細胞やPOM由来の様々な分化細胞を安定的に誘導するための有用なツールとなりうる、<i>PITX2</i>遺伝子をターゲットにしたヒトiPS細胞レポーター株を作製し、iPS細胞株としての特性の確認、レポーター機能の確認、そしてPOM細胞の分化誘導およびその単離に有用であることを示すことを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ヒトiPS細胞201B7株において、Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)により、<i>PITX2</i>遺伝子のエクソン8の下流に<i>EGFP</i>遺伝子をノックインした。ゲノム配列のシーケンスを解析し、導入遺伝子配列が目的部位の片アリルにノックインされていることを確認した。アルカリフォスファターゼ活性やNANOG, OCT3/4, TRA-1-60, SSEA-4の発現を免疫蛍光染色法により確認し、作製した株は多能性を有していることが示された。この株を用いて、林らが報告した、眼全体の発生を模倣する同心円状の多層構造Self-formed ectodermal autonomous multi-zone (SEAM)の誘導を試みたところ、典型的な4層の構造ができ、各層に神経網膜(CHX10)網膜色素上皮(MITF)、レンズ(α-crystallin)、角膜上皮(PAX6/P63)が存在することを免疫蛍光染色により、および、他の細胞も正常に誘導されていることを層別に回収した細胞の遺伝子発現解析により確認した。 既報の誘導条件の組み合わせにより決定した、POM細胞の誘導条件では、一部の凝集した細胞塊において緑色の蛍光が認められ、それは、<i>PITX2</i>の発現と一致していることを免疫蛍光染色により確認した。また、ウェスタンブロッティングによる解析でも、<i>PITX2</i>とEGFPの共発現を確認した。次に、誘導後のEGFP陽性細胞の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、<i>PITX2</i>の発現が上がっており、レポーター株としては正常に機能していることが確認されたが、POM細胞のマーカーとされる、<i>FOXC2</i>, <i>p75</i>, <i>LMX1B</i>, <i>COL8A2</i>などのmRNAの発現が低い値を示しており、POM細胞の誘導方法としては課題が残った。そこで、SEAMを誘導することで、その中に含まれると思われるPOM細胞の遺伝子発現プロファイルを解析することにした。興味深いことに、SEAM誘導14日後において、2層目付近に出現する凝集細胞の一部において、緑色の蛍光がみられた。この時期にフローサイトメーターによりEGFP陽性細胞の単離を行い、遺伝子発現プロファイルを解析したところ、すべてのPOM細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、単離したPOM細胞は特定の環境下で培養することが可能であり、少なくとも培養後2日ではFOXC1とPITX2の共発現を確認できた。 〔総括(Conclusion)〕 <i>PITX2</i>の発現の追跡が可能なヒトiPS細胞株を作製し、<i>PITX2</i>とEGFPが連動して発現していることを確認した。また、SEAM法により誘導されたEGFP陽性細胞は<i>PITX2</i>が発現しているとともに、他のPOM細胞の陽性マーカーである<i>FOXC1</i>, <i>FOXC2</i>, <i>p75</i>, <i>LMX1B</i>は高く、陰性マーカーである<i>SOX10</i>は低く、いずれもPOM細胞の特徴を示した。さらに、単離されたPOM細胞は少なくとも一定期間培養が可能であり、<i>PITX2</i>とFOXC1の発現が維持されていたことから、POM細胞としての特性が保持されているものと考えられた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

大久保 徹 (申請者氏名)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学寄附講座教授	林 竜平
	副 査 大阪大学教授	辻川 元一
	副 査 大阪大学寄附講座教授	玉井 克人

論文審査の結果の要旨

本研究は、種々の眼関連細胞の原基となる眼周囲間葉 (Periocular Mesenchymal, POM) 細胞の標識に有用なレポーターシステムをヒトiPS細胞に導入し、レポーターが機能すること、および実際にPOM細胞の単離をすることが可能であることを示した研究である。POM細胞のマーカー遺伝子であるPITX2の下流にIRES2を用いてEGFP遺伝子を配置したベクターをヒトiPS細胞のゲノムへとノックインすることでPOM細胞のレポーターヒトiPS細胞株を樹立した。この株を用いて、眼を構成する主要な細胞系譜を誘導すると、主要なPOM細胞のマーカーが陽性であるEGFP陽性細胞が得られたことから、POM細胞の誘導と単離が可能であることが示唆された。これらの知見や樹立された細胞株は、POM細胞の発生機構の解明、POM細胞から分化誘導される種々の眼関連細胞への分化誘導研究に有用である。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。