

京都大学	博士（医学）	氏名	伊藤 遼
論文題目	Elucidation of HHEX in pancreatic endoderm differentiation using a human iPSC differentiation model (ヒト iPSC 細胞分化モデルを用いた膵内胚葉分化における HHEX の役割の解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>1 型糖尿病は、インスリンを産生・分泌する膵臓のβ細胞が自己免疫によって破壊され、インスリンの絶対的な欠乏をきたす難治性疾患である。その標準治療はインスリン注射であるが、正常血糖値の維持は困難であり、しばしば重症低血糖・高血糖を引き起こす。膵臓・膵島移植の有効性が示されているが、ドナー不足が問題となっている。近年、胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）などの多能性幹細胞は、再生医療における膵β細胞の供給源として期待され、分化誘導法開発が大幅に進歩している。しかし、より安定した高い分化効率を達成するため、膵発生分化機構の詳細な解明が望まれる。</p> <p>内胚葉系譜の発生過程において、後方前腸は特異的なマーカー遺伝子 PDX1 を発現し、その一部は NKX6.1 および PTF1A を発現する膵内胚葉に分化するが、これは全ての膵系譜細胞の起源となる。膵内胚葉における NKX6.1 の発現は、その後の膵β細胞への分化に重要な役割を果たすと考えられている。膵内胚葉における NKX6.1 発現調節因子として、上述の PDX1 が知られ、また近年 ONECUT1 も報告されているが、その他の因子は未解明であった。</p> <p>そこで、ヒト膵内胚葉における NKX6.1 発現調節因子を同定するために、ヒト iPSC 細胞分化系において、siRNA による遺伝子ノックダウンを用いたスクリーニング系を確立した。上述した既知の NKX6.1 調節因子である PDX1 をポジティブコントロールとして、FANTOM5 データベースから抽出した 719 の利用可能な転写因子の siRNA スクリーニングを行った。別配列の siRNA による再現性や非特異的な細胞毒性も検討し、最終的に NKX6.1 発現を制御する候補遺伝子として HHEX を抽出した。</p> <p>ヒト iPSC 細胞から分化した膵内胚葉において、HHEX ノックダウンを行うことにより、NKX6.1 の発現は減少した一方で、PDX1 の発現は変化しなかった。この結果は、複数のヒト iPSC 細胞/ES 細胞株で再現性が確認された。また、HHEX ノックダウンにより、NKX6.1 のほかに、上述したもう一つの膵内胚葉マーカー遺伝子である PTF1A の発現も低下した。これらの結果から、HHEX が PDX1 による制御とは独立して膵内胚葉の分化を制御することが示された。</p> <p>HHEX は、発生初期の内胚葉組織に発現することが知られている。本研究のヒト iPSC 細胞から膵内胚葉への分化系においても、HHEX の発現は初期の胚体内胚葉から原始腸管の段階にかけて上昇したが、その後、膵内胚葉の段階で再び著明に上昇した。この膵内胚葉段階での顕著な HHEX 発現上昇が NKX6.1 および PTF1A の発現を促進するか否か</p>			

<p>を検証するため、HHEX 発現上昇が遅延する培養条件で HHEX を過剰発現させたところ、NKX6.1 および PTF1A の発現は過剰発現しない場合よりも高かった。</p> <p>HHEX をノックダウンしたヒト iPSC 細胞由来膵内胚葉の転写プロファイルを RNA シークエンスで解析したところ、膵発生関連遺伝子である NKX6.1、PTF1A、ONECUT1、ONECUT3 の発現が低下していた。また、HHEX をノックダウンした膵内胚葉を、膵β細胞（CPEP+ NKX6.1+ 細胞）へ分化誘導すると、ノックダウンしない場合よりも分化効率が低下した。これらの結果から、HHEX が膵β細胞への分化能を有する成熟膵内胚葉の分化に必須であることが示された。今後、より詳細な膵内胚葉の発生分化機構が解明され、ヒト iPSC 細胞/ES 細胞から膵内胚葉への効率的で安定した分化誘導の実現が期待される。</p>
(論文審査の結果の要旨)
<p>内因性インスリン分泌能が廃絶した重症糖尿病患者には膵臓・膵島移植が有効であるが、ドナー不足の問題が依然存在する。近年、多能性幹細胞を用いた再生医療の開発が期待されており、膵発生分化機構を詳細に解明することで、効率的で安定した膵β細胞分化誘導法の確立が望まれる。</p> <p>本研究では、膵内胚葉の主要マーカー遺伝子 NKX6.1 を制御する因子を探索するため、ヒト iPSC 細胞分化系において siRNA ノックダウンライブラリーを用いて転写因子のスクリーニングを行い、候補遺伝子 HHEX を同定した。HHEX をノックダウンすると、既知の NKX6.1 調節因子である PDX1 とは独立に、NKX6.1 および他の膵内胚葉マーカー遺伝子である PTF1A の発現が抑制された。逆に、HHEX を過剰発現すると NKX6.1 と PTF1A の発現が促進された。RNA シークエンス解析では、HHEX をノックダウンした膵内胚葉において、膵発生関連遺伝子である NKX6.1、PTF1A、ONECUT1、ONECUT3 の発現低下を認めた。HHEX をノックダウンした膵内胚葉を膵β細胞へ分化誘導すると、ノックダウンしない場合よりも分化効率が低下した。以上より、HHEX が膵β細胞への分化能を有する成熟膵内胚葉の分化に重要な役割を果たすことが示された。</p> <p>以上の研究は、膵発生分化機構の解明に貢献し、糖尿病に対する再生医療の発展に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 12 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降