

京都大学	博士 (医学)	氏 名	前 伸一
論文題目	Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells (ヒト多能性幹細胞から腎臓へ分化しうる中間中胚葉への分化のモニタリングと高効率な分化誘導法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>【目的】ヒト ES (embryonic stem) /iPS (induced pluripotent stem) 細胞から腎臓を再生する方法は確立されていない。そこで、本研究では腎臓を派生させる胎生組織である中間中胚葉細胞の高効率な分化誘導法を確立し、発生生物学的機能の評価を行った。</p> <p>【方法・結果】まず、細菌人工染色体 (BAC; bacterial artificial chromosome) をターゲティングベクターとして用いる独自の高効率相同組み換え法を開発し、中間中胚葉で最も早期に発現するマーカーである核内転写因子 <i>OSR1</i> (<i>Odd-skipped related 1</i>) の発現をモニターする OSR1-GFP ノックインヒト iPS 細胞株を、既報のヒト iPS 細胞株 201B7 (Takahashi K et. al., Cell, 2007) より樹立することを試みた。得られた薬剤耐性の 130 クローンのうち 4 クローンで、Taqman qPCR 解析および SNP アレイ解析により相同組み換えによる <i>OSR1</i> 遺伝子座への GFP カセットの挿入が確認できたことから、約 3% の効率で相同組み換えクローンを樹立することに成功した。次に、約 40 種類の増殖因子を用いて、ヒト ES 細胞において <i>OSR1</i> 発現を誘導する条件を検証したところ、BMP (bone morphogenetic protein) 7 が中間中胚葉誘導因子であることを見出した。さらに、中胚葉と内胚葉の共通の前駆細胞である中内胚葉に対して、BMP7 と Wnt3a の組み合わせ処理を施すことで、<i>OSR1</i> 発現量がさらに増加することが分かった。そして、樹立したレポーター細胞株を用いて、胚様体形成による 3 次元培養に上記の増殖因子の組み合わせ処理を行ったところ、約 40% の効率で OSR1 陽性細胞が得られた。また、ヒト iPS 細胞を高い生存率を保ったまま単一細胞にまで解離する独自の単層培養法を確立したところ、90% 以上もの高効率にまで OSR1 陽性細胞の作製効率を高めることに成功した。さらに、開発した分化誘導法は複数のヒト ES/iPS 細胞株に対しても有効であり、無血清条件下でも同等の効率で分化を誘導することが可能であった。また、分化誘導した OSR1 陽性細胞の機能評価を行ったところ、それらの細胞は他の中間中胚葉マーカー遺伝子を発現し、<i>in vitro</i> において長期間培養すること</p>			

<p>また、精巣上体の脂肪組織内に移植したところ 4 週間後には、<i>in vivo</i> においても近位尿細管、集合管等のマーカー陽性細胞に分化可能であった。さらに、高効率に作製した OSR1 陽性細胞を TGF (transforming growth factor) $\beta 1$ で処理した後、マウスの後腎細胞と器官培養することで、三次元の尿細管様構造を形成した。</p> <p>【考察】ヒト ES/iPS 細胞から生体内のものと同等の発生生物学的機能を有する中間中胚葉細胞を高効率に分化誘導する方法を確立した。今後、本分化誘導技術を用いて、腎発生機構の解明に加え、細胞療法や疾患モデルを作製する研究への発展が期待される。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>腎臓を構成する細胞のほとんどは、胎生組織である中間中胚葉から派生することから、ヒト ES/iPS 細胞からそれらの中胚葉細胞を分化誘導することが、腎臓再生の最初のステップである。申請者は、細菌人工染色体 (BAC) をターゲティングベクターとして用いる独自の高効率相同組み換え法を開発し、中間中胚葉で最も早期に発現するマーカーである核内転写因子 <i>OSR1</i> の発現をモニターする OSR1-GFP ノックインヒト iPS 細胞株の樹立を試みた。Taqman qPCR 解析及び SNP アレイ解析により相同組み換えによる <i>OSR1</i> 遺伝子座への GFP カセット挿入を確認する評価法を確立し、約 3% の効率で相同組み換えクローンを樹立することに成功した。次に、OSR1-GFP レポーター細胞株を用いて、単層培養に増殖因子などの組み合わせ処理を施す新規の分化誘導法を開発し、90% もの高効率で OSR1 陽性細胞の作製に成功した。また、本分化誘導法は複数のヒト ES/iPS 細胞株に対しても有効であった。さらに、作製された OSR1 陽性細胞は他の中間中胚葉マーカー遺伝子を発現し、<i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> において近位尿細管、ポドサイト、集合管等の成体腎構成細胞への分化能と器官培養にて三次元の尿細管様構造を形成する能力を示した。以上の研究は、腎発生機構の解明に加え、細胞療法や疾患モデル作製研究の進展に大いに貢献することが期待される。</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、平成 26 年 1 月 21 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