

京都大学	博士（医学）	氏名	武内大輝
論文題目	<b>Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture</b> (3D 培養を用いたヒト多能性幹細胞から内胚葉系譜の発生に沿ったインスリン産生細胞への誘導)		
(論文内容の要旨) <p>Ⅰ型糖尿病の治療法として膵臓・膵島細胞移植が行われているが、ドナー不足が問題となっている。この問題を解決する方法としてヒト多能性幹細胞(hPSCs)の利用が期待されている。hPSCs からインスリン産生細胞(IPCs)への誘導に関する報告は多くあるが、誘導効率が低く、グルコース応答性を有する mature IPCs の獲得が困難である。また細胞株の違いにより再現性が十分でない。</p> <p>膵臓の <math>\beta</math> 細胞は、幹細胞から definitive endoderm (DE) 細胞が誘導され、膵臓の発生に重要な遺伝子である PDX1 を発現する PDX1<sup>+</sup>細胞、内分泌前駆細胞、INSULIN<sup>+</sup> (INS<sup>+</sup>)細胞を経て発生する。本研究ではこの発生過程を模倣し、誘導段階を DE 細胞・PDX1<sup>+</sup>細胞・INS<sup>+</sup>細胞の 3 段階に分け、成長因子や低分子化合物を用いて各段階の誘導効率を改善した上で mature IPCs を獲得し、さらに複数の hPSC 株で再現可能な誘導系の確立を目指した。</p> <p>hPSCs から DE 細胞への誘導に Activin A が有効であると報告されているため、これに加えて CHIR99021 と wortmannin を併用したところ、約 90%と高効率で DE 細胞が誘導される事を見出した。</p> <p>次に DE 細胞から PDX1<sup>+</sup>細胞の誘導において FGF10、Noggin、dorsomorphin、レチノイン酸を併用したところ、PDX1<sup>+</sup>細胞が 50%程誘導された。さらに上記 4 因子と FR180204 を使用したところ、PDX1<sup>+</sup>細胞の誘導効率は約 80%に上昇した。FR180204 は ERK1/2 活性の阻害と TGF-<math>\beta</math> 誘導性 AP-1 転写活性の阻害が知られている。MEK1/2 阻害剤 PD0325901 は効果が認められなかったのに対し、AP-1 阻害剤 SR11302 の添加において誘導効率は約 80%と FR180204と同程度であった。以上の結果より、PDX1<sup>+</sup>細胞の高効率な誘導には AP-1 活性の抑制が重要である事が示唆された。さらに上記 5 因子を用いて他の hPSC 株の誘導効率を確認したところ、PDX1<sup>+</sup>細胞が約 70-80%と高効率で誘導可能である事を確認した。</p> <p>次に PDX1<sup>+</sup>細胞から INS<sup>+</sup>細胞への誘導において、forskolin と dexamethasone と Alk5 inhibitor II と nicotinamide の併用により約 10%の効率で INS<sup>+</sup>細胞が得られたが、グルコース応答性は認められなかった。そこで mature IPCs を獲得するために三次元(3D)培養を行った。その結果、誘導効率が約 30%に上昇し、さらにグルコース応答性が認められた。この誘導系を複数の hPSC 株に用いたところ、INS<sup>+</sup>細胞の誘導効率は全ての細胞株で約 30%であり、グルコース応答性を示した。</p> <p>本誘導系は細胞株毎に至適化の必要がなく、3D 培養が mature IPCs の誘導に重要である事を示した。また PDX1<sup>+</sup>細胞を高効率で誘導するために AP-1 活性の抑制が重要である事を見出した。</p> <p>以上の成果は、ヒト膵臓でのインスリン分泌能獲得のメカニズムを理解するのに有益であり、糖尿病に対する細胞療法や創薬の基盤技術となる可能性が示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ヒト多能性幹細胞(hPSCs)は自己複製能と多分化能を有する事から、再生医療や創薬などへの応用が期待されているが、グルコース応答性を有するインスリン産生細胞を効率よく誘導する事は未だ困難である。

本研究において申請者は、成長因子と低分子化合物を併用する事で hPSCs から効率よくインスリン産生細胞(IPCs)を分化誘導する事に成功し、三次元(3D)培養がグルコース応答性を有する mature IPCs の作出に重要である事を示した。また PDX1<sup>+</sup>細胞の高効率な誘導に AP-1 作用の抑制が重要である事も示した。さらにこの誘導系は複数の hPSC 株においても用いることができることも示された。

以上の研究はヒト多能性幹細胞からグルコース応答を示すインスリン産生細胞への誘導系の確立ならびにそのメカニズム解明に貢献し、再生医療、病態解明ならびに創薬研究に寄与するところが多い。

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。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 6 月 9 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降