

京都大学	博士 (医学)	氏名	松井 敏
論文題目	Differentiation and isolation of iPSC-derived remodeling ductal plate-like cells by use of an <i>AQP1-GFP</i> reporter human iPSC line ( <i>AQP1-GFP</i> レポーターヒト iPSC 細胞株を用いたリモデリング期胆管板様細胞の分化誘導と単離)		
(論文内容の要旨)			
<p><b>【背景・目的】</b> 胆道を構成する上皮細胞である胆管上皮細胞の発生は、内胚葉から原始腸管を經由して発生した門脈周囲の肝芽細胞が、胎生 6 週頃に胆管板(ductal plate)と呼ばれる一層の上皮として分化することから始まる。胎生 12 週頃には原始的な管腔構造が構築され、リモデリング期胆管板(remodeling ductal plate)と呼ばれる。胆管板の発生学的異常(ductal plate malformation)は常染色体劣性多発嚢胞腎(ARPKD)における肝嚢胞や肝線維症などの先天性肝胆道系疾患の成因となる。</p> <p>これらの疾患の病態解明と治療法開発に向けて胎生期胆管細胞のモデルが必要であるが、マウスの胎仔由来胆管細胞は遺伝子発現をはじめとするヒトとの種差による違いが存在し、ヒト胎児サンプルでの研究も倫理的、技術的に困難であるため、ヒト iPSC 細胞から発生過程を模倣して胆管細胞を分化誘導する系は有力な代替研究手法となりうると考えた。ところが、胆管板の発生段階の指標となるマーカー遺伝子はほとんど知られておらず、ヒト iPSC 細胞から胆管板、リモデリング期胆管板を分化誘導した報告は存在しない。</p> <p><i>AQP1</i> と <i>CK7</i> は肝芽細胞、肝細胞、胎生 6 週頃の胆管板では発現しておらず、それぞれ胎生 15 週頃、20 週頃からリモデリング期胆管板に発現していることが知られる。そこで、本研究では <i>AQP1</i> や <i>CK7</i> をマーカー遺伝子として用いて、ヒト iPSC 細胞から胆管板、リモデリング期胆管板を段階的に分化誘導することを目的とした。</p> <p><b>【方法・結果】</b> まず、<i>AQP1</i> 陽性細胞の分化誘導効率の定量化と単離法の開発のために、<i>AQP1-GFP</i> レポーター ヒト iPSC 細胞株 23C27 を樹立した。具体的にはヒト <i>AQP1</i> の配列を含む BAC(bacterial artificial chromosome)を用いて <i>AQP1-GFP</i> ベクターを作製し、ヒト iPSC 細胞株 585A1 に遺伝子導入を行った。</p> <p>そして、ヒト iPSC 細胞から肝細胞を誘導する既報の方法を改良し、23C27 株から肝芽細胞(培養 11 日目)を作製した。次に、マウス肝臓発生の知見を参考にして、発生期胆管板に接する門脈周囲間葉で発現するとされる TGFB2、胆管形成に必須とされる EGF に着目した。分化誘導された肝芽細胞(培養 11 日目)へ TGFB2 と EGF を添加して培養を続けると、培養 14 日目には SOX9 と CK19 が共陽性の胆管板様細胞が高効率に誘導されることが確認できた。これらの細胞には <i>AQP1</i>, <i>CK7</i> のタンパク質発現は認められなかったが、さらに培養を続けると、培養 18-20 日目に <i>AQP1</i>, <i>CK7</i> を発現する細胞が得られた。そして、培養 14 日目と 18 日目の細胞集団の遺伝子発現を定量 PCR 法で評価したところ、前者に比べ後者では <i>AQP1</i>, <i>CK7</i> の発現が有意に上昇していた。さらに、培養 18 日目の細胞集団から 23C27 株を用いて <i>AQP1</i> 陽性細胞を単離し、定性 PCR 法を用いて遺伝子発現を評価したところ、<i>AQP1</i> 陽性細胞において <i>AE2</i>, <i>GGT</i> などの成熟胆管マーカー遺伝子は発現していなかったが、<i>CK7</i>, <i>SOX9</i>, <i>CFTR</i>, <i>CK19</i>, <i>OPN</i>, <i>JAG1</i>, <i>TGFBR2</i>, <i>EGFR</i>, <i>HNF1B</i>, <i>DLK1</i>, <i>HHEX</i>, <i>TGR5</i>, <i>SLC10A2</i> 等の複数の胆管上皮細胞マーカー遺伝子の発現が認められた。<i>SOX2</i>, <i>NKX2.1</i>, <i>PDX1</i>, <i>CDX2</i> などの内胚葉由来の他臓器マーカー遺伝子は検出されなかった。</p>			

これらの結果から、培養 14 日目の細胞集団は胆管板細胞に相当し、培養 18 日目に分化誘導される *AQP1* 陽性細胞は胎生 15-20 週頃のリモデリング期胆管板細胞に相当すると考えられた。

さらに、培養 14 日目と 18 日目の細胞集団、培養 18 日目に単離された *AQP1* 陽性細胞を三次元培養することで、Rhodamine 123 輸送機能を有する胆管様構造を再構築可能であることも確認した。

**【考察・結論】**  
以上の結果から、*AQP1* をマーカー遺伝子として用いて、ヒト iPSC 細胞から胆管板様細胞、リモデリング期胆管板様細胞を段階的に分化誘導可能であることが確認された。本研究は、ヒト iPSC 細胞から胆管板様細胞、リモデリング期胆管板様細胞を初めて分化誘導したものであり、今後肝内胆管系の発生学やその異常に起因する疾患の病態解明と治療法開発に寄与することが期待される。

(論文審査の結果の要旨)  
ヒト肝内胆管系の発生過程において、胎生 6 週頃に胆管板、12 週頃にリモデリング期胆管板が形成される。その発生学的異常に起因する難治性疾患の病態解明に向けてヒト iPSC 細胞を用いた疾患モデルの開発が望まれるが、ヒト iPSC 細胞からそれらの胆管前駆細胞を分化誘導した報告はない。そこで、本研究では *AQP1* や *CK7* をマーカー遺伝子とし、ヒト iPSC 細胞から段階的に胆管前駆細胞への分化誘導を行った。まず、*AQP1-GFP* レポーターヒト iPSC 細胞 23C27 株を樹立し、その株から作製した培養 11 日目の肝芽細胞に TGFB2、EGF の共処理を行うことで、培養 14 日目に SOX9、CK19 共陽性の胆管系細胞、培養 18-20 日目にさらに *AQP1*, *CK7* を発現する細胞を誘導することに成功した。次に、培養 14 日目と 18 日目の細胞集団の遺伝子発現を比較解析することで、培養 14 日目の SOX9、CK19 共陽性細胞が胆管板細胞に、培養 18 日目の *AQP1* 陽性細胞が胎生 15-20 週頃のリモデリング期胆管板細胞に相当することを確認した。さらに、これらの細胞は三次元培養系で Rhodamine 123 輸送機能を有する胆管様構造を再構築し、ヒト iPSC 細胞から胆管板様細胞、リモデリング期胆管板様細胞と胆管様組織の分化誘導法の確立を確認できた。以上の研究は、ヒト肝内胆管系の発生機構とその異常に起因する病態の解明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 31 年 4 月 12 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