

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	梶 原 正 俊
論文題目	Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells (ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化特性はドナーに依存する)		
(論文内容の要旨)			
ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に無限の増殖能を持ち、三胚葉全ての細胞に分化する能力を持つこと、そして個性が明らかなドナーの体細胞から作製できることから、細胞移植治療や薬剤開発、病因解明の研究など、幅広い分野での利用が期待されている。特に、ドナーと同じ遺伝子を持った iPS 細胞から肝細胞を作製することができれば、肝細胞を用いた薬物代謝評価における個体差の問題や肝細胞移植治療における拒絶反応の問題を克服することができると考えられる。 これまでにヒト ES/iPS 細胞から肝細胞へと分化させる方法はいくつか報告されてきたが、どの方法も肝細胞の機能を完全に再現するまでには至っていない。ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞へと確実に分化させるためには、分化誘導法と同様に使用する ES/iPS 細胞の品質も重要であると考えられるが、肝細胞への分化という観点からのヒト iPS 細胞株間の差異については注目されてこなかった。iPS 細胞の質に影響を与える要素としては、由来細胞の種類や遺伝的背景、iPS 細胞樹立方法などが挙げられる。 本研究では、はじめに同一ドナーの皮膚線維芽細胞に由来する 5 種類のヒト iPS 細胞と 2 種類のヒト ES 細胞を用い肝細胞への分化誘導を行った。すると肝関連遺伝子・タンパクの発現および肝機能評価において細胞株間の著明なばらつきが確認された。 そこで更に多数のヒト iPS 細胞株間における肝細胞への分化効率を比較可能にするため分化誘導の手法の改良を行った。そのうえで、4 種類の細胞（皮膚線維芽細胞・歯髄幹細胞・末梢血細胞・臍帯血細胞）から 3 種類の方法(レトロウイルス、センダイウイルス、エピソーマルプラスミド)で樹立した 28 種類のヒト iPS 細胞と 7 種類のヒト ES 細胞の肝細胞への分化傾向を調べた。肝細胞への分化効率の指標として、代表的な肝機能であるアルブミン分泌量を用いた。末梢血細胞由来の iPS 細胞から分化した肝細胞はヒト ES 細胞、皮膚線維芽細胞および歯髄幹細胞由来の iPS 細胞から分化した肝細胞に比べ有意に高いアルブミン分泌量を示した。一方で iPS 細胞を樹立する方法別では肝細胞への分化効率のばらつきは観察されなかった。 上記の結果より、末梢血細胞が肝細胞への分化に適した iPS 細胞のドナー細胞であると考えられたが、この実験では皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞は単一ドナーから、末梢血細胞由来の iPS 細胞は 2 名のドナーから樹立した iPS 細胞であったため、細胞を採取したドナーの違いによって分化傾向に差がでてくる可能性が否定できなかった。 そこで、同一ドナーから採取した皮膚線維芽細胞と末梢血細胞それぞれから樹立した iPS 細胞を用いて、同時に肝細胞への分化傾向を調べることにした。			

異なる 3 名のドナーから樹立した iPS 細胞を用いて実験を行ったところ、肝細胞への分化を示すアルブミン分泌量は、由来となる細胞による違いがほとんど見られず、むしろドナーの違いが肝細胞への分化傾向に大きな影響を与えていることが明らかとなった。 最後に肝細胞への分化傾向の違いを生む分子メカニズムについて調べるため、対照的な肝細胞分化の傾向を示した 2 種類の iPS 細胞に関して、未分化状態そして CXCR4 陽性内胚葉細胞における網羅的な遺伝子発現を比較したが、明確な差は見られなかった。また、肝関連転写因子のプロモーター領域における DNA のメチル化状態についても検討を行ったが、こちらも明確な差は確認できなかった。 本研究では、ドナーの遺伝的背景がヒト iPS 細胞の肝細胞への分化に大きな影響を与える可能性が明らかとなった。今後 iPS 細胞の性質を比較する際にはドナーの違いによる影響を考慮に入れる必要がある。			
(論文審査の結果の要旨) ヒト iPS 細胞に由来する肝細胞は、薬物代謝評価や細胞移植治療への利用が期待されている。申請者は本研究で、肝細胞分化における iPS 細胞株間の差異に注目し、4 種類の細胞（皮膚線維芽細胞・歯髄幹細胞・末梢血細胞・臍帯血細胞）から 3 種類の方法(レトロウイルス、センダイウイルス、エピソーマルプラスミド)で樹立した 28 株のヒト iPS 細胞と 7 株のヒト ES 細胞の肝細胞への分化傾向を調べた。 末梢血細胞由来の iPS 細胞から分化した肝細胞はヒト ES 細胞、皮膚線維芽細胞および歯髄幹細胞由来の iPS 細胞から分化した肝細胞に比べ有意に高いアルブミン分泌を示し、優れた肝細胞への分化能力が確認された。一方で iPS 細胞を樹立する方法別では肝細胞への分化効率のばらつきは観察されなかった。 またドナーの違いによる影響を考慮するため、同一ドナー由来の皮膚線維芽細胞と末梢血細胞それぞれから樹立したヒト iPS 細胞を用いて、同時に肝細胞への分化傾向を調べた。すると、肝細胞への分化を示すアルブミン分泌量は、由来となる細胞による違いがほとんど見られず、むしろドナーの違いが肝細胞への分化傾向に大きな影響を与えていることが明らかとなった。 以上の研究は、いまだ未知な部分が多く残る iPS細胞の肝細胞分化における株間の差異にドナーの遺伝的背景が関与することを示し、今後のより成熟した iPS細胞由来肝細胞の作製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 24 年 11 月 5 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			