

学位論文抄録

Albumin-mKO1ノックインヒト胚性幹細胞 および 人工多能性幹細胞株の樹立とその解析
(*Albumin* gene targeting in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to
monitor hepatic differentiation)

梅田香穂子

指導教員

糸 昭苑 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻
多能性幹細胞学

学位論文抄録

【目的】ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、内胚葉、肝前駆細胞を経て、Albumin (ALB)を分泌し薬剤代謝活性のある成熟肝細胞へと分化する。先行研究では ES, iPS 細胞の80%以上を ALB 陽性細胞へと分化誘導できるとしているものもあるが、ALB 分泌能や薬剤代謝活性は成体肝に及ばない。また、これまでの分化細胞の評価は RT-PCR および免疫細胞化学的解析によるため、解析後の細胞を引き続き培養することが困難である。そこで、分化細胞を生きたまま評価する系の確立を目的とし、ALB の転写制御領域下流に蛍光レポーター遺伝子 monomeric kusabira orange (mKO1) を挿入したヒト ES, iPS 細胞株を樹立した。さらに、本系を用い、肝細胞の定量化、純化、遺伝子発現解析を行うことも目的とした。

【方法】ヒト ES 細胞株 (Kh3) およびヒト iPS 細胞株 (246H1) へ、ヘルパー依存型アデノウイルス (HDAV) を用いて ALB/mKO1 ノックイン細胞株を樹立し、マウス中腎由来の細胞株 M15 細胞を用いて肝分化誘導を行った。さらに、フローサイトメーターにより mKO1 陽性細胞を純化し、マイクロアレイ解析を行った。mKO1 陽性細胞の遺伝子発現プロファイルを、公開データベース中のヒト成体肝、ヒトES由来の分化細胞、AFP:enhanced Green fluorescent protein (eGFP) 導入株の GFP 陽性細胞と比較した。

【結果】樹立した ALB/mKO1 ヒト ES, iPS 細胞株は、内胚葉を経て肝細胞へと分化した。ALB の転写量と ALB 陽性細胞の増加に相応して、mKO1 の転写量と mKO1 陽性細胞も増加した。全ての mKO1 陽性細胞は ALB を共発現していたが、ALB 単独陽性細胞も見られた。フローサイトメーターにより分取した mKO1 陽性細胞では ALB の転写が増加し、生体肝で発現の高い遺伝子、薬剤代謝関連遺伝子等、肝機能関連の遺伝子の発現も増加していた。一方、先行研究でヒト ES 細胞から肝分化誘導を行った細胞で発現が上昇する遺伝子の多くは、肝機能、肝細胞系譜と関連がなかった。また、ALB/mKO1 陽性細胞は、AFP:eGFP 陽性細胞に比べ、成熟肝に近いプロファイルを示した。

【考察】先行研究では ALB 陽性細胞が80%以上あるが、その遺伝子発現プロファイルは、成熟肝とは異なっている。よって、ALB タンパク質の有無による分化評価法では、真に肝機能のある肝細胞をとらえきれていない可能性がある。一方、mKO1 の蛍光は、ALB の転写活性を反映し、mKO1 陽性細胞は、成熟肝細胞に近い特性を有する。よって今後、mKO1 の蛍光を指標に、分化誘導法を探索することで、従来よりも真に成熟した肝細胞を得ることが可能であると推測される。

【結論】樹立した細胞株は、分化した肝細胞の可視化、定量化、純化のみならず、ヒト ES 細胞および iPS 細胞由来の肝細胞のさらなる成熟化に必要な知見を得るために有用である。