

梅田 香穂子 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Albumin-mK01 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)

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から、内胚葉、肝前駆細胞を経て、成熟肝細胞へと分化させる試みは多く行われている。しかし分化細胞のアルブミン (ALB) 分泌能や薬物代謝活性は成体肝に及ばず、解析後の細胞を引き続き培養することも困難である。本研究では、これらの問題を克服するために、アルブミンの転写制御領域下流に蛍光レポーター遺伝子 monomeric Kusabira-Orange (mK01) を挿入したヒト ES、iPS 細胞株 (*ALB*/mK01) を樹立すること、さらにこれらを用いて、誘導された肝細胞の定量化、純化、遺伝子発現解析を行うことを目的とした。

まずヒト ES 細胞株 (Kh3) およびヒト iPS 細胞株 (246H1) に対して、ヘルパー依存型アデノウイルス (HDAdV) による相同組み換え法を用いて *ALB*/mK01 ノックイン細胞株を樹立した。これらをマウス中腎由来の細胞株 M15 細胞を用いた分化系に投入して肝細胞への誘導を行ったところ、アルブミンの転写と陽性細胞の増加に相応して、mK01 の転写と陽性細胞も増加した。全ての mK01 陽性細胞はアルブミン蛋白を共発現していたが、アルブミン陽性かつ mK01 陰性細胞も多く存在した。アルブミン蛋白の半減期は長いため、mK01 は解析時点でのアルブミンの転写を反映していることが示唆された。

次いでフローサイトメーターにより mK01 陽性細胞を純化し、マイクロアレイ解析を行った。さらに mK01 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 細胞由来の肝細胞、 α -fetoprotein (*AFP*) 転写制御下に enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) が導入された ES 細胞由来の肝細胞 (*AFP*:eGFP) と比較した。mK01 陽性細胞ではアルブミンの転写が増加し、成体肝で発現の高い遺伝子群、薬物代謝関連遺伝子群、肝機能関連遺伝子群の発現も増加していた。一方、先行研究のヒト ES 細胞由来肝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*/mK01 陽性細胞は、*AFP*:eGFP 陽性細胞に比べ成体肝に近いプロファイルを示した。以上から mK01 の蛍光はアルブミンの転写活性を反映し、mK01 陽性細胞は成体肝細胞により近い特性を有することが明らかになった。

審査では、樹立された細胞株の有用性、mK01 陽性と非陽性との境界決定の妥当性、陽性細胞と *in vivo* の発生過程との対応、成体肝に依然及ばない点、誘導法改善に向けての戦略、アルブミン単独陽性細胞の意義、純化プロセスによる細胞へのダメージ、親株の選択の妥当性、他の相同組み換え法との比較、ネオマイシン耐性遺伝子残存の影響、テラトーマの利用の可能性、等について多くの質疑応答がなされ、申請者からは適切な回答が得られた。

本研究は、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞において相同組み換え法を用いて肝細胞誘導の指標となる細胞株を樹立したものであり、分化した肝細胞の可視化、定量化、純化のみならず、さらに成熟した肝細胞の誘導法開発に有用である。よって学位の授与に値すると判断した。

審査委員長 腎臓発生学担当教授

西中野 隆一