

論文内容要旨

ヒト多能性幹細胞の
染色体異常株・正常株における
分化指向性の違い

主指導教員：二川 浩樹 教授

(統合健康科学部門口腔生物工学)

副指導教員：里田 隆博 教授

(統合健康科学部門生体構造・機能修復学)

副指導教員：田地 豪 准教授

(統合健康科学部門口腔生物工学)

岡村 美菜子

(医歯薬保健学研究科 口腔健康科学専攻)

論文内容要旨

論文題目 ヒト多能性幹細胞の染色体異常株・正常株における分化指向性の違い

学位申請者 岡村 美菜子

【目的】

ヒト胚性幹 (ES) 細胞やヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞などのヒト多能性幹 (PS) 細胞は、自己複製能を有しながら無限増殖し、さらに様々な細胞へ分化する多分化能を有することから、再生医療、薬理効果や毒性評価などへの応用に向けて盛んに研究が進められている。一方で、ヒト PS 細胞は細胞株間で形質が異なり、ゲノムの不安定性が報告されており、分化能においても細胞株間で差があることが報告されている。しかしながら、ヒト PS 細胞の細胞株間における分化指向性の違いに関しては未解明な部分が多い。

本研究では、ヒト PS 細胞の細胞株間における分化指向性の違いを検出することを目的とし、ヒト PS 細胞染色体異常株と正常株から肝細胞への分化誘導および三胚葉への分化誘導における分化指向性の違いを検出した。

【方法】

細胞は、ヒト ES 細胞株 H9 (WiCell Bank, Madison, WI)、ヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学 iPS 細胞研究所より医薬基盤研究所へ供与)、Dotcom (JCRB1327 : JCRB 細胞バンク)、Tic (JCRB1331、JCRB 細胞バンク)、Squeaky (JCRB1329、JCRB 細胞バンク) を使用した。分化指向性の評価方法として、Touboul らの報告による肝細胞への分化誘導法 (Touboul et al., HEPATOLOGY, 2010, 51:1754-1765) を改変して、肝細胞系譜における遺伝子発現プロファイルを解析した。ヒト PS 細胞を単一細胞に分散し、無血清培地を用いて播種した。培養 2 日目に LY294002、activin A、FGF-2、BMP-4 を添加し、5 日目に FGF-10 を添加し、8 日目にレチノイン酸、SB431542、FGF-10 を添加し、10 日目に FGF-4、HGF、EGF を添加して培養後、さらに 10 日間培養を行った。分化誘導効率の評価は、30 日目まで培養した細胞の遺伝子発現を未分化マーカー、中内胚葉マーカー、肝幹細胞マーカー、肝細胞マーカーを含む Custom PCR Array を作製し、解析した。次に、肝細胞へと分化誘導した 30 日目の培養上清を回収し、ELISA 法を用いて上清中のアルブミン分泌量を算出した。さらに、ヒト PS 細胞の染色体異常株と正常株の分化指向性の違いを比較するため、胚様体 (EB) を用いて、各細胞株の三胚葉への分化指向性を評価した。EB を形成後、2 週間培養し、RNA を抽出後、その遺伝子発現を hPSC Scorecard Panel を用いて解析した。遺伝子発現プロファイル解析は、スコア化、ヒートマップ、および細胞株間の遺伝子発現量の変動にて示した。

【結果】

Custom PCR Array を用いて、培養 30 日目における肝細胞系譜の遺伝子発現プロファイルを解析した。ヒト PS 細胞間の成熟肝細胞マーカーの遺伝子発現量において、染色体正常クローンの Tic 細胞、Dotcom 細胞と比較して染色体異常クローンの Squeaky 細胞は低い発現量を示した。次に、肝細胞の成熟度合の指標の一つであるアルブミン分泌量を用いて、分化誘導時の分化指向性に違いがあるかを確認するために、肝細胞様細胞へ分化誘導時のアルブミン分泌量を測定した。5 株のヒト PS 細胞のうち H9 細胞においてアルブミン分泌量が最も高く、201B7 細胞において最も低い結果となった。また、Tic 細胞、Dotcom 細胞、Squeaky 細胞の順でアルブミン分泌量が高かった。以上の結果から、肝細胞様細胞への分化誘導において、ヒト PS 細胞株間のみならず、同じドナー由来のヒト PS 細胞でも、クローン間で分化指向性の違いが認められた。

ヒト PS 細胞の EB を形成後、hPSC Scorecard Panel を用いて、未分化マーカー、外胚葉マーカー、中胚葉マーカー、内胚葉マーカーの遺伝子発現量をスコア化した。この解析方法では、染色体正常株の H9 細胞と染色体異常株の H9 variant 細胞、染色体正常株の 201B7 細胞と染色体異常株の 201B7-IA 細胞において、分化指向性の大きな違いは検出されなかった。そこで、次に、ヒートマップを用いて、各分化マーカーの遺伝子発現量を比較した。この結果から、分化しやすい傾向がある細胞株の染色体正常株の H9 細胞とその異常株の H9 variant 細胞と分化しにくい傾向がある細胞株の染色体正常株の 201B7 細胞とその異常株の 201B7-IA 細胞において、染色体異常株では正常株と比較して、外胚葉マーカーの発現量が増加し、中胚葉マーカーの発現量が減少しており、共通した傾向が認められた。さらに、これらの染色体異常株と正常株において、分化指向性の違いに関与する遺伝子を抽出するため、細胞株間の遺伝子発現量の変動を検討した。未分化のヒト PS 細胞では、H9 細胞とその異常株の H9 variant 細胞、201B7 細胞とその異常株の 201B7-IA 細胞で共通して、染色体異常株が正常株より遺伝子発現量の高い遺伝子群を抽出した。同様に、EB への分化したヒト PS 細胞において、染色体異常株と正常株の分化指向性の違いと関係があると考えられる遺伝子群を抽出した。以上の結果から、EB への分化により、染色体異常株では正常株と比較して中胚葉マーカーおよび内胚葉マーカーの発現が低くなった。さらに、染色体異常株では外胚葉マーカーの発現が高くなった。

【結論】

本研究では、ヒト PS 細胞の細胞株間における分化指向性の違いの検出を目的として、ヒト PS 細胞株から肝細胞および三胚葉を誘導し、ヒト PS 細胞の細胞株間における分化指向性の違いを検出した。同じドナー由来のクローンであっても、分化指向性が異なることが明らかとなった。また、同じ細胞株であっても、長期継代により染色体異常となった細胞では、分化指向性が異なることが明らかとなった。本研究により、ヒト PS 細胞の品質管理の重要性が示された。