論 文 内 容 の 要 旨

放送大学大学院文化科学研究科
文化科学専攻自然科学プログラム
2014年度入学
（ふりがな）（氏名）津賀田　貴子

1. 論文題目

Human ES/iPS 細胞から膵ベータ細胞に分化誘導するための有用な遺伝子についての検証

2. 論文要旨

胚性幹細胞（embryonic stem cells: ESCs） あるいは人工多能性肝細胞（induced pluripotent stem cells: iPSCs)からインスリン分泌細胞への分化誘導効率は低く、臨床応用化への大きなハードルとなっている。今回われわれは、ESCs、iPSCs の「株：ライン」によってインスリン分泌細胞への分化誘導効率が異なることに着目し、インスリン分泌細胞の分化に重要であると思われる遺伝子を抽出した。まず、ESCs の17ラインの間での分化誘導効率の違いについての報告に着目し、膵島マーカーが高発現しているライン（HUES8）、全く発現していないライン（HUES6）の 2 ラインを選び、それらのマイクロアレイのデータから、4 倍以上遺伝子発現の異なる因子を抽出した。HUES8 が HUES6 に比べて発現量が高い遺伝子は、RPS4Y1, DDX3Y, EIF1AY, GREM1, GATA6, NLGN4Y の

6 遺伝子であった。これら 6 遺伝子中、RPS4Y1, DDX3Y, EIF1AY, NLGN4Y の 4 遺伝子は Y 染色体上の遺伝子であり、細胞の性別の違いによるもの(HUES6 が女性、HUES8 が男性の細胞)と考えられるため検討から除外した。一方、HUES6 が HUES8 に比べ発現量が高い遺伝子は、NLRP2, EGR1, SMC3 の 3 遺伝子であった。また、膵島細胞由来 iPS 細胞(PiPSCs)と線維芽細胞由来 iPS 細胞(FiPSCs) では PiPSCs のほうがインスリン分泌細胞へ分化しやすいことに着目し、PiPSCs を樹立した後、上記の遺伝子に関し FiPSCs との比較を行った。GREM1, GATA6 の 2 遺伝子に関しては、PiPSCs の方が FiPSCs に比べ発現が高い傾向にあった。一方で、NLRP2, EGR1, SMC3 の 3 遺伝子に関しては、EGR1 に関しては、PiPSCs の方が FiPSCs に比べ発現が低い傾向にあったが、NLRP2, SMC3 に関しては予想に反して PiPSCs の方が FiPSCs に比べ発現が高い傾向にあった。以上の結果より、GATA6、GREM1 遺伝子の高発現および EGR1の発現抑制がインスリン分泌細胞への分化に重要である可能性が示唆された。

次に、我々は膵臓の発生における EGR1 の役割を調べた。分化の早期での EGR1 の siRNA の導入は、線維芽細胞由来の人工多能性幹細胞(FiPSCs)の膵臓の内胚葉とインスリン産生細胞への分化を誘導した。他方、分化の後期での EGR1 の発現低下は、FiPSCs の膵臓の内胚葉とインスリン産生細胞への分化を抑制した。また、EGR1 の過剰発現は、膵臓細胞由来の人工多能性幹細胞(PiPSCs)の膵臓の内胚葉とインスリン産生細胞への分化を抑制した。これらの結果は、EGR1 の早期における発現抑制によって、iPSCs のインスリン産生細胞への分化を効率的に誘導できることを示唆している。

Abstract

The School of Graduate Studies,
The Open University of Japan
Name Takako Tsugata

Potential Factors for the Differentiation of ESCs/iPSCs Into Insulin-Producing Cells

The low efficiency of in vitro differentiation of human embryonic stem cells (ESCs) or human induced pluripotent stem cells (iPSCs) into insulin-producing cells thus creates a crucial hurdle for the clinical implementation of human pluripotent stem cells (PSCs). In this study, we investigated the key factors for the differentiation of PSCs into insulin-producing cells. We obtained microarray data of HUES8 and HUES6 from two GeneChips (GPL3921: Affymetrix HT Human Genome U133A Array, GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array) in a database of GEO (NCBI), since HUES8 can differentiate into pancreatic cells, while HUES6 hardly demonstrates any differentiation at all. The genes with more than fourfold higher expressions in HUES8 compared to HUES6 included RPS4Y1, DDX3Y, EIF1AY, GREM1, GATA6, and NLGN4Y. Since there were four genes, RPS4Y1, DDX3Y, EIF1AY, and NLGN4Y, on the Y chromosome and HUES8 was a male cell line and HUES6 was a female cell line, we excluded these genes in this study. On the other hand, genes with more than fourfold higher expressions in HUES6 compared to HUES8 included NLRP2, EGR1, and SMC3. We next compared iPSCs derived from pancreatic cells (PiPSCs) and iPSCs derived from fibroblasts (FiPSCs). PiPSCs differentiated into insulin-producing cells more easily than FiPSCs because of their epigenetic memory. The gene expressions of GREM1, GATA6, NLRP2, EGR1, and SMC3 in PiPSCs and FiPSCs were also investigated. The expression level of GREM1 and GATA6 in PiPSCs were higher than in FiPSCs. On the other hand, EGR1, which was lower in HUES8 than in HUES6, was predictably lower in PiPSCs than FiPSCs, while NLRP2 and SMC3 were higher in PiPSCs than FiPSCs. These data suggest that

the expression of GATA6 and GREM1 and the inhibition of EGR1 may be important factors for the differentiation of PSCs into insulin-producing cells.

In this study, we investigated the role of EGR1 in pancreas development. Transfection of siRNA of EGR1 in early phase induced differentiation of iPSCs derived from fibroblast (FiPSCs) into pancreatic endoderm and insulin-producing cells. On the other hand, downregulation of EGR1 in late phase suppressed differentiation of FiPSCs into pancreatic endoderm and insulin-producing cells. Overexpression of EGR1 suppressed differentiation of iPSCs derived from pancreatic cells (PiPSCs) into pancreatic endoderm and insulin-producing cells. These data suggest that downregulation of EGR1 in early phase could efficiently induce differentiation of iPSCs into insulin-producing cells.

博士論文審査及び試験の結果の要旨

学位申請者

放送大学大学院文化科学研究科

文化科学専攻自然科学プログラム

氏名　津賀田　貴子

論文題目

Human ES/iPS 細胞から膵ベータ細胞に分化誘導するための有用な遺伝子についての検証

審査委員氏名

・主査（放送大学教授　博士（理学））　二河　成男

・副査（放送大学教授　博士（理学））　安池　智一

・副査（放送大学教授　博士（学術））　加藤　和弘

・副査（琉球大学大学院教授　博士（医学））野口　洋文

論文審査及び試験の結果

ヒト胚性幹(ES)細胞およびヒト人工多能性幹(iPS)細胞から種々の有用な分化細胞へと効率よく分化誘導する手法の開発は、再生医療や創薬といった応用面のみならず、基礎研究においても注目されている。問題点はいくつかあり、その一つが分化誘導効率の低さにある。申請者は本論文で、これらの細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導効率が最大７％程度という応用面に課題を残す現状に着目した。そして、インスリン分泌細胞への分化誘導効率に関わる遺伝子を同定することにより、その分化誘導効率の改善を目指した研究を行った。

まずは、ヒトES細胞株間での自発的な分化誘導時の膵臓細胞への分化誘導効率が異なる細胞株に着目し、それらの未分化状態でのマイクロアレイによる遺伝子発現データから、膵臓細胞への高い分化誘導効率を示すヒトES細胞株に特異的な発現パターンを示す遺伝子を5種類発見した。次にそれらの遺伝子が膵臓細胞への高い分化誘導効率を示す膵臓由来のヒト iPS 細胞でも同様の発現パターンを示すかを膵臓細胞への分化誘導効率の低い線維芽細胞由来のヒトiPS細胞と比較して検証した。その結果、GATA6、GREM1、EGR1では、ES細胞間の比較と同様の発現パターンを見出した。このことから、これらの遺伝子の発現がインスリン分泌細胞への分化誘導効率に何らかの影響を与えていることを強く示唆する結果を得た。

次にこれらのうち、EGR1 について線維芽細胞由来の iPS 細胞を用いて、その遺伝子発現がインスリン分泌細胞への分化誘導の効率を高めることを検証した。siRNA による EGR1 の発現抑制を行い、その後膵臓内胚葉への分化誘導を行ったところ、予想通り対照実験より膵臓細胞特異的遺伝子やインスリン分泌細胞特異的遺伝子の転写量が高くなることを示した。そして、EGR1 の mRNA 導入を行った膵臓細胞由来 iPS 細胞に対して分化誘導を行い、同様の測定を行ったところ、予想通りこれらの遺伝子の転写量は対照実験より低くなることを示した。これらの結果から、分化誘導初期の EGR1 の発現抑制が膵臓内胚葉およびインスリン分泌細胞への分化を促進し、逆に過剰発現が分化を抑制することを明らかにした。一方、siRNA による発現抑制後に膵臓内胚葉へ分化誘遵し、さらにその後に再度 siRNA による発現抑制を行ったところ、上記の特異的遺伝子の転写量が逆に減少することを示した。この結果から、EGR1 の発現抑制がインスリン分泌細胞への分化を促進する一方で、内胚葉細胞への分化後に EGR1 の発現抑制を行うと逆にインスリン分泌細胞への分化が抑制されることを明らかにした。このように、インスリン分泌細胞への分化の初期における EGR1 の発現抑制が iPS 細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導に効果的であることを見出した。

以上のように本論文は、iPS 細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導に EGR1 が関与することを初めて示したものであり、分化誘導効率が高い細胞株で特徴的な発現を示す遺伝子から侯補遺伝子を選別し、その分化誘導への効果を検証するというアプローチも斬新であり、学術的意義は極めて高い。よって、本論文は博士（学術）の学位論文としての評価基準を満たすものと判断した。また、平成 31 年 1 月 27 日、論文内容とそれに関連した事項について口頭拭問を行った結果、合格と認めた。