

論文の内容の要旨

論文題目「ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞における細胞表面分子の同定を通じた増殖機構の解明」

学位申請者 鶴谷 康太

キーワード：肝前駆細胞、ヒト iPS 細胞、細胞表面分子、パラクラインシグナル、フローサイトメトリー

【背景】肝不全に対する新たな細胞移植療法や創薬における肝毒性評価などに用いるソースとして、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS) 由来肝臓系細胞を生体外で効率的に増殖させる培養系が必要とされている。これまでに hiPS 細胞より分化誘導した CD13 (aminopeptidase N) と CD133 (Prominin 1) 両陽性細胞集団に、高増殖性と肝細胞・胆管系細胞への 2 方向分化能(bipotency)をもつ肝前駆細胞が濃縮されていることが明らかになっている。

【目的】hiPS 細胞由来 CD13⁺CD133⁺画分の細胞の全てが一様に肝前駆細胞としての性質をもつのかは未だ不明である。そこで、hiPS 由来 CD13⁺CD133⁺細胞の細胞表面分子に注目し、網羅的な細胞表面分子の探索を行い、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の性状解析と増殖機構の解明を目的とした。

【方法】hiPS 細胞を、サイトカインの連続添加 (Activin A、FGF、BMP および HGF) によって肝細胞系へと誘導した後に、CD13、CD133 に対する抗体と、様々な細胞表面分子に対する抗体 (116 種) をそれぞれ共染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。CD13⁺CD133⁺画分において不均一な発現を示す表面分子を用いて陽性集団と陰性集団へ分離し、フィーダー細胞上に播種した後 EGF、HGF 存在下でコロニー形成アッセイを行った。また、CD13⁺CD133⁺画分で強く発現する表面分子については、CD13⁺CD133⁺細胞の継代培養での発現変動を解析した。さらに、増殖に関与すると考えられる受容体に対するリガンドや特異的阻害剤・ブロッキング抗体を添加し、コロニー形成アッセイを行い増殖性の評価を行った。

【結果】hiPS 細胞由来 CD13⁺CD133⁺画分における表面抗原の網羅的発現解析では様々な分子は不均一な発現をしていた。陽性と陰性に分けうる 39 種の候補表面分子の発現の有無で CD13⁺CD133⁺細胞におけるコロニー形成能に明らかな変化は見られず、同程度の増殖能を有していた。また、CD13⁺CD133⁺画分において、強く発現する 20 種の細胞表面分子を同定した。これらの表面分子の中で、継代培養において CD221 と CD325 が発現低下した。継代後の

CD13⁺CD133⁺細胞において、CD221 陽性細胞は陰性細胞に比べ有意にコロニー形成能が高く、CD221 の発現を維持できる細胞が前駆細胞としての性質をより保持していると考えられた。また、CD221 に対するブロッキング抗体や特異的阻害剤の添加で増殖抑制がみられた。フィーダー細胞として用いているマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) ではリガンドである IGF-1、IGF-2 の遺伝子発現が認められた。

さらに、CD13⁺CD133⁺細胞において、CD340 (erbB2) が強く発現しており、特異的阻害剤の添加で増殖抑制がみられ、NRG1 の添加でコロニー形成能の増加が認められた。また、CD13⁺CD133⁺細胞において、CD266 (Fn14) が強く発現しており、CD266 に対するブロッキング抗体にて増殖抑制が観られた。フィーダー細胞として用いている MEF ではリガンドである TWEAK の遺伝子発現が認められた。

【考察】 ヒト iPS 由来 CD13⁺CD133⁺肝前駆細胞において IGF-1R、EGFR、erbB2、Fn14 が強く発現し、細胞増殖に関与していることが分かった。また、フィーダー細胞である MEF より供給されない EGF や NRG1 の添加が増殖に重要であること、さらに MEF より供給される TWEAK、IGF がパラクリン因子として増殖に寄与していると考えられた。

【結論】 ヒト iPS 由来 CD13⁺CD133⁺肝前駆細胞の細胞表面分子の発現プロファイルを明らかにした。さらに、高発現する EGFR、ErbB2 や Fn14、IGF-1 受容体を介したシグナルが肝前駆細胞の機能維持に重要であると考えられた。