



Retinoic acid receptor γ activation promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into esophageal epithelium

Koterazawa, Yasufumi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2020-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7856号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007856>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Retinoic acid receptor γ activation promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into esophageal epithelium

レチノイン酸レセプター γ の活性化はヒト iPS 細胞から
食道上皮への分化を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
(指導教員：掛地 吉弘 教授)

小寺澤 康文

【背景】

食道は前腸由来の臓器である。しかし、この前腸から食道の分化に関わる分子メカニズムは不明な点が多い。これまで食道の発生に関する多くの研究はマウスを用いて行われてきたが、マウスとヒトでは、扁平・円柱上皮境界の位置が違うこと、またマウスの食道上皮の表層は角化しているが、ヒトでは非角化であるなど解剖学的に異なる点も多く、マウスで得られた知見がヒトに外挿できるかは不明である。

近年、ヒトの Induced pluripotent stem cell (ヒト iPS 細胞) から特定の細胞へ分化誘導を行い、その発生や疾患のメカニズムを解明する研究が盛んに行われている。ヒト iPS 細胞を用いて食道への分化誘導方法を確立することは、そのメカニズムに関わる因子を解明する上でも有効であると考えられる。

これまでのヒト iPS 細胞を用いた研究でレチノイン酸 (RA) シグナルが前腸から肺や胃への分化を促進することが報告されている。一方で、前腸から食道の分化における ATRA の効果は明らかではない。

【目的】

ヒト iPS 細胞を用いて食道上皮への分化誘導のプロトコルを確立し、ATRA がその分化を促進するか明らかにする。

【方法】

食道上皮への分化誘導を内胚葉 (Day3)、前腸 (Day6)、背側化前方前腸 (Day13)、食道上皮 (Day21) の 4 つのステップに分けて、ヒト iPS 細胞株を用いて分化誘導方法を構築した。つぎに、レチノイン酸レセプター (RAR) α 、 β 、 γ のアゴニストである All-trans-レチノイン酸 (all-trans-retinoic acid: ATRA) を前腸 (Day6) に投与することによって食道上皮への分化誘導が促進するか、RNA シークエンスにて評価を行った。最後に、ATRA は RAR α 、 β 、 γ において、どのレセプターを介して分化を促進するか、それぞれのアゴニスト、アンタゴニストを用いて RT-PCR で評価を行った。

【結果】

まず、食道上皮への分化プロトコルを確立した。各分化ステップにおいてマーカー遺伝子の発現 (内胚葉: FOXA2、前腸: SOX2、FOXA2、背側化前方前腸: SOX2、P63、食道上皮: SOX2、PAX9、CK13、P63、CK5) を RT-PCR と免疫染色にて確認した。この iPS 細胞由来の食道上皮は、ルゴール染色で陽性であった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色で重層化していることが確認され、免疫染色にて細胞接着分子である E-cadherin や Claudin4 の発現も認めた。これらの結果から、重層扁平上皮によって構成される食道上皮への分化が確認できた。

次に、ATRA の有無によって食道上皮への分化が促進するか検討を行った。まず、前腸 (Day6) から背側化前方前腸 (Day13) まで、ATRA の投与によって背側化前方前腸への分化が促進するか RT-PCR にて検討したところ、ATRA の投与によって背側化前方前腸のマーカーである SOX2、P63 の発現が有意に上昇した。次に、前腸 (Day6) から食道上皮

(Day21) まで ATRA の投与において食道上皮への分化が促進するか、RNA シークエンスで評価をしたところ、ATRA によって、食道の特異的マーカーの発現 (MAL、DSG3、ERO1A、CK13、SPRR1B、CK4、HMGN4 など) が上昇した。これらの結果によって ATRA は、食道の分化を促進することが明らかになった。

最後に、前腸 (Day6) 以降に RAR α 、 β 、 γ のアゴニストを投与し食道上皮 (Day21) の分化が促進するか RT-PCR にて評価した。RAR γ アゴニストを用いたところ、ATRA と同様に食道マーカー (CK13、S100A14) の発現が有意に上昇した。一方で、RAR α と β アゴニストを用いてもこれらの上昇は認めなかった。さらに、ATRA と RAR γ アンタゴニストを同時に投与すると、ATRA によって得られていたこれらのマーカーの発現は上昇しなかった。これらの結果によって、ATRA は RAR γ を介して食道分化を促進することが明らかになった。

【考察】

本研究によって、ヒト食道上皮モデルの確立が可能となった。現時点での iPS 由来の食道は未熟であり、食道前駆細胞の採取や培養期間の検討など、成熟化のためにさらなる検討が必要である。また、食道上皮への分化に ATRA が重要な役割をもっており、さらにその作用は RAR γ を介して行われることが明らかとなった。このモデルを用いてさらなる分化や疾患のメカニズムの解明につながることを期待される。

【結語】

RAR γ の活性化はヒト iPS 細胞由来の前腸から食道への分化誘導を促進する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2987 号	氏 名	小寺澤 康文
論文題目 Title of Dissertation	Retinoic acid receptor γ activation promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into esophageal epithelium レチノイン酸レセプター γ の活性化はヒト iPS 細胞から食道上皮への分化を促進する		
審査委員 Examiner	主 査 福 本 巧 Chief Examiner 副 査 岡 本 裕 三 Vice-examiner 副 査 横 崎 亮 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

【背景】

食道は前腸由来の臓器である。しかし、この前腸から食道の分化に関わる分子メカニズムは不明な点が多い。これまで食道の発生に関する多くの研究はマウスを用いて行われてきたが、マウスとヒトでは、扁平・円柱上皮境界の位置が違うこと、またマウスの食道上皮の表層は角化しているが、ヒトでは非角化であるなど解剖学的に異なる点も多く、マウスで得られた知見がヒトに外挿できるかは不明である。

近年、ヒト Induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) から特定の細胞へ分化誘導を行い、その発生や疾患のメカニズムを解明する研究が盛んに行われている。ヒト iPS 細胞を用いて食道への分化誘導方法を確立することは、そのメカニズムに関わる因子を解明する上でも有効であると考えられる。

これまでのヒト iPS 細胞を用いた研究で All trans レチノイン酸 (ATRA) シグナルが前腸から肺や胃への分化を促進することが報告されている。一方で、前腸から食道の分化における ATRA の効果は明らかではない。

【目的】

ヒト iPS 細胞を用いて食道上皮への分化誘導のプロトコルを確立し、ATRA がその分化を促進するか明らかにする。

【方法】

食道上皮への分化誘導を内胚葉 (Day3)、前腸 (Day6)、背側化前方前腸 (Day13)、食道上皮 (Day21) の4つのステップに分けて、ヒト iPS 細胞株を用いて分化誘導方法を構築した。つぎに、レチノイン酸レセプター (RAR) α 、 β 、 γ のアゴニストである ATRA を前腸 (Day6) に投与することによって食道上皮への分化誘導が促進するか、RNA シークエンスにて評価を行った。最後に、ATRA は RAR α 、 β 、 γ において、どのレセプターを介して分化を促進するか、それぞれのアゴニスト、アンタゴニストを用いて RT-PCR で評価を行った。

【結果】

まず、食道上皮への分化プロトコルを確立した。各分化ステップにおいてマーカー遺伝子の発現 (内胚葉: FOXA2、前腸: SOX2、FOXA2、背側化前方前腸: SOX2、P63、食道上皮: SOX2、PAX9、CK13、P63、CK5) を RT-PCR と免疫染色にて確認した。この iPS 細胞由来の食道上皮は、ルゴール染色で陽性であった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色で重層化していることが確認され、免疫染色にて細胞接着分子である E-cadherin や Claudin4 の発現も認めた。これらの結果から、重層扁平上皮によって構成される食道上皮への分化が確認できた。

次に、ATRAの有無によって食道上皮への分化が促進するか検討を行った。まず、前腸（Day6）から背側化前方前腸（Day13）まで、ATRAの投与によって背側化前方前腸への分化が促進するかRT-PCRにて検討したところ、ATRAの投与によって背側化前方前腸のマーカーであるSOX2、P63の発現が有意に上昇した。次に、前腸（Day6）から食道上皮（Day21）までATRAの投与において食道上皮への分化が促進するか、RNAシーケンスで評価をしたところ、ATRAによって、食道の特異的マーカーの発現（MAL、DSG3、ERO1A、CK13、SPRR1B、CK4、HMGN4など）が上昇した。これらの結果によってATRAは、食道の分化を促進することが明らかになった。

最後に、前腸（Day6）以降にRAR α 、 β 、 γ のアゴニストを投与し食道上皮（Day21）の分化が促進するかRT-PCRにて評価した。RAR γ アゴニストを用いたところ、ATRAと同様に食道マーカー（CK13、S100A14）の発現が有意に上昇した。一方で、RAR α と β アゴニストを用いてもこれらの上昇は認めなかった。さらに、ATRAとRAR γ アンタゴニストを同時に投与すると、ATRAによって得られていたこれらのマーカーの発現は上昇しなかった。これらの結果によって、ATRAはRAR γ を介して食道分化を促進することが明らかになった。

【考察】

本研究によって、ヒト食道上皮モデルの確立が可能となった。現時点でのiPS由来の食道は未熟であり、食道前駆細胞の採取や培養期間の検討など、成熟化のためにさらなる検討が必要である。また、食道上皮への分化にATRAが重要な役割をもっており、さらにその作用はRAR γ を介して行われることが明らかとなった。このモデルを用いてさらなる分化や疾患のメカニズムの解明につながることを期待される。

【結語】

RAR γ の活性化はヒトiPS細胞由来の前腸から食道への分化誘導を促進する。

本研究は、食道の発生について、その分化のメカニズムを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったiPS細胞を用いてヒトの食道の分化について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。