

## 様式 4 (公表用)

氏名	依田 聖未
博士の専攻分野の名称	博士 (生命工学)
学位記番号	医工農甲 第69号
学位授与年月日	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	GSK-3 阻害剤 (CHIR99021) がヒト iPS 細胞に及ぼす影響の 解明と増殖分化制御のための同剤の適用条件の最適化
論文審査委員	主査 教授 黒澤 尋 教授 岸上 哲士 教授 若山 照彦 教授 幸田 尚 准教授 升井 伸治

## 学位論文内容の要旨

Wnt シグナルの活性化は、多能性幹細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導の両方で重要な役割を果たしている。Wnt シグナルを活性化させる Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) 阻害剤の一つである CHIR99021 (CHIR) は、体細胞の初期化から特定組織細胞への分化誘導に至るまで様々な用途で使用されている。CHIR が多能性幹細胞へ及ぼす影響は、細胞増殖や分化といった発生段階、及び浮遊培養か接着培養かといった培養方法の違いに起因する細胞形態によって異なる。したがって、ヒト iPS 細胞の培養目的が、細胞増殖なのか、分化誘導なのかによって、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR 処理条件を最適化する必要がある。以上のことから、本研究では、ヒト iPS 細胞の未分化増殖および心筋細胞分化における CHIR 処理条件の最適化を行った。

### 第 1 章 接着培養条件下での CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖と分化へ及ぼす影響

本論文第 1 章では、ヒト iPS 細胞の維持培養 (接着単層培養) における CHIR 処理条件が、ヒト iPS 細胞の多能性と増殖性にどのように影響を及ぼすのかを検討した結果が述べられ、考察が行われている。

様々な CHIR 処理条件下でのヒト iPS 細胞の多能性と増殖性を評価し、さらに未分化維持

## 様式 4 (公表用)

と細胞増殖促進が両立する CHIR 処理条件の最適化を行った。ヒト iPS 細胞の維持培養は、4 日間の接着培養のルーティンであるが、この培養期間の後半 2 日間を 1  $\mu\text{M}$  CHIR 共存下で培養 (CHIR 処理) すると、ヒト iPS 細胞は未分化性を維持したまま細胞増殖が促進され、正常なコロニーを形成することがわかった。この CHIR 処理条件では、10 継代にわたる連続処理を行っても、その細胞増殖促進効果は継続された。CHIR 濃度を 3  $\mu\text{M}$  に高めた場合、ヒト iPS 細胞は、未分化マーカー遺伝子の発現を維持しつつも、中胚葉分化を起こすことが明らかになった。また、3  $\mu\text{M}$  CHIR で維持培養の全期間を処理した場合、細胞増殖促進効果は得られたが、ヒト iPS 細胞は未分化状態から逸脱することがわかった。10  $\mu\text{M}$  CHIR 処理では、CHIR による細胞増殖促進効果は得られず、ヒト iPS 細胞の未分化性は消退し、中胚葉分化が促進された。このことから、「培養後半 2 日間 3  $\mu\text{M}$  CHIR 添加」は、ヒト iPS 細胞の未分化維持と中胚葉分化促進の境界となる CHIR 処理条件であると考えられる。よって、未分化性を維持したままヒト iPS 細胞の増殖を促進する最適な CHIR 処理条件は、4 日間の維持培養のうちの「後半 2 日間 1  $\mu\text{M}$  CHIR 添加」であるといえる。また、ヒト iPS 細胞の維持培養 (接着培養) を高濃度 CHIR 共存下で行うと、中胚葉分化が促進されることが明らかにされた。

本研究では、次に、高濃度 CHIR が中胚葉分化を促進する現象を利用して、ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化を効率化することを試みた。すなわち、心筋分化誘導の前培養において CHIR 処理を実施することで、中胚葉へ傾倒したヒト iPS 細胞が作出され、その結果、iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導するのに要する期間が短縮できると考えた。

CHIR 共存下で前培養 (接着培養) を行ったヒト iPS 細胞を用いて心筋細胞分化誘導プロトコルを実施したところ、3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理したときに拍動性心筋細胞が発生した。3  $\mu\text{M}$  CHIR 共存下で前培養すると iPS 細胞の中胚葉分化マーカーの遺伝子発現レベルは有意に上昇したが、未分化マーカー遺伝子の発現レベルは維持されていた。前培養時の CHIR 処理濃度を 10  $\mu\text{M}$  にすると、未分化マーカー遺伝子の発現レベルが減少し、拍動性心筋細胞の発生はみられなかった。このことは、中胚葉分化段階における未分化マーカー遺伝子発現の消退は、心筋細胞分化誘導促進の観点からは望ましくないといえる。以上のことから、心筋細胞分化誘導プロトコルの中胚葉・心筋中胚葉分化段階に相応しい CHIR 処理条件は、4 日間の前培養のうちの「後半 2 日間 3  $\mu\text{M}$  CHIR 添加」であることが明らかにされた。

## 第 2 章 浮遊培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における胚様体形成期間中の CHIR99021 処理条件の最適化

第 1 章で述べた検討により、一定濃度以上の CHIR 存在下で形成された胚様体では、中胚

葉分化マーカー遺伝子の発現レベルが上昇する傾向がみられた。よって、第 2 章では、胚様体形成期間中の CHIR 処理により、心筋細胞を分化誘導するのに有利な「中胚葉へ傾倒した胚様体」を作出することを試みた。

4 日間の胚様体形成期間のうち、期間後半の 2 日間に 4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加して得られた胚様体は、中胚葉分化マーカー遺伝子の発現レベルが高く、かつ未分化マーカー遺伝子の発現レベルを維持していた。この「中胚葉へ傾倒した胚様体」から心筋細胞を分化誘導したところ、拍動性心筋細胞が発生した。CHIR 処理期間を 1 日間または 4 日間とした場合、処理濃度にかかわらず胚様体の中胚葉への傾倒度合いは低く、後半 2 日間の 4  $\mu\text{M}$  CHIR 処理で得られるレベルには及ばなかった。また、CHIR 処理を胚様体形成後に行ったところ、CHIR の作用は、胚様体形成期間中に行うのと比較して抑制された。胚様体の三次元構造が障害となつて、CHIR が細胞に到達しにくくなることが、中胚葉分化促進効果を抑制する一因ではないかと考えられる。よって、胚様体のような細胞塊を形成する細胞分化プロセスでは、細胞が凝集塊を形成する前に CHIR 処理を行う方が効率的である。以上のことから、心筋細胞へ分化する「中胚葉へ傾倒した胚様体」を作出するための最適な CHIR 処理条件は、4 日間の胚様体形成期間において、「後半 2 日間の 4  $\mu\text{M}$  CHIR 処理」であることが明らかにされた。

## 論文審査結果の要旨

本論文「GSK-3 阻害剤 (CHIR99021) がヒト iPS 細胞に及ぼす影響の解明と増殖分化制御のための同剤の適用条件の最適化」は、統合応用生命科学専攻のディプロマポリシーに基づき、主査 1 名、副査 4 名からなる論文審査委員会において審査を行った。

論文審査委員会は、学位論文公聴会及び最終試験において、課程博士の学位申請者 (以下、課程申請者) が提出した学位論文の内容について詳細な質疑を行い、課程申請者の学識、研究の学術的意義・新規性、研究の実施状況、学位論文の論理性等を厳正に評価した。

### 1. 学術的意義・新規性

ヒト iPS 細胞は、再生医療や創薬研究などの様々な分野への応用が期待されている。iPS 細胞由来の再生医療の産業化には、iPS 細胞を大量生産する必要がある。例えば、心疾患を治療するには患者 1 人当たり 10~30 億個の心筋細胞が必要であると言われている。一般的な接着培養システムにおいて、10 cm dish 1 枚あたり約数百万個の細胞を獲得できると考えた場合、10 cm dish 1,000 枚以上のスケールでの培養が必要となる。本研究では、1 培養器あたりの細胞収量を上げることで、ヒト iPS 細胞の細胞収量を増大させること、さらには、心筋細胞への分化誘導効率を高めることを目的とした研究である。その手段として、

## 様式4（公表用）

Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路において、Wnt シグナル活性化の役割を果たす Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)阻害剤である CHIR99021 (CHIR) に着目した。CHIR は、体細胞の初期化、多能性維持、細胞増殖促進や特定組織細胞への分化誘導など様々な用途で用いられている。しかし、これまで、ヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、CHIR の処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR 処理条件を最適化する試みはこれまでなされていない。ゆえに本研究は学術的に意義深く、新規性があると認められる。

### 2. 論文の論理性

論文の構成が適切かつ体系的であり、記述に論理の一貫性が保たれており、学位論文の研究目的と結論に整合性がある。緒言において、研究の背景、当該分野の研究の現状と問題点・課題、学位論文の研究目的と学術的意義が明確に記述されている。

結果において、ヒト iPS 細胞の未分化性を維持しつつ増殖性を促進する CHIR 処理条件を明らかにしている。すなわち、4 日間培養のうちの後半 2 日間に 1  $\mu$ M CHIR を添加することにより、従来法と比較して一度の処理で生細胞数を 1.5 倍程度増加させ、10 継代にわたる連続処理でもその細胞増殖促進効果を継続できることを明らかにした。さらには、4 日間の接着培養のうちの後半 2 日間に 3  $\mu$ M CHIR 処理を行うと、心筋細胞分化に向けた中胚葉分化を促進できることを明らかにした。

これらの結果を得るために適切な実験が計画・実施され、得られた実験データの分析・解釈は科学的に適切になされている。考察も論理的に記述されている。

### 3. 研究倫理

本研究は、国の倫理指針の対象となる研究については、該当する指針に基づいて実施されている。本研究で使用したヒト iPS 細胞は、すでに樹立された株を理化学研究所バイオリソースセンターより所定の手続きを経て分譲を受けたものである。

### 4. 審査の総括

本論文は、再生医療への応用が期待されるヒト iPS 細胞の未分化増殖および心筋細胞分化を効率的に行うため、GSK-3 阻害剤の一つである CHIR99021 によるヒト iPS 細胞の処理条件の最適化を行ったものである。その研究成果は、査読付き学術英文誌に課程申請者が第一著者の原著論文（2 報）として発表されている。さらに、課程申請者は、学位論文公聴会及び最終試験において、審査員からの質問に対して的確に回答していることから、課程申請者は、統合応用生命科学専攻のディプロマポリシーを達成したものと評価する。

以上のことから、本論文は博士（生命工学）の学位論文として適格と認め、学位論文審査及び最終試験について合格と判定した。