

羊膜上皮細胞から様々な細胞種への分化誘導に関する研究

太向勇¹⁾, 野本正幸²⁾, 九鬼直人³⁾, 加賀三鈴¹⁾, 高野智圭⁴⁾, 三木敏生¹⁾

Induction of various cell types from amniotic epithelial cells

Isamu TAIKO¹⁾, Masayuki NOMOTO²⁾, Naoto KUKI³⁾,
Millei KAGA¹⁾, Chika TAKANO⁴⁾, Toshio MIKI¹⁾

要旨

In vitro differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) into desired cell types is a promising tool for regenerative medicine to treat damaged organ or tissue cells. However, because of the difficulty to obtain the hPSCs and the differentiation methods, it has been still under development. Here, we report a method to utilize human amniotic epithelial cells (hAECs) a type of placental stem cell that possess pluripotent stem cell-like differentiation potential, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties and are therefore considered to have prospects for cell-based therapy. We differentiated hAECs into tree cell types including alveolar type II (ATII) cells, hepatocytes and pancreatic β -cells through direct cell reprogramming strategy. We successfully induced each cell type marker gene. Moreover, global gene expression analysis by using RNA-sequencing revealed that differentiated ATII like cells expressed many of Respiratory gaseous exchange by respiratory system associated genes. Our results indicated the potential of hAECs in regenerative medicine.

1. はじめに

人体における組織レベルでの細胞の損傷は治療が困難であり、究極的には細胞移植以外に方法はない。しかしながら、組織のドナーは偶発的に発生した脳死患者等のごく限られた状況下でしか得られず、レシピエントに比べて圧倒的に不足している。このような中で近年再生医学の発展に伴い、iPS細胞など多能性幹細胞から様々な細胞種ひいては組織を作出することが試みられている。しかしながら、iPS細胞を始めとして各種の多能性幹細胞の作出には多大な労力を要したり、倫理的な問題が伴ったりするために十分な細胞数を確保することが難しい。また、特定の細胞種に分化誘導を行う方法として、

各組織の系統発生の段階を様々な成長因子や小分子化合物によって再現することで行われている。この種のアプローチは一定の成功をおさめてはいるものの、長期間にわたる複雑な細胞培養プロセスを必要とするなど、依然として課題は多い。これらのことから、現在広く使われている多能性幹細胞を用いて特定の細胞種を治療に応用できるほどに量産するのは難しく、簡便かつ大量に入手することが可能な多能性細胞と、その細胞からのより簡便な分化誘導法の開発が求められている。

今後の活用が有望視されている多能性細胞として、胎盤から簡便かつ大量に採取することが可能な胎盤由来の幹細胞である羊膜上皮細胞が近年注目さ

1) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野
2) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野
3) 日本大学医学部外科学系小児外科学分野
4) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
太向勇: taiko.isamu@nihon-u.ac.jp

れている(図1)^{1), 2)}。羊膜上皮細胞は比較的未分化な細胞であり、様々な細胞へと分化する能力を持っている。ヒトの羊膜上皮細胞(hAECs)は本来廃棄される胎盤を1時間程度トリプシンで処理するという極めて簡便な方法で一度に大量に採取することが可能であり、他の多能性細胞のように複雑なプログラミング手順を必要とせず特殊な培養も必要としない。また、ES細胞のように受精卵を破壊することが無いため倫理的な問題は少なく、非侵襲的な方法で得ることができる。また、胎児由来であることから、ゲノムDNAへのダメージの蓄積はほとんどない。さらには腫瘍形成能がないことに加えて免疫回避能力も有している。これらの性質から、今後細胞再生治療への応用が期待される。しかしながら、これらの性質が明らかにされてから間もないために研究は進んでいない。

本研究では羊膜上皮細胞から①肺胞上皮細胞②肝細胞③膵β細胞への分化誘導を目指して研究を行った。①肺胞上皮細胞は感染症やCOPD、特発性肺線維症等により欠損し、軽度の損傷であれば自律的に回復する。損傷が重度である場合は移植する以外の根本的な治療法はないが、移植するに足る細胞数を確保するのが難しく、実現に至っていない。②肝臓は肝硬変や劇性肝炎、肝細胞癌等様々な肝臓の疾患で生体肝移植が適用されているが、ドナーの負担は

相当に重く、代替的な手段が求められている。中でも細胞移植治療として多能性幹細胞からの肝細胞の分化誘導は有望な選択肢の一つとして盛んに研究が行われている。③β細胞は血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンを分泌し、血糖値の調節に必須の細胞である。インスリンの分泌不全は糖尿病の原因となる。機能を回復させるために移植治療も行われているが、やはり圧倒的にドナーは足りない³⁾。これらの細胞種への分化誘導をより簡便な方法で行うために、転写因子の導入によるダイレクトリプログラミング法を用いた⁴⁾。この方法であれば、抗腫瘍原性や、免疫回避能等のhAECsとしての移植治療に有用な性質を残したまま目的の細胞の性質を保持させることが期待できる。本研究では、hAECsから上記の細胞種への分化誘導に最適な転写因子の探索を行い、更には分化誘導を行った細胞の遺伝子発現を調べることで実際に目的とする細胞種に特有の遺伝子発現が見られるかを解析した。

2. 対象及び方法

2.1. 羊膜上皮細胞の単離

hAECsは胎盤から剥離した羊膜上皮細胞をPBSにより洗浄し、30分間のトリプシン処理を2回することで単離した。単離したhAECsはクライオバイアルに分注後液体窒素中で保存し、各種分化誘導実験に使用した。

2.2. プラスミド作製

NKX2-1cDNA及びSFTPCプロモーター配列はAddgeneより入手した(49989, 126689)。HNF3G(FOXA3)及びMAFAは人工遺伝子合成により入手した。その他の転写因子のcDNAはダナフォームより購入した。いずれもpLenti6ベクター(Invitrogen)にクローニングすることで本実験に使用した。

レンチウイルスの作製

レンチウイルスはHEK293T細胞に目的遺伝子を保持したレンチウイルスベクターとpsPAX2及びpMD.2G(Addgene12260及び12259)をそれぞれ2:2:1の割合でポリエチレンイミン(Polysciences)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後16時間で培地を交換し、交換後48時間で培地を回収してウイルス液とした。回収したウイルス液はqPCR Lentivirus Titer Kit (Applied Biologi-

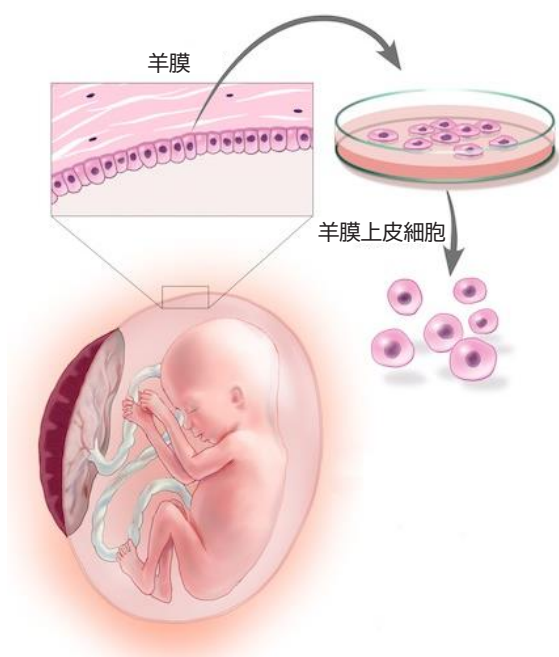


図1 羊膜上皮細胞の採取

表1 qPCRに用いたprimer配列

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	ACGGGAAGCTTGTGCATCAAT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
SFTPC	CCGCAGTGCCTACGTCTAAG	AGATGTAGTAGAGCGGCACCT
NKX2-1-UTR	GCTGGGGAGAGGAAAGAGTC	GGGCACTTCCTTTGTGTGTCAG
SERPINA1(A1AT)	TGGGCATCACTAAGGTCTTCAG	CAGCTTCAGTCCCTTTCTCGT
INS	ACGAGGCTTCTTCTACACACCC	TCCACAATGCCACGCTTCTGCA

cal Materials) で力価を計測し、hAECsにはMOI15-30となるように感染させた⁵⁾。

2.3. 細胞培養

ヒト羊膜上皮細胞はDMEM (Gibco) に10% FBS (ニチレイ), 200 μ M L-Glutamine, 1 \times 非必須アミノ酸, 1 \times Antibiotic-Antimycotic, 55 μ M 2-mercaptoetanol (いずれも Gibco), 5ng/ml EGF (peprotech) を加えた培地で培養した。HEK293T細胞はコラーゲンコートした培養皿状でDMEM (和光純薬) に10% FBS, 2 mM L-Glutamine, ペニシリンストレプトマイシンを加えた培地中で培養した。いずれの細胞も37°C, 5% CO₂で培養した。

2.4. 分化誘導

1) 肺胞上皮細胞

単離直後に凍結保存されたhAECsを融解後14日間培養した後でSFTPC-GFPを細胞に導入し、さらに2日間培養後10cm dishに再播種した。SB-431542 (10 μ M) を加えた培地で2日培養した後、NKX2-2を導入した。その後IMDMにFBS, L-Glutamine, KGF, FGF10 (いずれも10 ng/ml, peprotech), CHIR99021 (10 μ M, ナカライテスク) を加えた培地で14日間培養後、各種実験に用いた。

2) 肝細胞及び膵 β 細胞

凍結融解後14日間培養したhAECsにそれぞれの転写因子を導入し、さらに10日間培養した後細胞を回収し、各種実験に用いた。いずれも培養はhAECsの培地で行った。培地に添加した試薬はそれぞれ、以下の濃度で使用した。SB-431542 (10 μ M), ALK5 Inhibitor II (10 μ M), LDN-193189 (1 μ M), T3 (3 μ M) (いずれもシグマアルドリッチ)

3) RT-qPCR

細胞は回収後NucleoSpin RNA (タカラバイオ) で

RNAを回収し、ReverTra Ace (東洋紡) で逆転写反応を行った後PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quantabio) により、LightCycler 480 (Roche) でqPCRを行った。内在性コントロールにはGAPDHを用いた。用いたPrimer配列は表1にまとめた。

4) Transcriptome解析

Transcriptome解析はSTARソフトウェアを用いてマッピングし、Rソフトウェアの Feature Counts ツールでリードカウントを計測した。Differentially expressed geneはDeseqソフトウェアを用いて算出した。主成分分析, Volcano plotの作図はRを用いた。ヒートマップはHeatmapperを用いて作成した。

3. 結果

3.1. II型肺胞上皮細胞への分化誘導

肺胞上皮細胞にはI型とII型が存在し、II型肺胞上皮細胞が前駆細胞としての機能を持つことが知られており、II型細胞を再生させることでI型細胞の再生も期待できる。II型肺胞上皮細胞の性質及び個性を決定する転写因子として肺及び甲状腺に特異的に発現しているNKX2-1がマスターレギュレータとして知られている⁶⁾。本研究ではNKX2-1をレンチウイルスによって羊膜上皮細胞に導入することでII型肺胞上皮細胞の分化誘導を試みた。先行研究によりiPS細胞から胚体内胚葉細胞への分化を経てII型肺胞上皮細胞へと分化誘導を行う方法がいくつか報告されている⁷⁾。これらの報告では、TGF β シグナリングの抑制及び、KGF, FGF11のシグナルがII型肺胞上皮細胞への分化誘導効率を高めることが報告されている。これらのことから、NKX2-1の導入による分化誘導効率を高めることを目的としてTGF β 受容体 (ALK5) の阻害薬であるSB-431542に加え、FGF10, KGFを併用した。また、肺胞上皮細胞への分化の簡便な検出のために、II型肺胞上皮に特異的

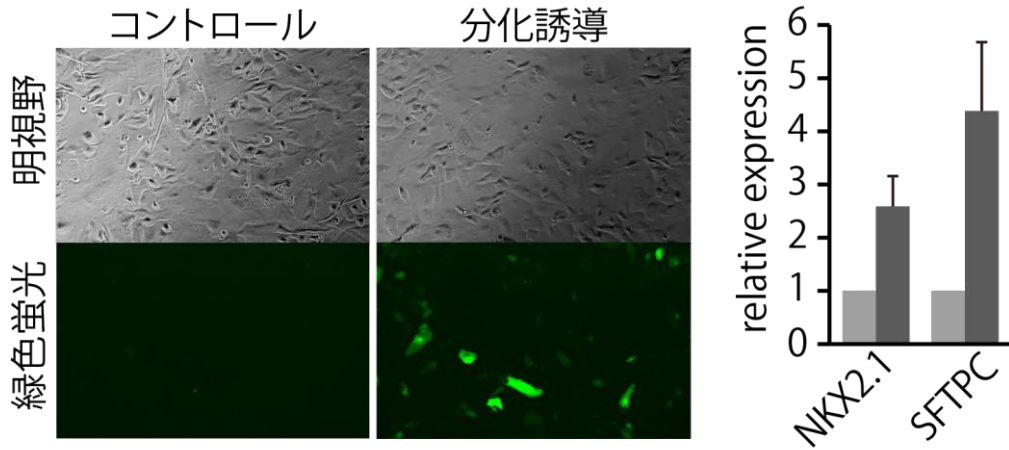


図2 SFTPCの発現の確認

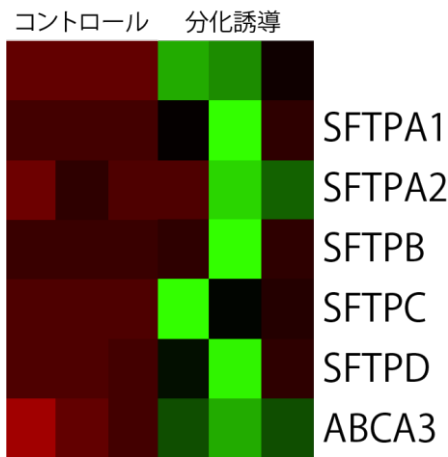


図3 分化誘導による遺伝子発現の変化

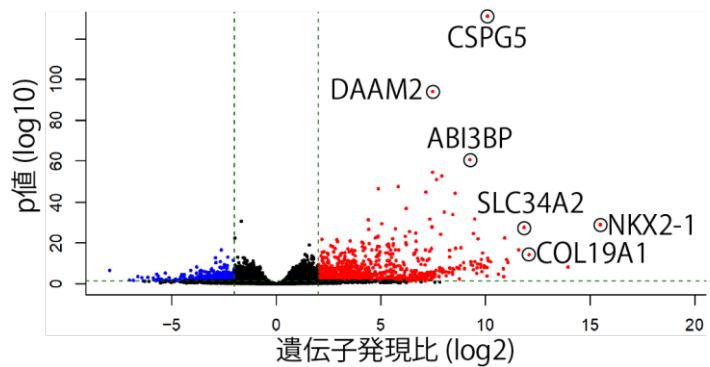


図4 分化誘導群における遺伝子発現の変化

なマーカーであるSFTPC (肺サーファクタントプロテインC) 遺伝子のプロモーター依存的にGFPを発現するレポーターを用いた。これによって細胞からRNAを抽出することなく、GFPの蛍光を指標としてII型肺胞上皮細胞への分化を経時的に検出することが可能となる。hAECsを10日間培養し、十分な細胞数まで増殖させた後、SB-431542によりTGFβシグナリングを抑制した状態でNKX2-1を導入した。導入後5日目でGFPの蛍光が検出されはじめ、2週間後で蛍光はプラトーに達した (図2)。実際にII型肺胞上皮マーカーのSFTPC遺伝子が発現しているかどうかを確認するために、NKX2-1を導入してから2週間培養した細胞を回収し、RT-qPCRによりmRNA量を確認したところNKX2-1を導入しなかった細胞に比べて約4.4倍上昇していた。(図2) さら

には、強制発現させたNKX2-1 (ORF, タンパク質コード領域) には含まれない3'UTR (非コード領域) の配列を標的としたプライマーセットを用いて内在性のNKX2-1の発現を確認したところ、予期せぬことに、コントロールと比べて2.6倍の発現上昇が見られた (図2)。

本法を用いた分化誘導によるより広範な遺伝子の発現の変化を確認するために、グローバルな遺伝子発現プロファイルの変化をRNA-sequencingによるトランスクリプトーム解析によって確認した。遺伝子発現プロファイルの比較では期待通り、SFTPC以外の肺サーファクタントプロテインに加え、その分泌を担うトランスポータータンパク質であるABCA3の発現も上昇していた (図3)。Gene ontology解析では分化誘導を行った細胞では、肺胞での

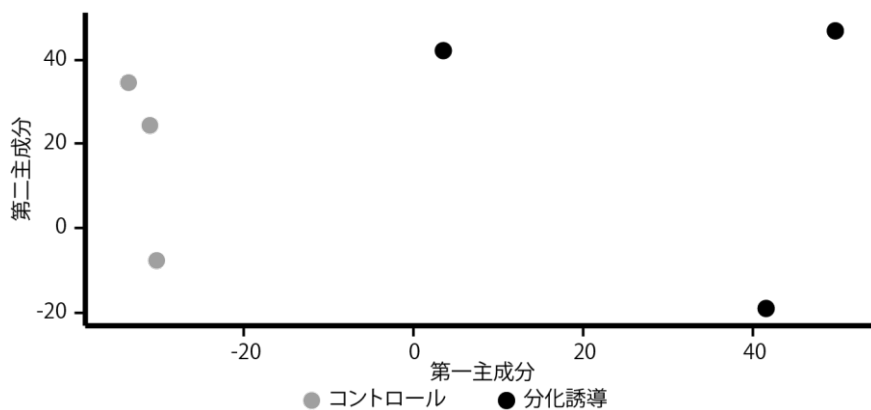


図5 遺伝子発現変化の主成分分析

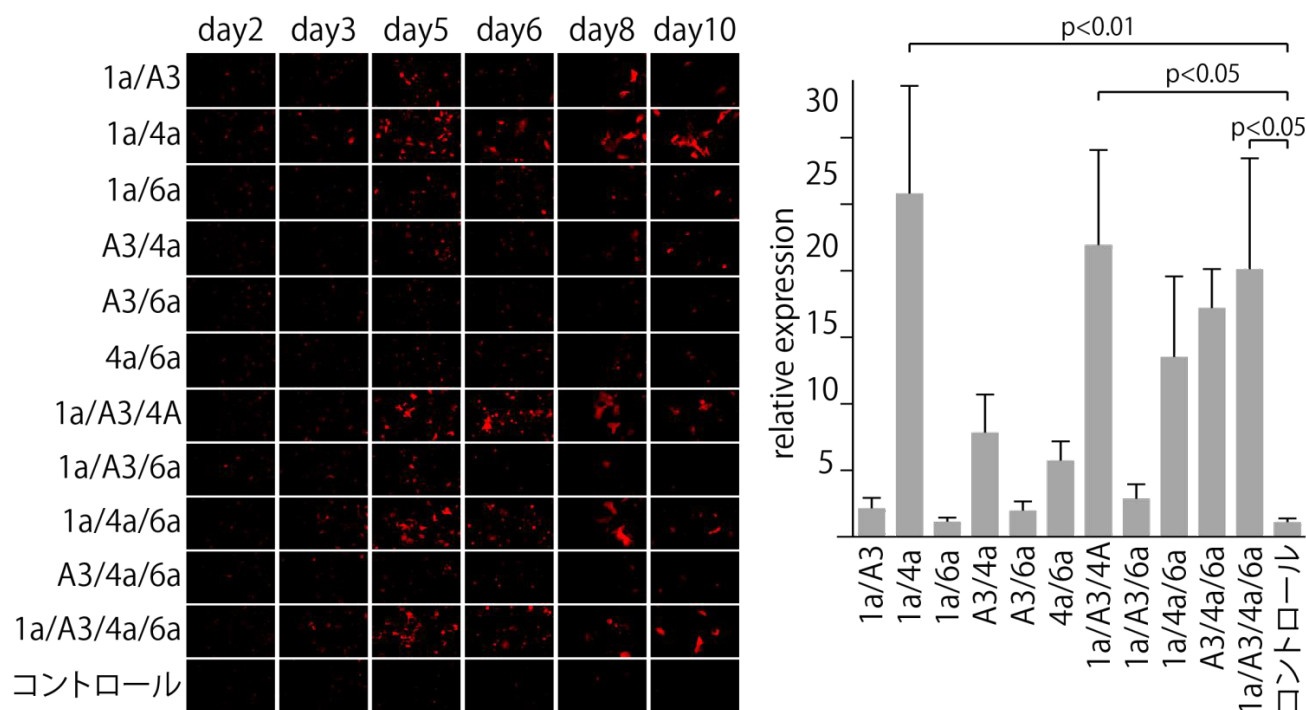


図6 レポーター遺伝子発現の経時変化とAAT1の発現

ガス交換に関連する遺伝子群の発現が亢進しており、逆に広範な免疫反応関連の遺伝子群の発現は低下していた(表2)。ヒト肺胞上皮細胞との遺伝子発現プロファイルを比較したところ、肺胞でのガス交換に関連する遺伝子群の上昇という点では類似していたが、hAECsでも発現が見られる上皮系細胞としての性質を示す遺伝子群が亢進している一方で免疫応答関連遺伝子の発現は抑制されていた(表3)。これら以外に、CSPG5、DAAM2、ABI3BP、SLC34A2、COL19A1など細胞外マトリクスや肺疾患に関連す

る遺伝子で顕著な発現の上昇が確認された。(図4)主成分分析を行ったところ、元のhAECsとは明確に異なったクラスターを形成していた(図5)。以上の結果から、hAECsにNKX2-1を強制発現させることで2週間という短期間で広範な肺胞上皮細胞に関連する遺伝子の誘導が可能であることが示された。また、一部hAECsとしての性質が保持されていることも示唆された。

表2 Gene Set Enrichment Analysis: 分化誘導 vs コントロール	NES [†]	遺伝子数	補正p値
Negative regulation of viral genome replication	-1.93	49	9.30E-03
Interferon-alpha production	-1.92	23	2.60E-02
Regulation of interferon-alpha production	-1.92	23	2.60E-02
Positive regulation of interleukin-4 production	-1.91	19	2.70E-02
Regulation of natural killer cell proliferation	-1.9	7	5.40E-03
Negative regulation of viral process	-1.9	82	2.50E-03
Positive regulation of amine transport	-1.89	24	3.20E-02
Maintenance of gastrointestinal epithelium	-1.88	13	3.30E-02
Cotranslational protein targeting to membrane	2.138	102	1.10E-03
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	2.128	96	1.10E-03
Protein targeting to ER	2.094	111	1.10E-03
Establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	2.055	114	1.10E-03
Oligodendrocyte development	1.991	38	2.10E-03
Oligodendrocyte differentiation	1.962	84	1.10E-03
Central nervous system myelination	1.959	18	5.10E-03
Axon ensheathment in central nervous system	1.959	18	5.10E-03
Cyclic nucleotide biosynthetic process	1.939	16	7.50E-03
Cyclic purine nucleotide metabolic process	1.939	16	7.50E-03
Adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	1.938	92	1.10E-03
Adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway	1.934	142	1.10E-03
Cyclic nucleotide metabolic process	1.925	34	6.00E-03
Activation of adenylate cyclase activity	1.92	24	8.30E-03
CGMP metabolic process	1.917	14	9.30E-03
Protein targeting to membrane	1.911	197	1.00E-03
Negative regulation of multicellular organism growth	1.908	11	5.30E-03
Respiratory gaseous exchange by respiratory system	1.903	58	5.10E-03
Ammonium ion metabolic process	1.898	18	1.60E-02
Vascular process in circulatory system	1.888	201	1.00E-03
Response to axon injury	1.881	69	5.10E-03
Regulation of tube size	1.876	97	1.90E-03

†補正エンリッチメントスコア

3.2. 肝細胞への分化誘導法の開発

肝細胞への分化と性質の維持にはHNF (Hepatocyte nuclear factors) と呼ばれる遺伝子群の相互作用が重要とされている。肝臓の発生初期ではHNF1B, 3B, 3G (FOXA3) の発現が優位であり、その後HNF4A, 6Aの発現が亢進し、成体肝ではHNF1A, 4Aが肝臓の性質と機能の維持を担っていると考えられている^{8), 9)}。本研究では、発生段階で必要なHNF3G, 6A及び肝機能の維持に必要であると考えられているHNF1A, 4AをhAECsに導入することでダイレクトプログラミングを試みた。肺胞上皮細胞と同様に、肝細胞への分化の簡易的な指標として、 α 1-アンチトリプシン (A1AT) プロモーター依

存的にmCherryを発現するレポーターを用いた。HNF遺伝子群の相互作用の影響を調べるために本研究では、各因子の2種、3種及び4種全ての組み合わせで遺伝子を導入し、遺伝子発現を比較した。hAECsを10日間培養し十分な細胞数を得た後、A1AT-mCherryを導入後各組み合わせのHNF遺伝子群を導入した。遺伝子の導入後2日でmCherryの蛍光が観察され始め、10日間上昇し続けた (図6)。実際にA1ATの発現を見るために、細胞を回収し、RT-qPCRによりmRNA量を確認したところHNF1A, 4Aの組み合わせで遺伝子の導入をしたもので最も発現が亢進しており、4種全て及び1A, 3G, 4Aの組み合わせでも有意な発現上昇が見られた。他方で、

表3 Gene Set Enrichment Analysis: 分化誘導 vs コントロール

	NES [†]	遺伝子数	補正p値
Cornification	-2.43	73	5.90E-03
Keratinization	-2.42	86	6.10E-03
Keratinocyte differentiation	-2.22	157	8.40E-03
Eyelid development in camera-type eye	-2.17	11	3.70E-03
Skin development	-2.15	265	1.20E-02
Peptidyl-arginine modification	-2.11	18	1.10E-02
Epidermis development	-2.09	304	1.40E-02
Embryonic eye morphogenesis	-2.05	32	1.10E-02
Hemidesmosome assembly	-2.04	12	8.40E-03
Epidermal cell differentiation	-2.03	208	1.00E-02
Regulation of cardiac muscle cell action potential	-2.03	23	1.80E-02
Positive regulation of axonogenesis	-1.98	78	6.10E-03
Embryonic camera-type eye formation	-1.97	10	1.60E-02
Positive regulation of axon extension	-1.96	38	2.00E-02
DNA methylation involved in gamete generation	-1.96	14	2.90E-02
Gonadotropin secretion	-1.93	12	3.20E-02
Luteinizing hormone secretion	-1.92	7	1.10E-02
Humoral immune response	2.18	162	2.40E-03
Neutrophil chemotaxis	2.17	71	2.40E-03
Complement activation	2.15	45	2.40E-03
Granulocyte chemotaxis	2.15	91	2.40E-03
Regulation of complement activation	2.13	35	2.40E-03
Neutrophil migration	2.11	87	2.40E-03
Granulocyte migration	2.10	107	2.40E-03
Regulation of humoral immune response	2.09	50	2.40E-03
Humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	2.07	35	2.40E-03
Complement activation, classical pathway	2.02	25	2.50E-03
Antimicrobial humoral response	1.98	79	2.40E-03
Myeloid leukocyte migration	1.92	156	2.40E-03
Positive regulation of macrophage derived foam cell differentiation	1.92	17	6.90E-03

†補正エンリッチメントスコア

低下していた遺伝子群

上昇していた遺伝子群

他の組み合わせでは有意な発現の上昇は見られなかった (図6)。またA1AT以外に肝細胞に発現が特異的なアルブミン遺伝子及びAFP遺伝子の発現の上昇も観察された。以上の結果より、hAECsにHN-F1A, 3G, 4A及び6Aを導入することで肝細胞マーカー遺伝子の発現を誘導できることが示された。

3.3. 膵β細胞への分化誘導法の開発

先行研究により、膵β細胞への分化及び膵β細胞としての性質を維持するために必須であると考えられている転写因子の中から、ヒト羊膜上皮細胞で発現していない5種類の転写因子 (MAFA・NKX2-1・NKX6-1・PAX6・PDX1) に着目した^{10), 11)}。最初に

各々の転写因子の効果を確認するために、それぞれの転写因子を導入し、インスリン遺伝子発現に変化があるか調べた。遺伝子導入後2週間で確認したところ、インスリン遺伝子の発現に有意な変化は見られなかった。次に2種類の遺伝子の組み合わせでインスリン遺伝子の発現を誘導できないかを調べるために上記5因子の中でそれぞれ2種類の組み合わせで遺伝子を導入したが、インスリン遺伝子の有意な発現上昇は認められなかった。培養期間をさらに4週間に延長してもインスリン遺伝子の発現に大きな変化はなかった。少数の転写因子ではインスリン遺伝子の発現を誘導できないと考え、5因子全てを同時に導入することを試みた。同様に1週間培養し、

mRNA量を確認したところ、5種類の転写因子を導入した細胞で2~4倍のインスリン遺伝子の発現上昇が見られた。培養期間を4週間に延長したが、インスリン遺伝子の発現はこれ以上上昇することはないかった。

次に上記5因子の導入に加えて、更なるインスリン遺伝子の発現を上昇させることが可能な小分子化合物の探索を行った。先行研究により、①Wnt/ β -カテニンシグナリングの活性化②TGF β シグナリングの抑制③BMPシグナリングの抑制④甲状腺ホルモンによる刺激が β 細胞への誘導効率を上昇させることが知られている。これらの中で、①hAECsではWnt/ β -カテニンシグナリングは内在的に活性化されているため除外し、他の②~④について検証した。TGF β シグナリングの抑制についてはSB-431542及びALK5 Inhibitor IIにより、BMPシグナリングの抑制はLDN-193189、甲状腺ホルモンはトリヨードチロニン (T3) を培養液に添加することで行った。それぞれの小分子を培養液に添加後レンチウイルスにより上記5因子を導入し、同様の条件で2または4週間培養したところ、TGF β シグナリングを抑制した条件でコントロールと比べて10~15倍のインスリン遺伝子の発現の上昇が確認された。一方で、BMPシグナリングの抑制は大きな効果はなく、甲状腺ホルモンの添加はむしろインスリン遺伝子の発現を抑制した。以上より本研究で羊膜上皮細胞に5種類の転写因子 (MAFA・NKX2-2・NKX6-1・PAX6・PDX1) をレンチウイルスにより導入し、ALK5 Inhibitor IIを加えて培養することで、顕著なインスリン遺伝子の発現誘導を行うことが可能であることを示した。また、驚くべきことにiPS細胞における研究では β 細胞への誘導効率を上昇させることが示されている甲状腺ホルモンの添加は、上記5因子の導入に加え、TGF β シグナリングの抑制によるインスリン遺伝子の発現上昇の効果を完全に抑え込み、インスリン遺伝子の発現に対し強い抑制効果を持つことが示された。

4. 考 察

本研究ではNKX2-1を強制発現させることで2週間という極めて短期間でhAECsにおいてII型肺胞上皮細胞に特異的な遺伝子群を発現する細胞の誘導に成功した。Gene ontology解析の結果では今回の

方法で誘導した細胞は元となったhAECsの性質を残していることが示唆された。他方では、肺胞上皮細胞としての機能に重要であると考えられている遺伝子群の発現はいずれも上昇しており、この結果になった理由として、hAECsに特徴的な遺伝子の発現が抑制されなかったためであると考えられる。今回の方法は転写因子の導入によって肺胞上皮細胞の性質を持たせるというものであり、hAECsの特徴を抑制するものではないが、これはむしろ有用である。hAECsには腫瘍原性の低さや免疫回避能など、移植治療に重要な性質を備えているため、hAECsの特徴を保持したまま、肺胞上皮細胞の性質を獲得させることができたことは将来的な応用に高い可能性を持たせたといえる。今後今回誘導した細胞が肺サーファクタントプロテインを分泌するか、I型肺胞上皮細胞に分化可能かどうか等を検討し、どの程度II型肺胞上皮細胞としての機能を保持しているか調べるとともに、併せて移植治療に有用なhAECsとしての機能も保持していくかを調べることで今回の方法がII型肺胞上皮細胞の再生に有用であることが示されることが期待される。

肺胞上皮細胞はNKX2-1という唯一かつマスターレギュレータと呼べるほどに影響力の高い転写因子が存在したため、単一の遺伝子の導入で分化を誘導することができたと考えられる。一方で膵 β 細胞や肝細胞にはマスターレギュレータと呼べるほど単一で影響力の高い転写因子の存在は報告されておらず、複数の転写因子が互いに相互作用しながら絶妙なバランスの元で保持されていると考えられている。それ故に本研究では、肺胞上皮細胞へ広範な遺伝子の発現変化を惹起することができなかった可能性がある。遺伝子の相互作用を考慮して、各遺伝子の発現量を変化させるか、遺伝子を強制発現させるタイミングを遺伝子ごとに変化させるなどの更なる工夫が求められると考えられる。また、今回はhAECsが比較的未分化であり、ゲノムの多くの領域で開かれていると考えられているため、DNAやヒストンの修飾酵素の機能に干渉する小分子化合物を用いなかった。このため、膵 β 細胞や肝細胞の分化誘導に必要な領域が一部不活性であった可能性も排除できない。今後はこれらの可能性を検証していくことで、更なる分化誘導効率の上昇が期待される。

本研究では、hAECsにII型肺胞上皮細胞、肝細胞、膵β細胞に特異的な転写因子を導入することで、それぞれの細胞に特異的な遺伝子の発現を誘導することに成功した。本研究で用いたhAECsには移植治療に有用な特性を持っている。第一にhAECsは胎児由来の細胞であるため、加齢や環境によるダメージに晒されていないため、腫瘍原性等様々な疾患の原因となり得るゲノムDNAへのダメージの蓄積が無く、ゲノムDNAはほぼ無傷な状態で保たれている。第二に、hAECsは簡便な手法で大量の細胞を倫理的な問題なく採取することが可能である。hAECsは本来廃棄される胎盤から採取可能であるため、非侵襲的な方法で採取が可能であり、また、特別な培養方法も必要なく、トリプシン処理という組織からの細胞採取方法として広く用いられた確立された方法で採取が可能である。第三に、hAECsはレシピエントに安全に移植が可能である。hAECsのゲノムDNAは安定であるため、腫瘍原性を有しておらず、移植しても腫瘍を形成しない^{12), 13)}。加えて、hAECsは免疫回避能を持っており、他家移植における拒絶反応や炎症反応を制御するのに有益であると考えられる¹⁴⁾。以上のことから、hAECsは細胞移植治療に理想的な細胞であり、hAECsに目的の細胞の性質を付与することに成功した本研究の意義は大きい。本研究を元に今後hAECsの更なる移植治療への応用法の開発が進むことが期待される。

5. 結語

本研究では、本来廃棄される胎盤から簡便かつ大量に採取することが可能な、胎児由来の多能性幹細胞であるhAECsに細胞種特異的な転写因子を導入することで、それぞれの細胞に特異的な遺伝子の発現を誘導できることを示した。今後さらに培養条件等を工夫することで更に目的の細胞へ近づけることが期待される。

謝辞

本研究は日本大学若手研究者助成金及び科学研究費補助金の助成の元に行われたものである。

文 献

1) Miki, T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res. Ther.* 2011;2:25.

2) Takano, C. *et al.* Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cells Transl. Med.* 2021;10:829–835.

3) Rezaia, A. *et al.* Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2014;32:1121–1133.

4) Wang, H., Yang, Y., Liu, J. & Qian, L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2021;22:410–424.

5) Taiko, I. *et al.* Selection of red fluorescent protein for genetic labeling of mitochondria and intercellular transfer of viable mitochondria. *Sci. Rep.* 2022;12:19841.

6) Longmire, T. A. *et al.* Efficient Derivation of Purified Lung and Thyroid Progenitors from Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2012;10:398–411.

7) Yamamoto, Y. *et al.* Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat. Methods.* 2017;14:1097–1106.

8) Si-Tayeb, K. *et al.* Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology. Baltim. Md.* 2010;51:297–305.

9) DeLaForest, A. *et al.* HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 2011;138:4143–4153.

10) Theis, F. J. & Lickert, H. A map of β-cell differentiation pathways supports cell therapies for diabetes. *Nature* 2019;569:342–343.

11) Aigha, I. I. & Abdelalim, E. M. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res. Ther.* 2020;11:459.

12) Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B. & Strom, S. C. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells.* 2005;23:1549–1559.

13) Ilancheran, S. *et al.* Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biol. Reprod.* 2007;77:577–588.

14) Miki, T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2018;80:e13003.