



TITLE:

Extracellular laminin regulates
hematopoietic potential of pluripotent stem
cells through integrin β 1-ILK- β -catenin-JUN
axis(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yuzuriha, Akinori

CITATION:

Yuzuriha, Akinori. Extracellular laminin regulates hematopoietic potential of pluripotent stem cells through integrin β 1-ILK- β -catenin-JUN axis. 京都大学, 2021, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2021-05-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k23383>

RIGHT:

CC-BY-NC-ND license DOI:<https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102287>

京都大学	博士（医学）	氏名	杠 明憲
論文題目	Extracellular laminin regulates hematopoietic potential of pluripotent stem cells through integrinβ1-ILK-β-catenin-JUN axis （細胞外ラミニンはインテグリン β 1-ILK- β カテニン-JUN経路を介して多能性幹細胞の造血能を制御する）		
（論文内容の要旨） 【背景と目的】 本邦での標準化臨床用ヒト多能性幹細胞(hPSC)の維持培養には、ラミニン 511-E8 (LM511-E8)が細胞外基質として利用される。LM511-E8 は生理的な全長ラミニン 511 から細胞接着に必要な E8 部分のみで構成され、インテグリンを介した hPSC の多能性維持に貢献する。各種細胞腫への分化過程における合成ラミニンの重要性は多数報告されているが、未分化 hPSC における LM511-E8 の最適な使用条件およびインテグリンへの親和性が異なる他のラミニン種の血球分化能への影響について明らかではなかった。 京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 江藤研究室で考案した造血前駆細胞(HPC)への誘導方法である hPSC-sac 法を基本的な in vitro 培養方法として、LM-E8 による血液細胞分化に適した hPSC 維持条件の探索とその機序の検討、さらに HPC 誘導の高効率化を目指した hPSC-sac 法の改良を目的とした検証を実施した。 【方法と結果】 LM511-E8 をはじめとした各種合成ラミニン上で培養した同一の hPSC 細胞株を分化誘導し比較すると、LM421-E8 と LM121-E8 を用いた場合には HPC への誘導効率が有意に高いことを見出した。LM421-E8 と LM121-E8 上で培養した hPSC サンプルをその他の LM-E8 培養サンプルと遺伝子発現マイクロアレイで比較したところ、古典的 Wnt/ β カテニン経路の活性化が示唆された。LM511-E8 で培養した hPSC は同経路を刺激する薬剤である CHIR99021 の添加で HPC 分化能が回復したことから、合成ラミニンによる外部刺激が古典的 Wnt/ β カテニン経路を制御し HPC 分化に影響していると推察された。 続いて、LM421-E8 と LM121-E8 上で培養した hPSC では、ラミニン受容体である α 6 β 1 インテグリン複合体の β 1(ITGB1)サブユニットの細胞内シグナルである古典的 Wnt/ β カテニン経路において、ITGB1 発現量の上昇および下流シグナル ILK、 β カテニン、JUN の発現上昇を確認した。一方、この2つのラミニン使用条件での hPSC の細胞接着能は低下していた。そこで ITGB1 発現量上昇およびラミニンへの細胞接着低減を指標に、LM511-E8 の濃度を希釈することを見出し、HPC 分化能上昇可能なことを確認した。この希釈した LM511-E8 上の hPSC に ILK、 β カテニン、JUN に対する阻害剤および ILK ノックダウンを施すと HPC 分化効率は低減し、同経路の血球分化能保持における重要性を再確認した。 本濃度低減 LM511-E8 条件においてもさらに高効率に HPC を作出できる hPSC-sac 法の最適化を行い、従来法に bFGF、TGF β 阻害剤、へパリンを添加することで、造血性内皮細胞の増加、SPI1/RUNX1c/GFI1b など造血関連遺伝子の上昇、50倍以上の HPC 産生を達成した。			

【考察・結論】 ITGB1 及び古典的 Wnt/ β カテニン経路を介した細胞外ラミニンによる hPSC の造血系分化能の制御を明らかにした。細胞外ラミニンの弱い結合が hPSC の足場構成を刺激し ITGB1 高発現、シグナルを上方制御する機序が考えられた。また本研究からは個別の hPSC 株の ITGB1 発現量が分化後 HPC 産生量に反映される可能性も示唆され、改良型 hPSC-sac 法の開発と合わせ再生医療造血分野への貢献が期待される。 （論文審査の結果の要旨） 多能性幹細胞 (PSC) を利用した血液再生医療において、造血前駆細胞の分化効率向上は重要な課題である。PSC からの血液分化指向性は主に DNA メチル化状態など細胞内的因子依存性と考えられてきたが、本研究では培養基質由来の細胞外因子の影響を検証した。9 種類の合成ラミニン E8 断片 (LM-E8) で維持培養した PSC の造血能を比較検討したところ、本邦で標準使用されている LM511-E8 よりも LM421-E8 と LM121-E8 上の PSC は造血能が上昇していた。これらの PSC では細胞接着レベル (avidity) の低下、インテグリン β 1 サブユニット(ITGB1)発現上昇が観察され、さらにマイクロアレイ解析より古典的 Wnt/ β カテニン経路の活性化が示唆された。そこで、LM-E8 による avidity が同経路を制御しているとの仮説を基に、avidity 作用が強い LM511-E8 を希釈した結果、ITGB1-ILK- β カテニン-JUN 経路遺伝子の発現、および造血能が上昇した。加えて、従来の造血分化法に比較して造血分化効率を 50 倍以上に向上させる培養添加物を見出し、これらの併用が造血前駆細胞分化効率を大幅に改善することを明らかにした。 以上の研究は PSC 維持培養期における培養基質を起点とする外的な造血分化能制御機構の更なる解明に貢献し、血液再生医療の発展に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 4 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
