

論文内容の要旨

論文提出者氏名 井上 裕太

論文題目

Direct conversion of fibroblasts into urothelial cells that may be recruited to regenerating mucosa of injured urinary bladder.

尿路上皮細胞は腎盂、尿管、膀胱、近位尿道の粘膜を構成する細胞である。膀胱がんや神経因性膀胱、先天性疾患、膀胱損傷や間質性膀胱炎などの病態では、しばしば尿路上皮細胞の機能障害や物理的欠損を引き起こす。現在、これらの治療のために腸管を用いた代用膀胱が用いられるが、腸管は尿を吸収してしまい結石形成や代謝性アシドーシスを引き起こす。さらに尿路感染症、発癌など様々な重篤な合併症も引き起こしうる。そのため、腸管利用の代用膀胱に代わるソースの開発が模索されてきた。

現在までに骨髄由来幹細胞や脂肪由来幹細胞、iPS 細胞などを用いて尿路上皮細胞を生み出す方法が論文報告されてきたが、これらは長期間を要する、病的な尿路組織を用いる、テラトーマ形成の可能性など問題点が多い。我々はダイレクトリプログラミングという手法に着目した。これは、ある細胞に遺伝子導入などを行い、多能性幹細胞のフェーズを介さずに他の種の細胞へ転換させる技術のことである。我々はヒト線維芽細胞に数種類の遺伝子を導入し、直接尿路上皮細胞へ誘導できないか検討した。

まず、種々の論文から FOXA1, TP63, IRF1, SHH の 4 遺伝子に着目した。レトロウイルスベクターにこれらの遺伝子を挿入し、ヒト皮膚線維芽細胞に感染させることで、これら遺伝子を強制発現させ、尿路上皮細胞へ分化誘導するか検討した。尿路上皮細胞への分化誘導の可否は、形態学的変化ならびにウロプラキン 1b の発現をもって評価した。しかしながら FOXA1, TP63, IRF1, SHH の組み合わせでは、尿路上皮細胞への分化誘導は得られなかった。

そこで、線維芽細胞から iPS 細胞への誘導に用いられる KLF4, OCT4, MYC ファミリーに着目した。MYC ファミリーは発がん性の低い MYCL を用いた。FOXA1, TP63, IRF1, SHH とこれら 3 遺伝子を組み合わせ種々の検討を行ったところ、FOXA1, TP63, MYCL, KLF4 (FTLK の 4 遺伝子を導入することで、ウロプラキン 1b ならびにウロプラキン 2 (尿路上皮に特異的な膜タンパク) の高発現を認め、

上皮細胞に特徴的な敷石状の増殖像を呈した。

次に FTLK 導入からウロプラキン 1b ならびにウロプラキン 2 の mRNA 発現について時系列で検討したところ、ウロプラキン 1b は導入後 8 日目と 0 日目と比して有意に高発現となり、経時的に増加した。ウロプラキン 2 は 11 日目と 0 日目と比して有意に高発現となり、21 日目でピークに達した。また、上皮細胞に特徴的な CDH1 タンパクと尿路上皮細胞に比較的特異的な KRT8/18 を導入 21 日目の免疫組織化学染色にて評価したところ、それぞれ 26% の細胞に発現を認めた。ウロプラキン 1b、ウロプラキン 2 のタンパク発現も同様に免疫組織化学染色で評価し、それぞれ 42%、23% の細胞に発現を認めた。

FTLK 導入にて得られた細胞を directly converted urothelial cells (dUCs) と命名した。dUCs がダイレクトリプログラミングによって得られたものかを確認するために、分化誘導の過程で多能性幹細胞のマーカーである LIN28A, POU5F1, SOX2, NANOG の発現がないか real-time RT-PCR を用いて検討したが、いずれの遺伝子発現も認めなかった。NANOG についてはタンパク発現の有無を免疫組織化学染色にて iPS 細胞と比較したが、分化誘導の過程で NANOG タンパクの発現も認めなかった。以上から、dUCs はダイレクトリプログラミングによって得られたことを示した。また、小腸上皮に特異的な CDX2、幹細胞に特異的な ALB、血管内皮細胞に特異的な CD31、唾液腺上皮に特異的な AQP5 の発現もそれぞれ real-time RT-PCR にて確認したが、dUCs では上昇を認めなかった。

上記のように、dUCs は尿路上皮細胞としての特徴を有していたが、敷石状増殖を示すコロニーは多くなく、継代が困難であった。しかし培地の組成を調整することで UCM 培地を新たに作成し、コロニーを選択的に増殖させ、4 度まで継代することが可能となった。UCM 培地で増殖させた dUCs は、線維芽細胞に比べて有意にバリア機能を有することを、in vitro permeability assay にて示した。さらに UCM で継代した dUCs は、RNA-seq にて正常尿路上皮細胞と類似した遺伝子発現を示した。

次に、in vivo の環境で FTLK を導入した線維芽細胞が尿路上皮細胞へ分化誘導されるか検証した。NOG マウスの膀胱を過酸化水素にて障害させた膀胱障害モデルマウスを作成し、FTLK および GFP を導入したヒト皮膚線維芽細胞を、導入 4 日目に膀胱障害モデルマウスの膀胱内に注入した。注入後 7 日で膀胱を摘出し免疫組織化学染色を行うと、GFP 発現細胞はウロプラキン 1b、ウロプラキン 2、CDH1 および KRT8/18 が陽性であった。すなわち in vivo の環境下でも FTLK を導入した線維芽細胞が、尿路上皮細胞へ分化誘導されることが示された。我々の研究を更に発展させれば、今後間質性膀胱炎や膀胱損傷、先天性疾患に対する尿路上皮再生療法につながるものが期待される。