

京都大学	博士 (医科学)	氏名	恒吉 法尋
論文題目	PRDM14 suppresses expression of differentiation marker genes in human embryonic stem cells (PRDM14 はヒト ES 細胞において分化マーカー遺伝子の発現を抑制している)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell, ES 細胞) は、我々の体を構成する全ての細胞系譜へ分化できる多能性 (pluripotency) を有し、かつ多能性を維持したまま未分化な状態で自己増殖できる幹細胞である。その特性ゆえに、ヒト ES 細胞は細胞移植治療や創薬研究などへの医療応用を目指した研究が遂行されている。しかしながら、未だヒト ES 細胞の自己増殖の分子機構に関しては解明されていない点が多く残されており、詳細にヒト ES 細胞の自己増殖機構を明らかにする事により、現在よりも安全でかつ未分化状態を維持出来る animal-free な Chemical-Defined Medium での培養方法の開発や、未分化状態から分化する際に関与している因子を制御する事により目的の分化細胞を得るための最適な分化誘導方法の確立などへの応用が期待される為、ヒト ES 細胞の自己増殖機構を解明すべく基礎研究を行うことにした。</p> <p>まず、未分化なヒト ES 細胞で特異的に発現している因子が自己増殖機構に関与している可能性が高いと考え、これらの因子を同定する為、未分化なヒト ES 細胞と最終分化したヒト繊維芽細胞株 (TIG-3 細胞) で発現している遺伝子をマイクロアレイ解析、RT-PCR 解析によりスクリーニングを行い 89 個の候補遺伝子を得た。さらに、これら遺伝子の未分化な ES 細胞から分化初期における発現変動を、ヒト ES 細胞をレチノイン酸処理により分化させた細胞を用いて RT-PCR 解析を行ったところ 23 遺伝子が分化に伴い顕著に発現が減少することを見出した。この 23 遺伝子のうち、ヒストンのメチル化に関与すると考えられる PRDM14 に着目し詳細な解析を行った。近年、ES 細胞および組織性幹細胞の自己増殖維持機構や分化制御機構において、ヒストン修飾による遺伝子の発現制御が重要である事が報告され、PRDM14 もヒト ES 細胞の自己増殖機構において重要な役割を担っているのではないかと考えた為である。PRDM14 の細胞内局在を免疫蛍光抗体法にて解析した結果、PRDM14 は未分化ヒト ES 細胞特異的に核内にて検出され、レチノイン酸処理により分化させた細胞では検出感度以下であった。従って、PRDM14 は未分化ヒト ES 細胞の核内で働いている事が示唆された。次に、ヒト ES 細胞において siRNA を用い PRDM14 の発現を抑制した結果、未分化な細胞とは異なる扁平で細胞質の割合が多い細胞形態へ変化し、Real-Time PCR 解析により未分化特異的遺伝子の発現減少と分化マーカー遺伝子の発現誘導が認められ、ヒト ES 細胞が分化する事が分かった。この結果より、PRDM14 がヒト ES 細胞の自己増殖機構に必須な因子である事が明らかとなった。さらに、ヒト ES 細胞で PRDM14 の安定発現株を樹立して解析を行った。PRDM14 の安定発現株は未分化状態を維持する培養条件では形態的に親株と明瞭な差は見受けられなかった。一方、胚様体形成による初期分化誘導を行った結果、未分化特異的遺伝子の発現減少は認められたが、親株では誘導される三胚葉系の分化マーカー遺伝子の発現上昇が認められなかった。これらの結果より、PRDM14 は分化に関与する遺伝子の発現を抑制する事により、ヒト ES 細胞の自己増殖機構に関与している事が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ヒト胚性幹細胞 (Embryonic stem cell, ES細胞) の自己増殖機構を明らかにする事を目的に、マイクロアレイ解析に基づくスクリーニングを行い、未分化ヒトES細胞で特異的に発現する遺伝子の一つとしてPRDM14 (PR domain [PRDI-BF1 and RIZ homologous region] containing 14)を見出した。PRDMファミリーはヒストンのメチル化に関与するといわれ、免疫蛍光抗体法にてPRDM14タンパクの核内への局在を示し、PRDM14が未分化ヒトES細胞の核内で働いている事を示唆した。

次に、Small interfering RNAでPRDM14の発現を抑制すると、ヒトES細胞の形態が変化し、定量的リアルタイムPCR解析で未分化特異的遺伝子の発現減少と分化マーカー遺伝子の発現誘導が検出された。この結果より、PRDM14がヒトES細胞の未分化性の維持に必須な因子である事を明らかにした。

さらに、ヒトES細胞でPRDM14の安定発現株を樹立し、胚様体形成による初期分化誘導を行うと、未分化特異的遺伝子の発現は減少するが、分化マーカー遺伝子の発現上昇は認められなかった。これらの結果より、PRDM14は分化に関与する遺伝子の発現を抑制する事によりヒトES細胞の未分化性を維持している事を示唆した。

以上の研究は、PRDM14によるヒトES細胞の未分化性維持機構の解明に貢献し、ヒトES細胞の自己増殖分子機構の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医科学)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、平成20年12月25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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降