

氏名	まつ 松	むら 村	ひろ 寛	ゆき 行
学位(専攻分野)	博士(医学)			
学位記番号	医博第3200号			
学位授与の日付	平成20年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻			
学位論文題目	Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. (ES-体細胞融合細胞からの狙った染色体の除去)			

論文調査委員 (主査)
教授 笹井芳樹 教授 西川伸一 教授 山中伸弥

論文内容の要旨

幹細胞の分化誘導により生み出された特異的な組織を、患者の疾患部位に移植する再生医療は、臓器移植におけるドナー不足や臓器提供者の負担の問題を解消した新たな移植治療法として注目を集めている。再生医療の成功には幹細胞が重要な鍵となる。理想的な幹細胞とは倫理的問題を最小限に、(1) 無限増殖能、(2) 多能性の維持、(3) 拒絶反応の回避、の3条件を満たす必要がある。これまで、初期胚由来の胚性幹(ES)細胞や各組織に由来する組織性幹細胞が幹細胞の候補に挙げられているが、すべての条件を満たす幹細胞はまだない。

究極的には、個人の体細胞から多能性幹細胞を生み出すことができれば、これらの全条件を満たすことができる。その方法の一つとして、これまで、体細胞とES細胞の細胞融合により、体細胞核がES細胞核様に再プログラム化され、多能性を獲得することが知られている。ES-体細胞融合細胞からES細胞由来の染色体を取り除ければ、再プログラム化された個人体細胞由来の染色体のみをもつ多能性幹細胞を作製することが可能となる。本研究では、マウスES-体細胞融合細胞からES細胞由来の余分な染色体を除去する新技術の確立を目的に実験を行い、以下の結果を得た。

- 1) 相同組み換え配列(LoxP)を2個逆向きに配置し、その間に蛍光マーカー配列(GFP)と薬剤耐性遺伝子を組み込んだ染色体除去カセット(CEC)を構築し、薬剤耐性遺伝子によりマウスES細胞にランダムに導入、任意に選別し、第11番と第12番染色体への導入を確認した。これらES細胞クローンと成体マウスから採取した胸腺細胞と細胞融合を行った。得られた融合細胞クローンにDNA組み換え酵素(Cre)処理を行うことによりCEC導入染色体にのみ組み換えを引き起こし、細胞に好ましくない形に変化させ、染色体除去を誘発させた。その後、セルソーターを用いて、GFP陰性細胞を分取したところ、第11番と第12番染色体がそれぞれ選択的に除去されていることを染色体ペインティングや核型解析から明らかにした。
- 2) マウス6番染色体には、未分化維持因子Nanog遺伝子が存在するため、ES細胞の未分化性維持に必須の染色体である。CEC(G418耐性)を相同組み換えにより第6番染色体に導入し、G418高濃度処理によりES細胞の2本の6番染色体にCECが導入されたクローンを選別した。亜種JF1マウス胸腺細胞と細胞融合を行い、Cre酵素処理後、GFP陰性細胞を分取したところ、ES細胞由来の第6番染色体が2本とも除去されたことを亜種間DNA配列多型の利用により確認した。このことにより、再プログラム化された体細胞由来Nanogの働きのみで、ES細胞由来第6番染色体除去融合細胞の未分化性が維持されていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、初期化(再プログラム化)により体細胞から多能性幹細胞を作製し加工する基盤技術の開発を目指したものである。胚性幹(ES)細胞との細胞融合により体細胞核を未分化細胞様に初期化後に、融合細胞核から標的染色体を取り除く技術を開発したことをマウス実験系で示したものである。

細胞核からの染色体除去分子ツールとして染色体除去カセット (CEC) を考案および構築した。CEC 導入 ES 細胞染色体は、DNA 組換え Cre 酵素の働きで融合細胞核から排除された。そこで、*Nanog* を含む未分化細胞特異的遺伝子が集積する ES 細胞第 6 番染色体対を ES-体細胞融合細胞から除去した。その結果、初期化された体細胞の未分化特異的遺伝子が融合細胞の未分化性維持に機能する事が示された。免疫拒絶に主要な役割を果たす MHC 遺伝子群はマウス第 17 番染色体に集積する。この技術を応用すると、例えば、融合細胞から ES 細胞の第 17 番染色体対を除去することで、体細胞ドナーに移植後拒絶反応から有意に免れることができる可能性が示された。

以上の研究は、細胞核からの染色体除去技術の開発と応用により、未分化特異的遺伝子の生理的機能の解明に貢献した。この研究成果は、体細胞からの多能性幹細胞作製のみならず個人の特性に基づく薬剤選択や病因解明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、本学位申請者は、平成 20 年 1 月 7 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。