

京都大学	博士 (医学)	氏名	熊谷 英明
論文題目	Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal (ヒト胚性幹 (ES) 細胞の未分化維持増殖を促進する低分子化合物の同定)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒト胚性幹 (embryonic stem; ES) 細胞や人工多能性幹 (induced pluripotent stem; iPS) 細胞は、体を構成する三胚葉へ分化する多能性と自己複製能を併せ持つ。これらの細胞株は、通常マウス線維芽細胞由来のフィーダー細胞上で培養されており、再生医療の実現化のためにはフィーダーフリー培養系の発展が不可欠で、培養に必要な成分を低分子化合物に代替することが期待される。ヒト ES 細胞の未分化増殖には basic fibroblast growth factor (bFGF) が主要な役割を果たしているが、bFGF の代替となる低分子化合物はまだ同定されていない。そこで、本研究では化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、ヒト ES 細胞の未分化維持・増殖に主要な役割を果たしている bFGF の代替効果を示す低分子化合物の探索と同定を行なった。</p> <p>まず、スクリーニングを効率的に行なうため、ヒト ES 細胞の未分化維持に中心的な役割を果たしている OCT4 遺伝子のプロモーター領域の下流に EGFP をレポーターとするベクター遺伝子 (hOCT4pro-EGFP) を作成し、ヒト ES 細胞株に導入した。この細胞株では未分化状態を蛍光強度によりモニタリングできた。次に、蛍光画像を取得し、数値化・演算処理する high-content analysis (HCA) により解析することで、未分化状態 (Conditioned Medium; CM)、分化状態 (RA)、またスクリーニングのネガティブコントロールとなる bFGF を添加していない状態 (DMSO) の三者を精度良く区別することができ、システム化されたスクリーニング系を構築することができた。つづいて、スクリーニング系の妥当性を確認するとともにヒット化合物を得やすいように、細胞薬理活性のある約 1,120 種類の化合物で構成された低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。その結果、z-score が 2 以上で効果があると考えられる化合物は 18 種類、そのなかに分子構造の類似している化合物は 5 種類あり、いずれも神経伝達物質のアンタゴニストで生理活性においても類似していた。このことから、ヒット化合物としての妥当性が強く示唆された。</p> <p>得られたヒット化合物の、長期培養における効果について検討したところ、未分化状態に特有の細胞の形態が維持され、正常の核型を有していた。また、フィーダーフリー培養のスタンダードである CM と同等の効果を示すことを、未分化マーカーあるいは分化マーカー遺伝子の発現および増殖速度などから確認した。そして、ヒット化合物で長期培養した細胞を免疫不全マウスに移植した場合も、<i>in vitro</i> で分化させた場合も、それぞれ三胚葉に分化していた。これらのことから、bFGF の代わりにヒット化合物を添加して長期培養することが可</p>			

能であり、細胞は未分化状態と多能性を維持していた。

以上のことから、ヒト ES 細胞の未分化維持増殖を促進する低分子化合物を見出すことが可能なスクリーニング系を構築した。スクリーニングで得られたヒット化合物を添加することにより、bFGF を添加せずに長期培養することができ、未分化状態、正常染色体と多能性を維持することができた。今後、本研究で得られたヒット化合物の標的となる分子やシグナル経路を探索および同定することで、未分化維持機構に関与する分子制御のさらなる解明が進むことが期待される。また、キナーゼを標的としたライブラリー、天然化合物などに特化したライブラリーをスクリーニングすることにより、未分化を維持する新規因子の同定が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

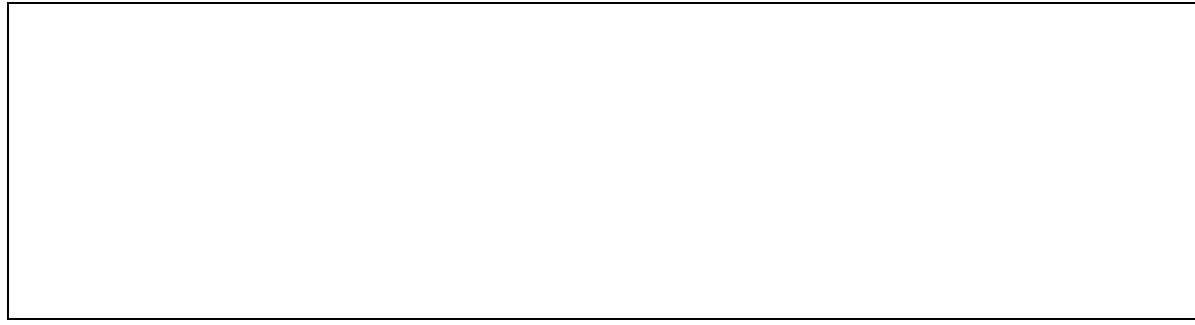
ヒト多能性幹細胞株は自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞株であり、基礎研究や創薬ならびに再生医療への応用が期待されている。その安定した増殖には塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含む培地が必要であるが、その品質不安定性と高コストが臨床応用等の実用化にとって問題点となっている。本研究は、ヒト多能性幹細胞の未分化増殖に不可欠な役割を果たしていると考えられる bFGF に着目し、その代替となる低分子化合物の探索と同定を行なうことにより、多能性幹細胞の制御機構研究や実用化への貢献を目指した。

申請者は、未分化状態をモニタリングできるヒト胚性幹細胞株を作製し、画像解析手法を導入して、効率的かつ網羅的に化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。その結果、化学構造、生理活性ともに類似する複数ヒット化合物の同定に成功した。これら化合物の添加により、bFGF なしで長期培養を行なうことが可能であり多能性を維持できることを確認した。

以上の研究は bFGF の多能性維持機能を代替しうる低分子化合物の同定に貢献し、未分化維持を制御する分子機構の更なる解明、そして多能性幹細胞の医学応用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、平成 25 年 8 月 9 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