

京都大学	博士 (医科学)	氏名	島本 廉
論文題目	Generation and Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells from Aid-deficient Mice (Aid 欠損マウスからの iPS 細胞誘導と性質評価)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>体細胞において転写因子を強制発現させることにより、自己複製能と分化多能性を有する ES 細胞様の induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) が誘導される。DNA の脱メチル化は iPS 細胞の誘導にとって重要な現象であると考えられているが、その分子機構は十分に理解されていない。</p> <p>Aid はシトシンのアミノ基を基質とする脱アミノ化酵素であり、メチル化シトシンをチミンへと置換する。近年、マウスの初期胚や脳における DNA 脱メチル化に Aid が関わるということが報告された。さらに、ヒト線維芽細胞とマウス ES 細胞の細胞融合によるリプログラミングにおいても DNA 脱メチル化に関わるということが報告された。これらの報告から、iPS 細胞誘導時の DNA 脱メチル化においても Aid が関与する可能性が考えられた。本研究ではこの仮説を検証するため、Aid を欠損したマウスから iPS 細胞の誘導を行い、その性質について検討した。</p> <p>初めに、Aid が欠損していても iPS 細胞が得られるかを検証するため、Aid 欠損マウスより MEF と B 細胞を採取し、レトロウイルスを用いて iPS 細胞の誘導因子(Oct3/4 及び Sox2、Klf4、c-Myc)を導入した。iPS 細胞の検出のため、実験には Nanog プロモーターの下流に GFP レポーターを持つマウスを使用した。その結果、Aid 欠損細胞からでも野生型と同様の形態を持つ GFP 陽性の iPS 細胞コロニーが得られた。野生型 MEF 10³ 個からは 17.8±14.5 個、Aid 欠損型からは 13.3±13.9 個のコロニーが得られた。MEF 及び B 細胞共に、Aid 欠損によるコロニー数の有意な変動は認められなかった。また、MEF において Aid の過剰発現及び一過的な発現抑制を行ったが、共にコロニー数に影響は見られなかった。これらの結果から、Aid の有無は iPS 細胞の誘導効率に影響しないことが明らかとなった。</p> <p>次に、Aid 欠損 iPS 細胞の性質を調べた。Aid 欠損 iPS 細胞は、野生型と同等の増殖能力、三胚葉分化能力及びキメラ作製能力を示した。また、マイクロアレイ解析により、Aid 欠損型と野生型 iPS 細胞の遺伝子発現を網羅的に比較した。その結果、発現変動率 2 倍以上、False Discovery Rate 0.05 未満を基準として有意に差のあるプローブは合計 54,497 プローブ中 38 プローブと非常に僅かであった。これらの結果から、Aid 欠損 iPS 細胞は野生型と同等の自己複製能力及び分化多能性を持つことが示唆された。</p> <p>Aid 欠損 iPS 細胞の DNA メチル状態について調べるため、Nanog 及び Oct3/4 プロモーター領域のメチル化レベルをバイサルファイトパイロシーケンスによって調べた。Nanog プロモーター領域のメチル化レベルは Aid 欠損 iPS 細胞で 10.3±2.2%、野生型で 11.1±2.6% であり、有意な差は認められなかった。また、Oct3/4 プロモーターにおいても有意な差は認められなかった。そこで、MBD シーケンス法により網羅的に DNA メチル化状態を比較した。検出した Aid 欠損型と野生型 iPS 細胞のメチル化領域は 99.5% が共通であり、違いは僅か 0.5% であった。これらの結果から、Aid の欠損は iPS 細胞の DNA メチル化状態に大きく影響しないことが示唆された。</p> <p>以上の結果から、Aid は iPS 細胞誘導時の DNA 脱メチル化において必須の役割を持たないと結論された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

DNA の脱メチル化は iPS 細胞の誘導にとって重要な現象であると考えられているが、その分子機構は十分に理解されていない。近年、マウスの初期胚や脳において、また細胞融合による初期化において Aid が DNA 脱メチル化に関わるということが報告された。これらの報告を基に、申請者らは iPS 細胞誘導時の DNA 脱メチル化においても Aid が関与していることを予想した。本論文では、この仮説を検証するために Aid 欠損マウスから iPS 細胞の誘導を試み、その性質について検討した。

初めに、Aid 欠損体細胞から iPS 細胞を誘導したところ、iPS 細胞様の細胞が得られ、その誘導効率に野生型との有意な差は認められなかった。得られた Aid 欠損 iPS 細胞の性質について調べた結果、形態、増殖能力及び遺伝子発現パターンは野生型と同等であり、キメラマウスにも寄与した。これらの結果は、Aid 欠損 iPS 細胞は野生型と同等の自己複製能と分化多能性を有することを示唆する。さらに、DNA メチル化状態について MBD-Seq 法を用いて網羅的に比較したが、Aid 欠損と野生型 iPS 細胞は僅かに異なるだけであった。一連の研究より、Aid は iPS 細胞の誘導時の DNA の脱メチル化において必須の役割を持たないことを示した。

以上の研究は iPS 細胞誘導時の DNA 脱メチル化分子機構の解明に貢献し、iPS 細胞誘導メカニズムの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 26 年 6 月 3 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