

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	番匠 祥己
論文題目	細胞リプログラミングに関与する分泌因子の同定と解析		
(論文内容の要旨)			
<p>体細胞に特定のリプログラミング誘導転写因子を導入し過剰発現させることで作製できる人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同様の多能性を持つため再生医療面で幅広く応用できると期待されている。細胞リプログラミング機構のメカニズムに関する研究は、遺伝子発現変化やエピジェネティックな変化が多く報告されているが、分泌因子や細胞間コミュニケーションとリプログラミングの関連については十分に明らかにされていない。</p> <p>本研究において申請者は、マウスの胎仔繊維芽細胞 (MEF) にリプログラミングを誘導した際に発現が上昇する分泌因子を同定し、その分泌因子がリプログラミング過程に与える影響を検討した。MEF に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc (以下 OSKM)、または Oct3/4、Sox2、Klf4 (以下 OSK) を導入したリプログラミング過程において発現が 2 倍以上に上昇した分泌因子群をマイクロアレイ解析により同定した。その中で発現量が 10 倍以上上昇した Sostdc1、Glb112、Fetub、Dpp4、Gdf3、Trh、Tdgf1 の 7 つの分泌因子に着目し、詳細な解析を行った。MEF にリプログラミング因子を各々単独に過剰発現させて Sostdc1 と Gdf3 の発現量の変化を調べたところ、Sostdc1 は Sox2 によって、Gdf3 は Oct3/4 によって発現が誘導されることが示唆された。次に、細胞リプログラミングの時期特異的なマーカーである THY1 と SSEA1 の発現を指標に FACS を用いて細胞をソートし、それぞれの細胞集団における 7 つの分泌因子の発現量の比較をすることで分泌因子のリプログラミング過程への関わりを検討した。その結果、(1) Sostdc1 はリプログラミング過程の初期に一過的に発現する、(2) Glb112 と Fetub、Dpp4 の 3 つはリプログラミング過程の初期から中期にかけて一過的に発現する、(3) Gdf3 と Trh の 2 つはリプログラミング過程の初期から中期にかけて発現が上昇し始めて後期まで維持される、(4) Tdgf1 はリプログラミング過程の後期において発現が上昇しそのまま維持される、の 4 つに発現パターンに分けられることを見出した。さらに、リプログラミング初期に一過的に発現する Sostdc1 についてノックダウン実験を行った結果、多能性マーカー遺伝子である Nanog、内在性 Oct3/4、E-cadherin の発現量も iPS 細胞コロニー数も共に顕著に減少した。以上から、Sostdc1 は MEF のリプログラミングに関与していることが示唆された。最後に、MEF とは異なる細胞種であるアストロサイトからのリプログラミングにおける 7 つの分泌因子の挙動を検討したところ、7 つの分泌因子全てで発現量の上昇が見られたことから、リプログラミング機構の普遍的な現象である可能性が示唆された。</p> <p>以上のように、本研究で申請者は、MEF のリプログラミング過程で発現が上昇する分泌因子の同定を行い、Sostdc1 のリプログラミングへの関与を明らかにした。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は細胞リプログラミング過程における分泌因子の発現解析を行い、**Sostdc1** がリプログラミングに関与することを明らかにした。まず申請者は、マウスの胎仔繊維芽細胞 (MEF) に **Oct3/4**、**Sox2**、**Klf4**、**c-Myc** (以下 **OSKM**)、または **Oct3/4**、**Sox2**、**Klf4** (以下 **OSK**) を導入した、リプログラミング過程において発現が 2 倍以上に上昇した分泌因子群をマイクロアレイのデータを基に同定した。同定されたものの中で 10 倍以上発現が上昇した **Sostdc1**、**Glb112**、**Fetub**、**Dpp4**、**Gdf3**、**Trh**、**Tdgf1** の 7 つの分泌因子に着目した。申請者はまずこの 7 つの分泌因子について、リプログラミング過程におけるタイムコースでの発現解析と、樹立された iPS 細胞株における発現解析を行った。その結果、**Sostdc1** と **Glb112**、**Fetub**、**Dpp4** の 4 つの分泌因子はリプログラミング過程において一過的に発現していることを示した。次に申請者は、**OSKM** をそれぞれ単独で過剰発現させた MEF を用いて 7 つの分泌因子の発現を解析した。その結果、**Sostdc1** は **Sox2** によって、**Gdf3** は **Oct3/4** によって直接制御を受けて発現が誘導されている可能性を示した。次に申請者は、リプログラミングの時期特異的のマーカである **THY1** と **SSEA1** の発現を指標に細胞を **FACS** によって分取し、7 つの分泌因子の発現解析を行った。その結果、リプログラミング過程における 7 つの分泌因子の発現パターンを 4 つに区分できることを見出した。**Sostdc1** はリプログラミング初期に一過的に発現すること、**Glb112** と **Fetub**、**Dpp4** はリプログラミングの初期から中期にかけて一過的に発現すること、**Gdf3** と **Trh** はリプログラミングの初期から中期にかけて発現が上昇し、発現上昇が後期まで維持されること、**Tdgf1** はリプログラミング後期から発現が上昇し、そのまま維持されることを明らかにした。次に申請者は、7 つの分泌因子の中でリプログラミング初期に一過的に発現が上昇する **Sostdc1** に着目し、**Sostdc1** のノックダウン実験を行った。その結果、**Sostdc1** をノックダウンするとリプログラミング効率が低下することを見出した。これらの結果から、**Sostdc1** は MEF のリプログラミングに対して促進的に働いていることが示唆された。続いて、申請者は 7 つの分泌因子の発現上昇が MEF からのリプログラミング誘導時特異的なのかを検討するために、MEF とは異なる細胞種であるアストロサイトからのリプログラミングにおける 7 つの分泌因子の挙動を解析した。その結果、7 つの分泌因子全てで発現が上昇した。さらに、アストロサイトのリプログラミングの時期特異的な発現解析の結果、MEF からのリプログラミング誘導時と共通した発現パターンを示す分泌因子も存在した。これら一連の研究成果は、細胞リプログラミング過程における分泌因子の発現と役割に関して新たな知見を与えるものである。本論文は、リプログラミングの制御機構の解明に大きく貢献するものである。したがって、生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されていると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性を持って記述されていた。以上より、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 29 年 8 月 7 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日