

京都大学	博士 (医科学)	氏名	八木正樹
論文題目	Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation (配偶子に由来する DNA メチル化を維持した高品質な ES 細胞の樹立)		
(論文内容の要旨) マウス着床前胚の内部細胞塊より樹立される胚性幹細胞(ES 細胞)は代表的な多能性幹細胞のひとつである。ES 細胞は増殖能および分化能を有することから、発生学を含む基礎医学研究に有用であるのみならず、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)と同様に再生医療への応用も期待されている。従来、ES 細胞は血清および LIF(白血病阻止因子)を含む培地(S/L 培地)を用いて樹立、そして維持されてきた。しかしながら、これまでの研究から、S/L 培地下の ES 細胞は多能性関連遺伝子の発現パターンが不均一であることや、DNA メチル化状態が内部細胞塊と比して高いことが分かってきた。近年 2 種類の阻害化合物(MEK1/2 阻害剤および Gsk3 β 阻害剤)を加えること(2i/L 培地)により血清非存在下で効率良く ES 細胞を樹立・維持することが可能となった。また 2i/L 培地は ES 細胞の遺伝子発現や DNA メチル化レベルを内部細胞塊の性質により類似させることから汎用的に用いられている。しかしながら、2i/L 培地で樹立・維持した ES 細胞のエピゲノム状態の安定性や、その品質については詳細に解析されていない。雌雄特異的な配偶子由来 DNA メチル化情報を引き継ぎインプリントされる遺伝子は、父方アレル・母方アレルどちらか一方のアレルのみから発現し、哺乳類の発生に重要であることが知られている。しかしながら、アレル特異的な制御を受けることから、多能性幹細胞における詳細な解析は困難であった。そこで本研究では、父方母方ゲノムの区別が可能なマウスの掛け合わせ(MSM/Ms マウスと 129/SvJ マウス)により得た F1 世代の胚盤胞から 2i/L 培地と S/L 培地を用いて雌雄複数株ずつの ES 細胞を樹立し(以後、2i/L-ES 細胞、S/L-ES 細胞とする)、詳細な DNA メチル化解析を行った。2i/L-ES 細胞株はゲノム全域にわたり DNA 低メチル化状態にあり、さらに、2i/L-ES 細胞では受精後において維持されるべきインプリント領域(ICR)の DNA メチル化も低下していた。S/L-ES 細胞では安定的に維持されていたことから、2i/L 培地特異的に ICR の脱メチル化が起こることが示唆された。重要なことに、DNA 脱メチル化の程度は、雌雄間で差があり雌の ES 細胞株でその程度は顕著であった。ICR の DNA メチル化はインプリント遺伝子の片アレル発現の制御に深く関わる通り、RNA-seq 解析から 2i/L-ES 細胞におけるインプリント遺伝子は ICR の DNA メチル化消失に伴い両アレルから発現していることが分かった。また、ES 細胞で一度消失したインプリントは分化後においてもそのメチル化は獲得されず、さらには、インプリントを消失した 2i/L-ES 細胞からは核移植によるクローンマウス、四倍体補完法による全身 ES 細胞に由来するマウス個体が得られなかった。このことから、配偶子から引き継がれる DNA メチル化情報(インプリント)は正常な個体の発生に重要であることが示唆された。最後に、2i/L 培地によるこれら課題点を克服するために、インプリントの記憶および個体発生能を維持した ES 細胞の樹立条件を探索した。MAPK 経路の抑制と DNA 低メチル化が関連付けられているように、MEK1/2 阻害剤の濃度を低くする方法および MEK1/2 阻害剤を Src 阻害剤で代替する方法によって樹立された ES 細胞は ICR のメチル化状態を保ち、さらには高い個体発生能を有していることが分かった。本研究成果は、高品質なマウスおよびヒトの多能性幹細胞の樹立・維持へ応用できると期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

マウス ES 細胞は血清および LIF(白血病阻止因子)を含む培地(S/L 培地)を用いて維持されてきたが、S/L 培地で培養した ES 細胞は DNA メチル化状態が内部細胞塊と比して高いことが分かっている。近年 MEK1/2 阻害剤および Gsk3 β 阻害剤を加えること(2i/L 培地)により効率良く ES 細胞を樹立・維持することが可能となった。しかしながら、2i/L 培地で樹立・維持した ES 細胞のエピゲノム状態の安定性や、その品質については詳細に解析されていない。本研究では、父方母方ゲノムの区別が可能なマウスの掛け合わせ(129/MSM)により得た胚盤胞から 2i/L 培地と S/L 培地を用いて ES 細胞を樹立し、DNA メチル化解析を行った。2i/L-ES 細胞はゲノム全域にわたり DNA 低メチル化状態にあり、さらに、2i/L-ES 細胞では受精後において維持されるべきインプリント領域の DNA メチル化も低下していた。また、インプリントを消失した 2i/L-ES 細胞からは核移植によるクローンマウス、四倍体補完法によるマウス個体が得られなかった。このことから、配偶子から引き継がれるインプリントは正常な個体の発生に重要であることが示唆された。最後に、MEK1/2 阻害剤の濃度を低くする方法および MEK1/2 阻害剤を Src 阻害剤で代替する方法で樹立した ES 細胞はインプリントを保ち、高い個体発生能を有していることを明らかにした。

以上の研究は、高品質なマウスおよびヒトの多能性幹細胞の樹立・維持への応用に貢献し培養技術の向上および多能性幹細胞のエピゲノム制御機構の解明に寄与するところが多い。従って、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 29 年 10 月 6 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