

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	木村 瑞希
論文題目	細胞リプログラミングにおけるWNT2/ β -catenin経路の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>体細胞にリプログラミング因子と呼ばれる転写因子を導入することで、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等の分化能を持つ人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) にリプログラミングされる。リプログラミング過程における分子機構については、網羅的な遺伝子発現解析などからその機構が徐々に明らかになってきたが、リプログラミング過程におけるシグナル伝達経路の役割については未解明な部分が多い。</p> <p>本研究において申請者は、OCT3/4、KLF4、SOX2 (以下 OKS) を用いたリプログラミング過程において、内在性 Wnt/β-catenin 経路の一過的な活性化がリプログラミングを促進することを明らかにした。マウス線維芽細胞 (以下 MEF) に OKS を導入し、リプログラミングを誘導した。免疫染色により β-catenin の細胞内局在を調べると、リプログラミング過程で一過的に β-catenin が核内に移行することが見出された。さらに、Wnt/β-catenin 経路のレポーターを用いた実験から、リプログラミング過程で Wnt/β-catenin 経路が活性化すること、またリプログラミング初期に Wnt/β-catenin 経路が活性化した細胞集団からより多くの iPS 細胞コロニーが形成されることが分かった。リプログラミング過程において Wnt/β-catenin 経路を活性化する Wnt リガンドを同定するため、リプログラミング過程におけるマイクロアレイデータの解析と定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、哺乳類で 19 種存在する Wnt リガンドの中で、<i>Wnt2</i> のみがリプログラミング過程において発現が上昇することが明らかになった。MEF を用いたリプログラミングでは、リプログラミング初期に体細胞マーカーである <i>THY1</i> の発現が抑制されることが知られている。<i>THY1</i> 陽性および陰性細胞集団における <i>Wnt2</i> の発現を調べると、<i>Wnt2</i> は <i>THY1</i> 陽性細胞、つまりリプログラミング初期の細胞で主に発現していることが見出された。そこで、<i>Wnt2</i> の発現が導入したリプログラミング因子によって直接制御されているのではないかと考え、ChIP アッセイを行った結果、<i>Wnt2</i> の発現は OCT3/4 によって直接制御される可能性が示唆された。<i>Wnt2</i> をノックダウンすると、β-catenin が核内移行している細胞数、および形成される iPS 細胞コロニー数が減少し、WNT2 の過剰発現では逆の効果が見られた。Wnt/β-catenin 経路の阻害剤を添加した場合も、β-catenin が核内移行している細胞数、形成される iPS 細胞コロニー数が減少し、活性化剤の添加では逆の効果が見られた。また、<i>Wnt2</i> をノックダウンした細胞に Wnt/β-catenin 経路の活性化剤を添加すると、β-catenin が核内移行している細胞数、形成される iPS 細胞コロニー数はレスキューされた。さらに、リプログラミング過程における <i>Wnt2</i> による Wnt/β-catenin 経路活性化の役割を明らかにするため、BrdU 取り込み実験を行い、細胞増殖能を調べた。その結果、細胞増殖能は <i>Wnt2</i> ノックダウンによって低下し、WNT2 過剰発現によって向上した。また、<i>Wnt2</i> ノックダウンによる細胞増殖能の低下は、Wnt/β-catenin 経路活性化剤の添加によってレスキューされた。</p> <p>本研究により、リプログラミング過程で WNT2 による内在性 Wnt/β-catenin 経路の活性化が細胞増殖を促進し、リプログラミングを促進することが明らかになった。Wnt/β-catenin 経路は多能性維持や分化に重要であることが報告されているが、本研究成果により多能性の獲得にも内在性 Wnt/β-catenin 経路が重要な役割を担うことが示唆された。</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Wnt/ β -catenin経路について解析し、WNT2による内在性のWnt/ β -catenin経路の活性化がリプログラミングに重要であることを明らかにした。これまでに細胞リプログラミング過程におけるシグナル伝達経路については未解明な部分が多かった。そこで申請者は、リプログラミング過程における内在性のWnt/ β -catenin経路について解析を行った。申請者はまず、マウス線維芽細胞(以下MEF)にOCT3/4、KLF4、SOX2(以下OKS)を導入することでリプログラミングを誘導し、リプログラミング過程でWnt/ β -catenin経路が活性化しているかを調べた。その結果、 β -cateninの免疫染色とWnt/ β -catenin経路のレポーターである7TGPを用いた実験から、リプログラミング初期にWnt/ β -catenin経路が活性化することを見出した。さらに、リプログラミング初期においてWnt/ β -catenin経路が活性化した細胞はよりリプログラミングが進行したステージにあり、iPS細胞になる傾向が高いことを示した。また申請者は、リプログラミング過程における遺伝子発現解析を行い、リプログラミング過程でWnt2の発現が一過的に上昇することを見出した。MEFのリプログラミング初期に発現が減少する間葉系マーカーTHY1に着目し、FACSセルソーターを用いた解析から、Wnt2は主にTHY1陽性細胞で発現することを示した。さらに、OCT3/4が主体となり、KLF4、SOX2と協調してWnt2の発現を制御する可能性が示唆された。次に申請者は、Wnt2ノックダウン、およびWNT2過剰発現を行った。その結果、Wnt2ノックダウンによって、 β -cateninが核内移行している細胞数は減少し、リプログラミング効率が低下すること、また、WNT2過剰発現によって β -cateninが核内移行している細胞数は増加し、リプログラミング効率が向上することを見出した。さらに、Wnt/ β -catenin経路の阻害剤、活性化剤によるリプログラミングへの影響についても検討し、阻害剤の添加によってリプログラミング効率は低下、活性化剤の添加によって向上することを示した。また、Wnt2ノックダウンの効果はWnt/ β -catenin経路活性化剤の添加によってレスキューされ、WNT2過剰発現の効果はWnt/ β -catenin経路阻害剤の添加によって抑制されることを示した。最後に申請者は、BrdU取り込み実験を行い、リプログラミング過程におけるWNT2/ β -catenin経路が細胞増殖能の向上に寄与する可能性を示した。以上の結果から、MEFのリプログラミング初期におけるWNT2による内在性のWnt/ β -catenin経路の活性化がリプログラミングを促進することを見出した。本論文は、リプログラミング過程における内在性のWnt/ β -catenin経路の重要性を提示し、リプログラミングの分子機構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30年1月29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