

Title	ES細胞由来未分節中胚葉様組織誘導法の開発とそれを用いた分節時計遺伝子の発現振動解析(Abstract_要旨)
Author(s)	松宮, 舞奈
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-03-25
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21925
Right	許諾条件により本文は2020-03-24に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	松宮 舞奈
論文題目	ES細胞由来未分節中胚葉様組織誘導法の開発とそれを用いた分節時計遺伝子の発現振動解析		
(論文内容の要旨)			
<p>脊椎動物の脊椎・肋骨・骨格筋・皮下組織は、発生初期に形成される体節から分化する。体節は、尾部先端に存在する未分節中胚葉(presomitic mesoderm, PSM) から一定時間毎にくびれ切れること(分節)によって神経管の両側に対で形成される。マウスの体節は約2~3時間周期で形成されるが、この周期的な体節形成過程は分節時計遺伝子と呼ばれる<i>Hes7</i>によって制御される。<i>Hes7</i>の発現はネガティブフィードバック機構によってPSM個々の細胞で振動(オシレーション)しており、その位相が隣接細胞間で同期することによりPSM全体で尾部から頭部方向へ進行波を形成する。この進行波がPSMの頭部側にたどり着くと体節が形成される。<i>Hes7</i>の発現が無くなる、あるいは持続すると体節が癒合することから、体節形成には<i>Hes7</i>の発現が同期振動することが不可欠である。しかし、隣接細胞間で同期振動する分子機構の全貌は分かっていない。</p> <p><i>Hes7</i>の同期振動を制御する新規遺伝子やシグナル経路を同定する一つの有効な手段として薬剤ライブラリーを使ったスクリーニングが考えられたが、<i>Hes7</i>の同期振動を示す適当な培養細胞が無いと、生きた胎仔を使うしか方法がなかった。しかし、大量のマウス個体を用意することは困難なため、マウス個体にとって代わるツールが必要であった。そこで、2015年に報告された胚性幹(ES)細胞から筋組織を分化誘導する方法を参考に、マウスES細胞から生体のPSMと同等の性質を持つPSM様組織(induced-PSM, iPSM)への分化誘導法の開発を試みた。分化誘導後に経時的にサンプルを回収し、各種マーカー遺伝子の検出を行うことで、未分化細胞から中胚葉様細胞、PSM様細胞、体節様細胞へと効率よく誘導する条件を確立した。また、iPSMのサイズが<i>Hes7</i>の発現量と同期振動の振幅に大きな影響を与えることが判明した。さらに、<i>Hes7</i>プロモーターを用いた発光レポーターベクターを導入したマウスES細胞から分化誘導したiPSMをリアルタイム・イメージングにより解析した結果、<i>Hes7</i>の同期振動や進行波、さらには分節過程が観察できた。したがって、本研究の分化誘導方法は効率的に<i>in vivo</i>の発生過程を再現できる実験系であると考えられた。</p> <p>次に、<i>Hes7</i>の同期振動に関わる新たな因子やシグナル経路を明らかにするため、エピゲノム関連因子、細胞周期関連因子、ホルモンに対する各種阻害剤や活性化剤など、計430種類の薬剤を使用してスクリーニングを行った。その結果、<i>Hes7</i>の同期振動の周期に大きく影響を与える薬剤をいくつか発見した。さらに、検出した<i>Hes7</i>の発現パターンに着目して解析を行ったところ、興味深いことにBET familyタンパク質の各種阻害剤を使用したほぼ全ての条件で<i>Hes7</i>の同期振動が減弱して定常状態になることが分かった。したがって、BET familyタンパク質が<i>Hes7</i>の同期振動に関与している可能性が示唆された。また、これらの薬剤の一つを用いて<i>Hes7</i>レポーターマウスのPSM組織のリアルタイム・イメージングを行ったところ、iPSMと酷似した<i>Hes7</i>発現パターンを示した。以上から、iPSMは生体PSMとほぼ同等の性質を持ち、生体PSMの代替ツールになると結論付けた。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

体節形成過程では、未分節中胚葉(PSM)において *Hes7* の発現が隣接細胞間で同期振動する。この振動の位相が隣接細胞間でずれると、分節が乱れて体節が癒合することから、同期振動は *Hes7* の機能に必須である。この発現振動の同期化には Notch シグナルが重要な役割を担うことが明らかにされてきたが、それだけでは不十分で、新規因子の存在が示唆されてきた。しかし、詳細な解析には生体の PSM を使うしか有効な手段がなく、より簡便に *Hes7* の同期振動を解析できる技術開発が望まれていた。

そこで、本論文では、*Hes7* の発現が同期振動する細胞培養系の開発を試みた。先行研究で胚性幹(ES)細胞から PSM 様細胞を分化誘導する方法が報告されていたが、その方法では *Hes7* の同期振動は観察されなかった。そこで、分化誘導の初めのステップを丸底培養皿で浮遊培養する方法に変更することによって、より生体の PSM に近い組織を誘導することに成功した。この PSM 様組織では *Hes7* の同期振動や分節過程が観察できており、*in vivo* における PSM の発生過程に酷似していた。しかもこの手法は簡便で非常に再現性が高いことから、薬剤ライブラリーのスクリーニングにも使えることが示された。実際に、この細胞培養系を使って 430 種類の薬剤をスクリーニングした結果、BET family タンパク質の阻害剤が *Hes7* の同期振動を止めて定常的な発現に変えることを見出し、BET family タンパク質は *Hes7* の同期振動を制御する新規因子であることを明らかにした。また、*Hes7* の同期振動の周期を長くしたり短くしたりする薬剤も新たに発見し、同期振動に関わる因子群の全体像の理解に大きな貢献をした。この培養系は遺伝子改変も簡便に行うことが可能であり、生体の PSM に代わる新たなツールとして使用可能であることが示された。

本論文は、生命科学に関する高度で幅広い学識、優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。特に、体節形成分野における遺伝子発現動態の解明に向けた研究を飛躍的に進める新たな手法の開発に成功しており、その有用性を明確に示した。よって、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。

平成31年1月30日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、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