

京都大学	博士（医科学）	氏名	大友 淳
論文題目	Uniform transgene activation in Tet-On systems depends on sustained rtTA expression (Tet-On システムにおける均一な遺伝子発現は持続的な rtTA 発現に依存する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>テトラサイクリン応答型制御システム (Tet-On システム) は、外来性の遺伝子発現を制御する遺伝子工学ツールである。この制御は主に Tet-On プロモーター、reverse tetracycline transactivator (rtTA)、低分子化合物のドキシサイクリン (Dox) の3つによって実現されている。Dox 存在下で rtTA は Tet-On プロモーターに結合することで、その下流にある遺伝子を発現させる。Tet-On システムは簡便かつ効率的な遺伝子発現制御を実現できることから、幅広い研究分野で応用されている。特にヒト iPS 細胞 (hiPSC) では、特定の細胞種へと分化させられるマスター転写因子発現に応用することで、細胞分化を任意のタイミングで行うことが可能となる。しかし、しばしば Dox に応答せず遺伝子を発現しない細胞集団が観測されるため、高効率な細胞分化には Dox 応答性の細胞を単離する必要がある。このようなクローン作製は煩雑で時間を要するため、Dox 不応答性の改善は Tet-On システムの hiPSC への応用における課題である。</p> <p>本研究では、hiPSC から筋細胞への効率的な分化誘導のため、筋細胞分化のマスター転写因子である MYOD1 遺伝子を Tet-On システムで発現誘導できるオールインワンベクター (Tet-MyoD ベクター) を作製した。このベクターは MYOD1 とレポーター遺伝子 mCherry とを IRES によって繋げた融合遺伝子発現を Tet-On プロモーターによって制御し、rtTA とネオマイシン耐性遺伝子 (NeoR) との融合遺伝子を EF1<math>\alpha</math> プロモーターによって恒常発現する機能を搭載している。Tet-MyoD ベクターを hiPSCs に導入し、G418 投与により遺伝子導入細胞のみを選択し、Dox 依存的に筋分化する Tet-MyoD hiPSCs を作製した。この細胞を Dox 投与により分化誘導すると、mCherry/MYOD1 陽性のみならず陰性の細胞集団も観測され、筋細胞分化効率はおおよそ 50%程度であった。FACS により mCherry 陽陰性の細胞集団を分離し遺伝子発現解析を行った結果、mCherry 陰性の細胞では rtTA 遺伝子発現が著しく低下していた。Tet-MyoD hiPSCs に rtTA 遺伝子を強制発現するベクターを追加導入したところ、mCherry 陽性率と筋分化の改善が認められた。以上から Dox 不応答性の細胞集団は rtTA 遺伝子発現に依存していることが明らかとなった。先行研究において、薬剤選択マーカーにピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR) を採用した遺伝子発現ベクターは目的遺伝子を高効率に発現させられることが報告されている。そこで、当初採用した NeoR を PuroR に変更すると、rtTA 遺伝子発現が極めて安定化することを見出した。その結果 mCherry 陰性の細胞が激減し、rtTA 遺伝子発現ベクターを追加せずとも筋細胞分化効率を 90%近くまでに改善させることに成功した。</p> <p>以上の結果により、hiPSC における Tet-On システムの Dox 不応答性の細胞集団は rtTA 遺伝子発現に依存し、薬剤選択マーカーに PuroR を採用することで、クローン選択することなく薬剤選択のみで高効率な筋細胞分化誘導が可能となった。本研究成果は MYOD1 遺伝子を活用した筋細胞分化に留まらず、様々な細胞種特異的なマスター転写因子の強制発現を主軸とした hiPSC からの細胞分化誘導法にも応用できることが期待される。そのため、この成果は疾患特異的 hiPSC を用いた病態研究の発展に貢献すると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

テトラサイクリン応答型制御システム (Tet-On システム) は、ドキシサイクリン (Dox) に応答することで簡便かつ効率的な遺伝子発現を実現する遺伝子工学ツールである。ヒト iPS 細胞では、特定の細胞種へと分化させられるマスター転写因子発現に応用することで、細胞分化を任意のタイミングで行うことが可能となる。しかし、しばしば Dox に応答せず遺伝子を発現しない細胞集団が観測されるため、高効率な細胞分化には Dox 応答性の細胞を単離する必要がある、煩雑で時間を要していた。Dox 不応答性の改善は Tet-On システムのヒト iPS 細胞への応用における課題である。

本研究では、Dox 不応答性の細胞集団において rtTA 遺伝子発現が低下していることを明らかにし、薬剤選択マーカーにピューロマイシン耐性遺伝子を Tet-On システムに採用することで、rtTA 遺伝子発現を極めて安定化させられることを見出した。これらの知見を基に作成した筋細胞分化遺伝子である MYOD1 発現ベクターは、Dox 応答性の細胞の単離やクローン作成の工程を経ずとも薬剤選択のみで MYOD1 陽性率を向上させ、ヒト iPS 細胞からの筋細胞分化効率を 90%近くまでに改善させ、従来の手法よりも簡便かつ高効率な筋細胞分化誘導法の開発につながった。

以上の研究はヒト iPS 細胞を活用した筋疾患病態の解明研究に貢献し、今後の筋疾患治療研究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、令和 6 年 1 月 10 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