

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	横 川 隆 太
論文題目	In vitro reconstitution of epigenetic reprogramming in the human germ line （ヒト生殖系列におけるエピゲノムリプログラミングの体外再構成）		
（論文内容の要旨） 生殖細胞は唯一、世代を超えて生命の継承を担う特別な細胞である。始原生殖細胞は胚発生時に出現する生殖細胞の起源であり、全発生能を再獲得し、次世代へのゲノム情報の伝達を実現するために、ゲノムに付加された後成的情報を初期化・刷新するエピゲノムリプログラミングをおこなう。始原生殖細胞の発生機構の解明は、遺伝情報を継承する機構やエピゲノム制御機構を理解することに直結し、幹細胞の増殖や分化の制御技術の開発のみならず、不妊や遺伝病、エピゲノム異常の発生機序を解明することにもつながる。一方で始原生殖細胞は受精後 2 週の胚発生初期に一時的に現れる少数の細胞で、生物学的・倫理的にアプローチが困難であった。 これまでの研究で、ヒト多能性幹細胞から始原生殖細胞様細胞(Primordial Germ Cell-like Cells: PGCLCs)を誘導し、さらにマウス胎児卵巣体細胞を用いた異種間再構成卵巣培養によりエピゲノムリプログラミングを誘導し、卵原細胞に分化させる方法が報告されたが、分化過程の不明瞭さや細胞収量の低さが難点であった。また、マウス胎児卵巣体細胞を用いずヒト PGCLCs を維持培養する方法も報告されたが、分化が進行しないことや、雌性(XX)多能性幹細胞株由来 PGCLCs の維持培養が困難なことが問題であった。 これらの問題点を克服し、ヒト PGCLCs を増殖・分化・成熟させ、配偶子形成に至る発生機構を解明する基盤を形成するため、本研究では基礎培地やサイトカイン・化合物のスクリーニング、適切な雌性(XX)多能性幹細胞株の選定と培養条件の最適化を行い、BMP（Bone Morphogenic Protein）シグナルを用いることで、雄性(XY)・雌性(XX)ヒト PGCLCs を 100 億倍以上に増殖させ、エピゲノムリプログラミングを誘導し、前精原細胞・卵原細胞に分化させる方法の開発に成功した。培養過程でみられる遺伝子発現の変化や全ゲノムの DNA 脱メチル化過程は生体内の過程に類似していた。BMP シグナルは、MAPK/ERK 経路を抑制し、同時に DNA メチル基転移酵素の発現を低下させ、これにより、複製に伴う受動的 DNA 脱メチル化が促進されることが示唆された。さらに、能動的脱メチル化に関与する <i>TET1</i> をノックアウトしたヒト PGCLCs を作成し BMP シグナル駆動条件下で培養した。<i>TET1</i> の欠失により、通常はポリコム抑制性複合体により抑制される遺伝子群が脱抑制され、ヒト PGCLCs は羊膜を含む胎外組織への異常な分化を示した。また、精子および卵子形成に不可欠な遺伝子を完全には活性化せず、そのプロモーター領域は高メチル化状態を維持した。本研究成果は、ヒト生殖細胞の発生機構を解明し、ヒト生殖細胞試験管内造成研究を推進する重要なマイルストーンであり、不妊症等の疾患機序解明および治療戦略開発への基盤となることが期待される。			

(論文審査の結果の要旨)			
遺伝情報の継承を担う生殖細胞は、エピゲノムリプログラミングを遂行し、性分化と全能性獲得の基盤を形成する。エピゲノムリプログラミングの分子機構の解明は、遺伝情報継承機構の解明に寄与し、生物学や発生工学、生殖医学の発展に貢献する。 本研究は、ヒト雌性 iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) に由来するヒト始原生殖細胞様細胞 (Primordial Germ Cell-like Cells: PGCLCs) に、サイトカイン等、規定された条件を用いてエピゲノムリプログラミングを誘導し、卵原細胞に分化させることを目的とした。複数のヒト雌性 iPS 細胞株から誘導したヒト PGCLCs を、フィーダー細胞上で、BMP (Bone Morphogenic Protein) を含む培養条件で培養したところ、ヒト PGCLCs は、正常な核型で顕著な増幅を示し (4 ヶ月程で最大 100 億倍)、卵原細胞特異的マーカーを発現する細胞に分化した。ゲノムワイド な DNA メチル化及び遺伝子発現解析の結果、ヒト PGCLCs 由来細胞は、ゲノムワイド な DNA 脱メチル化を起こし、卵原細胞特異的遺伝子発現パターンを獲得することが示され、本培養系は、エピゲノムリプログラミングとそれに伴う卵原細胞分化を再現することが明らかになった。 以上の研究は、ヒト生殖系列におけるエピゲノムリプログラミングの体外再構成を実現し、ヒト生殖細胞発生を制御する分子機構の解明に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士(医学)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 12 月 11 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			