

京都大学	博士（農学）	氏名	築山智之
論文題目	人工多能性幹細胞株を樹立するための培養条件評価系に関する研究		
(論文内容の要旨)			
人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の樹立は、多能性幹細胞を用いた細胞移植医療の実現への大きなブレークスルーと期待されているが、実際の臨床応用には、大型哺乳動物を用いた前臨床試験や遺伝子改変により作製した疾患モデル動物が必須となる。これまで、マウス ES 細胞を用いたジーンターゲティング技術により、遺伝子の機能解析や疾患モデル動物の作製が進み、医学・生物学に大きな進展がもたらされた。しかし、マウス ES 細胞の樹立から約 30 年が経過した現在においても、マウス、ラット等の齧歯類以外の動物種において、組織や臓器のみならず、個体形成や生殖細胞形成に寄与するような“真”の意味での多能性幹細胞株の樹立に関する報告は皆無といつてよい。 これまでの研究から、体細胞へのリプログラミング因子の導入と発現誘導により、細胞を多能性の“前駆”状態に誘導できることが知られている。しかし、齧歯類以外の動物種では、その後の多能性幹細胞への誘導には成功していないことから、細胞の多能性のキャラクターを最終的に決定している要因は、多能性前駆細胞の培養条件にあると考えられる。そこで本研究では、これまでマウスやヒトで確立されている iPS 細胞株樹立系をベースとし、家畜を含む多様な哺乳動物種において、個体形成に関与しうような多能性幹細胞株樹立のための培養評価系を構築することを目的とした。 まず、多能性因子の発現と培養条件との関連を検討するために、様々な動物種由来の線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて <i>Oct3/4</i>、<i>Klf4</i>、<i>Sox2</i>、<i>c-Myc</i> および赤色蛍光マーカー遺伝子を導入後、増殖因子、エピジェネティック制御因子、分化抑制因子などを含む培養液中で培養し、細胞のリプログラミング誘導を試みた。その結果、ブタ、イヌ、ウサギにおいてヒト ES 細胞様の形態を示す細胞株を樹立した。樹立された細胞株は、多能性関連遺伝子産物である OCT3/4 および NANOG 蛋白質を発現し、胚様体形成を介して三胚葉に分化できることを示した。一方で、これらの細胞株では、内因性の多能性関連遺伝子の発現は不十分であり、導入した外来因子発現はサイレンシング機構によって抑制されることなく、テラトーマ形成も見られないことが明らかとなった。以上のことから、これらの動物種では、比較的容易に iPS 細胞を樹立できるものの、細胞への完全な多能性の誘導・維持には不十分であり、“真”の iPS 細胞の作製には新規の培養条件の探索が必要であることが明らかとなった。 ついで、初代 iPS 細胞コロニーの培養条件について検討した。培養液に添加する分化阻害因子の影響を調べたところ、ブタ細胞を用いた場合、MEK/ERK 阻害剤と GSK3 阻害剤の 2 阻害剤、あるいは前記阻害剤に ALK5 阻害剤を加えた 3 阻害剤の存在下では、コロニーの形態がマウス ES 細胞様に変化することを見出した。しかし、これらの細胞では、外来性多能性因子の発現抑制が不十分であり、アルカリフォスファターゼ活性を示さず、長期間の維持培養ができず、最終的に株化には至らなかった。以上の結果から、マウスやヒトの iPS 細胞樹立系は、家畜などの哺乳動物種においては機能せず、まったく新しい培養系を開発する必要性が示唆された。 上記のレトロウイルスを用いたリプログラミング誘導法では、導入遺伝子や内因性の多能性関連遺伝子の発現制御が困難であることから、マウスなどの多能性幹細胞で特異的に機能するエンハンサー領域（EOS）をもつレポーターおよびドキシサイクリンの添加によって発現制御が可能なユニットからなる piggyBac トランスポゾンベクター系の開発を試みた。前項で樹立したブタ iPS 細胞に EOS レポーターを導入して多能性細胞の選抜培養を試みたところ、外来因子の発現が抑制され、内因性多能性遺伝子が発現上昇			

することを示し、EOS レポーターがマウス以外の動物種においても多能性の選抜指標として使用できることが明らかになった。

さらに、上記トランスポゾンベクターの改良を行い、*Oct3/4* (O)、*Klf4* (K)、*Sox2* (S) の順序でリプログラミング因子を搭載した OKS ベクターおよび c-Myc ベクターの組み合わせを用いることで、多数の ES 細胞様コロニーが出現することを示した。これらのコロニーの大部分は、ドキシサイクリン存在下で外来因子発現が誘導されている時には、内因性の多能性遺伝子の発現は抑制され、逆に、ドキシサイクリンを除去することによって、内因性多能性遺伝子の発現が高まるような、多能性遺伝子の発現制御が可能になった。また、適切に外来遺伝子発現が抑制された場合には、リプログラミング効率が従来のレトロウイルスベクターによる導入法よりも高まることを明らかにした。

次に、OKS ベクターと c-Myc ベクターあるいは L-Myc ベクターの組み合わせを用い、さらに EOS レポーターを搭載した piggyBac トランスポゾンベクターをマウス繊維芽細胞に導入して、新規に作製したベクター系と多能性幹細胞の選抜系が、真の多能性基底状態にある iPS 細胞を樹立できるか否かについて評価した。この系によって樹立した iPS 細胞株は、ES 細胞様のコロニー形態を有し、様々な多能性関連遺伝子を発現していること、胚様体およびテラトーマ形成を介して三胚葉に分化できること、さらに、高いキメラ寄与能と生殖細胞への分化能を有することを示した。

以上のことから、多能性細胞を選抜する EOS レポーターとリプログラミング因子を搭載した piggyBac ベクターを用いることによって、マウス以外の家畜等の動物種においても、リプログラミング誘導後の培養細胞から多能性幹細胞を選抜し、多能性細胞の樹立と維持に有効な培養系の評価を可能にするレポーター選抜システムを構築した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

哺乳動物において、組織や臓器への分化のみならず、個体形成が可能な多能性分化能をもつ細胞株は、これまでにマウスとラットで樹立されているにすぎない。家畜のような大型哺乳動物を医療モデルや遺伝子改変動物の作出などに応用する場合、個体形成能をもつ多能性幹細胞の有用性は極めて大きい。これまでこの種の試みが成功していない要因として、体細胞に効率的にリプログラミングを誘導し、リプログラムされた細胞のみを選抜できるような、実験システムが整備されていないことがあげられる。そこで本研究では、ヒトやマウスで用いられているiPS細胞誘導系を用いて、体細胞のリプログラミングを効率的に誘導しうる培養評価系の構築を試みている。得られたおもな成果は以下のとおりである。

1) レトロウイルスベクターを用いた*Oct3/4*(O)、*Klf4*(K)、*Sox2*(S)および*c-Myc*のリプログラム因子の導入によって、ブタ、イヌ、ウサギの体細胞でiPS細胞が得られた。しかし、これらの細胞株の多能性は、導入した外因性リプログラミング因子の発現に依存するものであり、テラトーマ形成能を欠くなど、多能性幹細胞としての性質は不十分であった。

2) 上記初代iPS細胞に対して、種々の分化抑制因子(MEK/ERK、GSK3、ALK5等の阻害剤)を培養液に添加して、iPS細胞の継続的な維持を試みたところ、iPS細胞はマウスES細胞様に形態変化したが、ES細胞に類似した多能性を示さないことが明らかとなった。

3) 上記のレトロウイルスベクターでは、外来のリプログラミング因子の発現制御は困難であることから、新たに、多能性幹細胞で特異的に発現制御可能なEOSエンハンサーと、ドキシサイクリン(Dox)の添加によってリプログラミング因子の発現制御が可能なpiggyBacトランスポゾンベクター系を開発した。この系を用いることにより、Dox存在下でリプログラミング因子を発現させ、Doxを除去することで内因性の多能性遺伝子の発現を誘導することが可能になった。

4) EOSをレポーターとして用い、OSKベクターと*c-Myc*あるいは*L-Myc*ベクターを導入したpiggyBacベクターシステムを用いて、個体形成に寄与しうるES細胞様のiPS細胞の樹立効率を検討した結果、OSKと*L-Myc*を組み合わせたベクターによって、従来より効率的で、生殖細胞系列に高度に寄与するiPS細胞の樹立に成功した。

以上のように、本論文は、家畜などの大型哺乳動物において、体細胞からリプログラミング誘導をへて、個体構築が可能な多能性幹細胞を作製するための多能性幹細胞選抜系および培養評価系を構築したものであり、発生生物学、再生医学、家畜生産学、生殖生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年5月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降