

氏 名	ふじ 藤 もと 本 やす 康 こ 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3020 号
学位授与の日付	平 成 18 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Molecular Cloning and Function of Cynomolgus Monkey Oct-3 Isoforms in Primate Embryonic Stem Cells (カニクイザル胚性幹細胞における Oct-3 のアイソフォームの分子クローニ ングとその機能)
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 中 伸 弥 教 授 篠 原 隆 司 教 授 影 山 龍 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) は、胚盤胞の内部細胞塊より樹立された多能性細胞株であり、三胚葉系由来のすべての細胞系譜に分化可能で、生体外で長期間の自己複製が可能である。1981年にマウス ES 細胞が樹立され発生工学的に利用されてきたが、1990年代後半から2001年にかけて、ヒトをはじめ、カニクイザルなどヒト以外の霊長類でも ES 細胞が次々と樹立され、ES 細胞を再生医学に応用する期待が高まっている。近年、ヒトを含む霊長類とマウスで ES 細胞の未分化性を維持するシグナル伝達経路等での相違点が解明され、臨床応用への前段階として、霊長類の ES 細胞を用いた実験の重要性が増している。

Oct-3 は、マウス ES 細胞の未分化性を維持する鍵となる転写因子の一つで、マウス ES 細胞ではその発現量の厳密な制御が未分化性維持に重要であり、通常の1/2以下で栄養外胚葉へ、1.5倍以上で原始内胚葉系と中胚葉系に分化することが知られている。ヒトの Oct-3 はマウスと異なり、Oct-3A と Oct-3B の2つのスプライシングフォームが存在し、Oct-3A がマウスの Oct-3 のオースログとされているが、詳しい解析はされておらず、ヒト以外の霊長類 ES 細胞での Oct-3 の機能は全く報告されていない。そこで本研究では、霊長類 ES 細胞における Oct-3 の機能を調べるためカニクイザル ES 細胞から Oct-3 をクローニングし、過剰発現による影響を調べた。カニクイザル ES 細胞では Oct-3 はヒトと同様、Oct-3A, Oct-3B の2つのスプライシングフォームが発現し、ヒトと高い相同性を有していた。Oct-3A, Oct-3B の強制発現ベクターをカニクイザル ES 細胞に導入し安定発現株を作製したところ、得られたコロニーは形態からいずれも未分化状態を保持していると考えられたが、コロニーの総数は対照群に比べ、Oct-3A 導入群で約5割、Oct-3B 導入群で約6割に減少した。同じ発現ベクターで制限酵素の切断部位を換え Oct-3A, Oct-3B が発現しないように導入すると、対照群とコロニー総数に差異は見られず、よってコロニー数の減少は遺伝子導入効率の違いではなく、外因性の Oct-3A, Oct-3B の発現によるとわかった。安定導入株の Oct-3A, Oct-3B の蛋白質発現量を調べたところ、Oct-3A 株では対照 (モック導入) 群や野生型の Oct-3A の発現量の1.5倍を超える高発現株は存在せず、Oct-3A の過剰発現下では霊長類 ES 細胞は維持されることが示唆された。一方、Oct-3B の導入群では対照群や野生型の発現量の約5倍程度までの高発現株が得られ、Oct-3B と Oct-3A では ES 細胞における機能が異なることも示唆された。次に Oct-3A, Oct-3B の各発現ベクターをカニクイザル ES 細胞に一過的に導入し過剰発現における影響を経時的に検討したところ、導入後24時間から48時間で、Oct-3A 導入株で内胚葉系と中胚葉系のマーカー遺伝子の発現上昇がみられた。以上の結果から、カニクイザルではヒトと同様 Oct-3 に A と B のアイソフォームが存在し、両者とも ES 細胞で発現しており、それぞれ過剰発現させるといずれも ES 細胞の自己複製を妨げることが分かった。特に Oct-3A の過剰発現下では霊長類 ES 細胞は内胚葉系と中胚葉系への分化誘導の促進が見られたことから、霊長類 ES 細胞の未分化状態の維持にはマウスの Oct-3 と同様に Oct-3A の厳密な発現量の制御が重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒト ES 細胞を用いた再生医学の臨床応用への前段階として、ヒト以外の霊長類 ES 細胞を用いた基盤研究は重要な役割をもち、そのため霊長類 ES 細胞の特性解析は不可欠である。Oct-3 は、マウス ES 細胞の未分化性維持に至適な範囲の発現量が必要な転写因子で、ヒトではマウス Oct-3 のオースログとされる Oct-3A と、そのアイソフォームとされる Oct-3B の存在が報告されているが、霊長類 ES 細胞での Oct-3 の機能は未だ不明であった。そこでカニクイザル ES 細胞での Oct-3 の発現を調べたところ、Oct-3A と Oct-3B が発現しており、それらはヒトと高い相同性を有していた。これらの機能解析のために強制発現ベクターを作成し導入したところ、3A を高発現した安定導入株は得られず、3B では高発現株でも未分化性が維持されていた。一過的な発現系では、3A を高発現させた場合のみで内胚葉・中胚葉のマーカー分子の発現がみられたことから、Oct-3A と 3B の機能が異なることが分かった。また最近、Oct-3 の RNA 干渉によって霊長類 ES 細胞で栄養外胚葉のマーカーが上昇するという報告がなされていることから、本研究と考え合わせると、霊長類 ES 細胞においてもマウスの Oct-3 同様、Oct-3 の適切な範囲内での発現が、ES 細胞の未分化維持に重要であることが明らかとなった。

以上の研究は霊長類 ES 細胞の未分化維持機構の解明に貢献し、再生医学の進歩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。尚、本学位授与申請者は平成18年10月4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。