

京都大学	博士（医学）	氏 名	坪岡 則子
論文題目	Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts (胚盤胞および線維芽細胞からの多能性幹細胞作成における Sall4 の役割)		
(論文内容の要旨)			
胚性幹（ES）細胞は、初期胚（胚盤胞）の内部細胞塊（ICM）より樹立された、自己複製能と分化多能性を有する細胞株である。その細胞特性は、Oct3/4, Sox2, Nanog, Klf4 や Zn フィンガータンパク質 Sall4 などの、未分化細胞特異的に発現する転写因子群が形成するネットワークによって支持されている。また、Oct3/4, Sox2 に加え、Klf4 もしくは Nanog の強制発現により体細胞は初期化され、人工多能性幹（iPS）細胞と呼ばれる ES 細胞様の未分化状態となることから、ES 細胞の特性を支持する転写因子群は体細胞の初期化にも貢献することが明らかになっている。 Sall4 は、発生過程において神経管形成、直腸-肛門形成などで必須であり、Sall4 ヘテロマウスは外脳症や直腸―肛門形成不全が認められる。初期発生でも必須であり、Sall4 欠損（KO）胚は着床直後に致死となり、原因として多能性細胞の増殖の低下が示唆されている。しかし、Sall4 KO 胚盤胞から ES 細胞は樹立できておらず、ICM からの ES 細胞株作成における Sall4 の機能は不明であった。さらに、体細胞から iPS 細胞を作成する際の Sall4 の役割についても解明されていない。 以上の背景のもと、本研究では、多能性幹細胞の樹立における Sall4 の機能を明らかにするため、①Sall4 KO ICM から、また、②マウスおよびヒト体細胞（線維芽細胞）から多能性幹細胞を樹立し、解析をおこなった。 本研究で作成した Sall4 変異マウスでも、ヘテロマウスで外脳症や直腸-肛門形成不全を、Sall4 KO では着床直後の胚形成異常や ICM の増殖低下などの表現型を確認する事ができた。 ① 胚盤胞からの多能性幹細胞（ES 細胞）樹立における Sall4 の役割 外観上正常なマウス Sall4 KO 胚盤胞より ES 細胞の樹立を試みたところ、支持細胞上で未分化な形態を示す ES 様細胞が得られた。しかし、KO ES 様細胞は樹立に長い時間を要し、メンデルの法則から期待される数より低い頻度でしか樹立できなかった。また、KO ES 様細胞株は共通して増殖が遅く、単一細胞から形成したコロニーの多くは分化形態を示した。一方で、KO ES 様細胞株間の遺伝子発現は大きな相違が認められた。KO ES 様細胞で Nanog 発現量の低下は認められなかったが、野生型 ES 細胞で Sall4 をノックダウンした際、または Sall4 KO ES 様細胞で Sall1 をノックダウンした際、Nanog の発現低下が認められたため、KO ES 様細胞株では、Sall4 の少なくとも一部の機能を Sall1 が代償していることが示唆された。 ② 線維芽細胞からの多能性幹細胞（iPS 細胞）樹立における Sall4 の役割 マウス胎仔線維芽細胞からの iPS 細胞樹立過程における Sall4 ノックダウンは、iPS 細胞の樹立効率を低下させる一方で、Sall4 の強制発現は樹立効率を高めた。また、数種類のヒト成人皮膚由来線維芽細胞（HDFs）株では、iPS 細胞樹立過程における SALL4 の強制発現は、樹立効率を高めるが、効率の向上が認められない細胞株も確認できた。効率の向上が認められた細胞株は、誘導前および誘導中の内在性 SALL4 の発現量が低いことが分かった。 以上の結果から、Sall4 は胚盤胞や線維芽細胞から多能性幹細胞を樹立する際に必要であり、かつ樹立効率の向上に寄与することを明らかにした。さらに、iPS 細胞作成時に、他の因子のリプログラミング能力を検証する上で、各 HDFs 株が実質的に異なるという性質は考慮しなければならない事項であることを示した。			

(論文審査の結果の要旨)			
ES細胞は、胚盤胞より樹立された、自己複製能と分化多能性を有する細胞株であり、その細胞特性は、Oct3/4,Sox2,Nanog,Klf4などの転写因子群が形成するネットワークによって支持されている。これらの転写因子は体細胞を初期化させ、ES細胞様の未分化な状態(iPS細胞)にする能力を有する。Sall4もまた、多能性幹細胞における転写因子ネットワークの主要因子である。初期発生でも必須であり、Sall4欠損胚は着床直後に致死となる。			
しかし、Sall4欠損胚盤胞からES細胞は樹立できておらず、胚盤胞からのES細胞株作成におけるSall4の機能は不明であった。また、体細胞からiPS細胞を作成する際のSall4の役割についても解明されていなかった。			
本研究で申請者は、Sall4欠損胚盤胞から未分化な形態を示すES様細胞を樹立することに成功した。長い時間を要し、低い頻度でしか樹立できなかったこれらのSall4欠損ES様細胞株では、Sall4の機能の一部をSall1が代償している可能性を示した。			
iPS細胞樹立過程におけるSall4ノックダウンは、iPS細胞の樹立効率を低下させた。Sall4の強制発現は樹立効率を高める一方で、効率が向上しないヒト成人皮膚由来線維芽細胞株も確認できた。			
これらの結果から、Sall4は胚盤胞や線維芽細胞から多能性幹細胞を樹立する際に必要でありかつ樹立効率の向上に寄与することを明らかにした。			
以上の研究は、胚性幹細胞および人工多能性幹細胞樹立の分子機構の解明に貢献し、幹細胞生物学および再生医療の発展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のあるものと認める。			
なお、本学位授与申請者は、平成21年3月25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			