

氏 名	安 達 啓 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3201 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 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 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Establishment of the Gene-Inducible System in Primate Embryonic Stem Cell Lines (霊長類 ES 細胞株における遺伝子発現制御系の構築)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 西 川 伸 一

論 文 内 容 の 要 旨

胚性幹細胞 (ES 細胞) は、体を構成するほぼ全ての細胞種に分化する多能性を持ち、培養下で未分化状態を保ったまま、無制限に増殖可能な自己複製能をも兼ね備えた株細胞である。この性質を利用し、特定の細胞に分化させた細胞を移植医療に用いることをめざした研究が進められている。

移植医療に必要な分化細胞を安定にかつ大量に供給するためには、未分化性維持機構や細胞分化機構の解明が不可欠となる。現在までの研究成果から、ヒトを含む霊長類 ES 細胞では、マウス ES 細胞と異なり LIF-STAT3 シグナル伝達経路による未分化性維持機構が機能していないなど、両者は様々な点で異なっていることが明らかになってきている。それ故、マウスでの解析だけでなくヒトを含めた霊長類 ES 細胞でも、これらの分子機構の解明が必須となる。しかし、霊長類 ES 細胞では、遺伝子導入効率が悪いことや遺伝子のサイレンシングを受けやすいことなどのため、遺伝子改変技術が難しく、遺伝子の機能を解析するために非常に有用な遺伝子発現制御系の報告はなかった。

いくつかある遺伝子発現制御系の中でも今回選んだ Tet-Off 遺伝子発現制御系は、可逆的に、様々な遺伝子の発現量を制御でき、*in vivo* での解析例も多く有力なツールである。

このシステムは、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン (Dox) が無い状態で、目的の遺伝子が発現し、Dox を添加することでその発現が抑制される。この系を利用して、未分化性維持遺伝子だと思われていたものが、その発現量によりマウス ES 細胞を分化させることが報告されている。

以下に、霊長類 ES 細胞では初めての報告となった Tet-Off 遺伝子発現制御系の構築過程と発現制御の確認方法についてまとめる。

まず、カニクイザル ES 細胞株 (CMK6) において、Tet-Off 調節プラスミド、続いて EGFP を組み込んだ応答プラスミドを導入することで、EGFP の発現を Dox の濃度依存的に制御できる二重安定 Tet-Off 細胞株を作製した。

この株は、調節プラスミドと応答プラスミドという 2 つの外來遺伝子の導入や Dox 添加の有無に関わらず、サル ES 細胞特有の形態を保ち、アルカリ性フォスファターゼ活性や Oct-3/4 の未分化マーカーの発現を有しており、未分化状態を保ったまま安定に維持できた。また、*in vitro* で胚様体 (EB) を形成でき、mRNA レベルで未分化マーカーの発現が減少し、三胚葉と栄養外胚葉の分化マーカーの発現が確認できた。さらに *in vivo* でも、SCID マウスの皮下に移植するとテラトーマを形成でき、三胚葉の組織が観察され、多分化能も保持していた。そして、Dox による EGFP の発現制御は、ES でも、EB、三胚葉に分化した細胞やテラトーマでも確認できた。

以上より、カニクイザル ES 細胞株において、ES 細胞としての性質を保持したまま、未分化状態で、さらに分化状態でも Dox に反応して EGFP 発現を制御できる Tet-Off 遺伝子発現制御系が確立できたことが示された。

この系の確立により、未分化性維持機構や細胞分化機構の解明だけでなく、発生過程に 関わる転写因子の発現量を時期特異的、細胞特異的に制御することで、様々な細胞や組織を効率よく作り出せる可能性もあり、将来の再生医療応用の基

礎研究にも有用だと考えられる。

論文審査の結果の要旨

霊長類 ES 細胞とマウス ES 細胞では、その未分化性維持機構に様々な相違点があることが、現在までの解析から報告されている。それ故、マウスでの解析だけでなく、霊長類 ES 細胞での分子機構の解明が重要である。しかし、霊長類 ES 細胞では、遺伝子改変が技術的に難しいことが知られており、特にその発現量が機能に大きく影響するような遺伝子を、詳細に解析するような場合に有用と考えられる遺伝子発現制御系については報告されていなかった。そこで本学位申請者は、可逆的に遺伝子の発現量を厳密に制御できるような解析系が必要だと考え、カニクイザル ES 細胞株において、Tet 遺伝子発現制御系を構築した。

Tet-Off 遺伝子発現制御系を導入した ES 細胞株は、2 つの外來遺伝子の導入やドキシサイクリン (Dox) 添加の有無に関わらず、ES 細胞としての未分化性、多分化性などの特性を保持したまま維持することが可能であった。応答遺伝子の発現は Dox 濃度依存的であり、分化状態においても制御することが可能であったことから、ES 細胞における詳細な遺伝子機能解析にこの制御系が有用であると期待される。

以上の研究は、霊長類 ES 細胞株での遺伝子発現制御系の確立により、未分化性維持機構や細胞分化機構の詳細な解明に貢献するだけでなく、発生過程に関わる転写因子の発現量を時期特異的、細胞特異的に制御することで、様々な細胞や組織を効率よく作り出せる可能性もあり、将来の再生医療等への応用を目指した基礎研究にも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平成 20 年 1 月 7 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。