

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏 名	田 邊 剛 士
論文題目	Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts (ヒト繊維芽細胞からのリプログラミングにおける主な障壁は、リプログラミングの開始ではなく、完成過程にある)		
（論文内容の要旨）人工多能性幹細胞（iPSC）の誘導効率は低く、0.2%程度である。効率が低い理由について詳細は不明であった。本研究では、リプログラミングを受けた細胞で特異的に発現する表面抗原 TRA-1-60 を見出し、この抗体を用いて一部のリプログラミングされた細胞のみを検出する系を開発した。リプログラミング因子を導入して 7 日後、12~24%の細胞が TRA-1-60 陽性であった。遺伝子発現解析の結果、体細胞マーカーの低下や分化多能性マーカーの上昇といったリプログラミングの進行に特徴的な現象が見られた。これらの結果は、リプログラミングの開始はごく一部の限られた細胞ではなく、多くの細胞で起こっていることを示している。しかし、一方で、これら TRA-1-60 陽性細胞からはやはり 1~数%程度の効率でしか iPSC はできてこない。このことから、TRA-1-60 陽性細胞が成熟して iPSC になる過程で何らかの障壁が存在すると考えられた。そこで、まず経時的に TRA-1-60 陽性細胞を純化し、単一細胞レベルにおける遺伝子発現を解析した。リプログラミング初期（7~15 日目）の細胞では分化多能性細胞マーカーや体細胞マーカーの発現は細胞間でばらつきが大きいことがわかった。一方で、20 日目以降のリプログラミング後期においては、TRA-1-60 陽性細胞の遺伝子発現は細胞間で均一性が上昇していた。単一細胞解析の結果は、初期の TRA-1-60 陽性細胞は非常に性質のばらつきが大きく、それらは成熟に伴って均一化していくことを示唆していた。さらに、純化した TRA-1-60 陽性細胞を再培養し、4 日後に再び TRA-1-60 の発現を調べると、50%以上の細胞が TRA-1-60 陰性になっていることを見出した。TRA-1-60 陽性から TRA-1-60 陰性になった細胞においては、体細胞マーカーが再び上昇し、分化多能性細胞マーカーは低下していた。この体細胞への逆戻りの割合は TRA-1-60 陽性細胞が成熟していくにしたがって低下した。これらの結果より、一度リプログラミングを受けて TRA-1-60 陽性になった細胞はその成熟過程において多くが TRA-1-60 陰性の体細胞方向に逆戻りすることを示唆していた。一方で、アポトーシスなどの細胞死は TRA-1-60 陽性細胞においては観察されるもが、限定的なものであった。これらの知見をもとに、これまでにリプログラミングの効率を上昇させると報告されている因子群が逆戻りを抑制するかどうかを検証した。Cyclin D1 や p53 shRNA は体細胞に逆戻りする細胞の割合を減少させることはなかった。一方で、LIN28 は TRA-1-60 陽性細胞が陰性に戻る効率を有意に減少させた。このことから、LIN28 はリプログラミングの過程で、体細胞への逆戻りを抑制し、iPSC の樹立効率改善に寄与していると考えられた。本研究の結果により、iPSC 樹立効率が低い大きな要因の一つが体細胞への逆戻りであることが明らかとなった。逆戻りを規定する分子機構は不明な点が多いが、LIN28 が関与し抑制することが明らかとなった。LIN28 は医療用 iPSC の作製にも用いられるリプログラミング増強因子の一つであり、本研究によって役割の一端が明らかにされたことにより、安全性の向上に貢献すると思われる。			

（論文審査の結果の要旨）人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPSC）の誘導効率は低く、0.2%程度である。効率が低い理由について詳細は不明であった。本研究では、リプログラミングを受けた細胞で特異的に発現する表面抗原 TRA-1-60 を見出し、この抗体を用いて一部の初期化された細胞のみを検出する系を開発した。リプログラミング因子を導入して 7 日後、12~24%の細胞が TRA-1-60 陽性であった。これらの遺伝子発現解析から、初期化の進行に特徴的な現象が検出された。これらは初期化の開始は一部の細胞ではなく、多くの細胞で起こっている事を示している。さらに、TRA-1-60 陽性細胞から iPSC が生じる事を明らかにした。しかし、TRA-1-60 陽性細胞からの iPSC 誘導効率は 1%程度である。TRA-1-60 陽性細胞が完成した iPSC になる過程に障壁が存在すると考えられた。純化した TRA-1-60 陽性細胞を再培養し、4 日後に再び TRA-1-60 の発現を調べると、50%以上の細胞が TRA-1-60 陰性に戻ることを見出した。iPSC 誘導効率を上げる因子、LIN28 は逆戻りを抑制した。本研究では、iPSC 樹立効率が低い大きな要因の一つが体細胞への逆戻りであることを明にした。以上の研究は iPSC 誘導過程のメカニズムの解明に貢献し iPS 細胞作製の効率化に寄与するところが多い。			
したがって、本論文は博士（医科学）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 25 年 8 月 2 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			