

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	平 野 邦 生
論文題目	Human and Mouse Induced Pluripotent Stem Cells are Differentially Reprogrammed in Response to Kinase Inhibitors （ヒトとマウス iPS 細胞のリン酸化阻害剤への反応性の違い）		
（論文内容の要旨）			
多能性幹細胞は自己複製能と多分化能をもつ特徴的な細胞種である。マウスでは 3.5 日齢胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹（ES）細胞、5.5-7.5 日齢胚のエピブラストに由来するエピブラスト幹（EpiS）細胞、8.5-12.5 日齢胚の始原生殖細胞に由来する胚性生殖（EG）細胞に加え、体細胞での転写因子の強制発現による再プログラム化で誘導される人工多能性幹（iPS）細胞が知られている。これらのマウス細胞種は多能性幹細胞の特性を共通に持ちながら、一方でそれぞれに独自のコロニー形態や細胞記憶をもつ。iPS 細胞誘導技術の向上はヒトやマウスを含む複数種の哺乳類における iPS 細胞の樹立を可能にした。ヒト iPS 細胞は遺伝子発現などの特性がヒト ES 細胞と酷似する。ヒト iPS 細胞のコロニー形態はキメラ形成能を持つマウス iPS 細胞よりもキメラ形成能をもたないマウス EpiS 細胞に似ていることから、ヒト iPS/ES 細胞はマウスにおける EpiS 細胞に対応するのではないかと推測されている。マウス ES 細胞においては、最小限の外来刺激因子により高度なキメラ形成能を持つグランドステートの細胞のみを選択する 2i(GSK3 & ERK リン酸化阻害剤)+LIF(Leukemia Inhibitory Factor) 培地が知られている。本研究は、ヒト iPS 細胞の 2i+LIF 培養により、よりマウス iPS/ES 細胞に近い特性を持つグランドステートヒト iPS 細胞を樹立するという発想のもとに研究を開始した。その結果、扁平なコロニー形態を持つヒト iPS 細胞から、ドーム状のコロニー形態を持つ 2i-iPS 細胞が樹立された。2i-iPS 細胞は、複数の体細胞種から異なる方法により樹立された iPS 細胞株から、100%の確率で樹立された。2i-iPS 細胞はトリプシン処理では継代できなかったが、コロニーの物理的乖離により半年以上の期間、20 代以上の継代ができ、凍結保存も可能であった。予想外にも、遺伝子発現解析の結果から、2i-iPS 細胞は胚発生の神経板期に存在する初期神経幹細胞であることが明らかになった。この事実は 2i-iPS 細胞が神経細胞、星状膠細胞、希突起膠細胞へ分化可能であることや、bFGF（basic Fibroblast Growth Factor）存在下でロゼッタ状神経管構造を形成することからも示された。2i-iPS 細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植したが、テラトーマ形成は全く見られなかった。以上の結果から、1) ヒト iPS 細胞とマウス EpiS 細胞は、コロニー形態は似ているが、リン酸化阻害剤への生理的反応が異なる、2) ヒト iPS 細胞は 2i+LIF 培地での培養により一週間以内に初期神経幹細胞へと効率よく分化する、ことが明らかになった。iPS 細胞由来の初期神経幹細胞は、神経疾患の病因解明や、脊髄損傷患者への神経細胞の移植治療への貢献が期待される。			

(論文審査の結果の要旨)			
ヒト人工多能性幹(iPS)細胞は単層で扁平なコロニーを形成し、マウス胚性幹(ES)/iPS細胞のドーム状のコロニーとは異なる。ヒトiPS細胞はその特徴的なコロニー形態からマウス着床早期胚のエピブラストに由来するエピブラスト幹(EpiS)細胞に対応すると推測されている。2i(ERKおよびGSK3リン酸化阻害剤)+LIF培地は、マウスES細胞に最小の外来刺激因子により、未分化性を維持しつつ自己複製する状態(グランドステート)をもたらす。本研究では、外来刺激への生理的応答からヒト多能性幹細胞とマウス多能性幹細胞の性質の違いを明らかにする目的で、2i+LIF培地を用いたヒトiPS細胞の培養を行った。 その結果、2i+LIF培地により、マウスのES/iPS細胞、EpiS細胞からは同様に、高いキメラ胚寄与能とドーム状のコロニー形態を持つグランドステートの細胞が選択される事を確認した。一方、ヒトiPS細胞からもドーム状の形態を持つコロニーが試みた全ての細胞株で出現したが、遺伝子発現解析や分化誘導実験の結果、予想外にもそれらは胚発生の神経板期に存在する初期神経幹(PNS)細胞であることが示された。ヒトiPS細胞由来のPNS細胞は、1週間以内に誘導され、長期間の維持と凍結保存が可能だった。また免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成は観察されなかった。 以上の結果は、ヒトiPS細胞は、マウスES/iPS細胞やEpiS細胞とはERK、GSK3シグナルへの生理的応答が異なり、2i+LIF培地によりヒトiPS細胞からPNS細胞が選択的に樹立できることを示している。ヒトiPS細胞由来PNS細胞は、神経疾患の病因解析や治療薬の開発、および患者個人の神経細胞移植による再生医療への応用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。 なお、本学位授与申請者は、平成23年12月28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			