

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	洪 炫楨
論文題目	Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway (p53-p21 経路による iPS 細胞の樹立抑制)		
(論文内容の要旨)			
細胞核の初期化は、線維芽細胞などの分化細胞を、分化多能性を持つ状態に戻すことである。MEF（マウス胎仔線維芽細胞）に <i>Oct4</i>, <i>Sox2</i>, <i>Klf4</i> および <i>c-Myc</i> の 4 つの転写因子もしくは <i>c-Myc</i> を除いた 3 つの因子をレトロウイルスベクターによって遺伝子導入することで初期化を引き起こし、多能性を持つ iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を樹立できることが報告された。しかしながら、iPS 細胞の樹立効率は非常に低く、レトロウィルスにより 4 因子を導入した MEF のわずか数%が iPS 細胞へとなるにとどまり、3 因子を用いた場合にはさらに十分の一程度まで効率が低下する。<i>p53</i> はヒトのがんの約 5 0 %で変異などの異常が認められるがん抑制遺伝子であり、DNA が損傷を受けた際に活性化されて、細胞分裂の停止と損傷の修復を誘導する。初期化誘導因子には、がん原遺伝子として知られる <i>c-Myc</i> や <i>Klf4</i> が含まれているため、これらの過剰発現によって <i>p53</i> が活性化されていることが予想されていた。また、<i>p53</i> は ES 細胞の多能性維持に重要な <i>Nanog</i> 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を抑制することが知られている。これらの知見から、初期化過程を <i>p53</i> が抑制しているのではないかと考えた。そこで <i>p53</i> を欠損した MEF に 4 因子を遺伝子導入して、iPS 細胞の誘導効率を比較した。すると、野生型 MEF では 1 %前後だった誘導効率が最大 2 0 %まで上昇した。<i>c-Myc</i> を除く 3 因子を導入した場合でも、1 %未満だった効率が 1 0 %まで上昇した。ドミナントネガティブ型 <i>p53</i> 変異体を野生型 MEF に導入して <i>p53</i> を抑制した場合も、同様に iPS 細胞樹立効率が上昇する結果が得られた。さらに当研究室の高橋らは、ヒト線維芽細胞においても <i>p53</i> の機能抑制が iPS 細胞の樹立効率を大幅に上昇させることを示した。 <i>p53</i> の機能は多岐に亘り、細胞内で相互作用するタンパク質も多数存在する。初期化における <i>p53</i> の機能を調べるために、様々な <i>p53</i> 変異体を用いて初期化効率への影響を調べた。<i>p53</i> 欠損 MEF に野生型 <i>p53</i> を導入した場合には初期化効率が低下するが、DNA 結合の欠損変異体を用いた場合はこのような低下は認められなかった。この結果は、<i>p53</i> が転写調節を介して初期化過程を抑制していることを示唆した。そこで <i>p53</i> の下流因子を調べるために、マイクロアレイを用いて野生型 MEF と <i>p53</i> 欠損 MEF の遺伝子発現を網羅的に比較した。さらに、<i>p53</i> に対する shRNA を用いてヒト線維芽細胞でも同様の解析を行い、マウスとヒトで共通する 3 4 個の遺伝子を見つけた。これらの候補因子を一つずつ初期化因子と共に過剰発現させたところ、<i>p21</i> を導入した場合に iPS 細胞の誘導が抑制されることが明らかになった。<i>p21</i> は <i>p53</i> の下流因子として知られ、cyclin と CDK の複合体へ結合することによって細胞周期を G1 期で停止させる。初期化誘導時におけるタンパク質量を調べたところ、<i>p53</i> は <i>c-Myc</i> の導入によって初期化過程の早い時期に上昇が認められた。また、<i>p21</i> は <i>c-Myc</i> もしくは <i>Klf4</i> の導入によって誘導されており、この誘導は <i>p53</i> 欠損 MEF では認められなかったことから、<i>p53</i> 依存的であることが示唆された。 本研究により、初期化因子により <i>p53</i> が誘導され、iPS 細胞の樹立を抑制していることが明らかになった。また、このとき、<i>p53</i> は下流因子の <i>p21</i> の転写を促進しており、これが <i>p53</i> による抑制の一部を担っていることがわかった。			

（論文審査の結果の要旨） iPS 細胞は、自己複製能力や分化多能性など ES 細胞によく似た性質を持っていることから、再生医療等への応用が期待される。この iPS 細胞の樹立効率は非常に低いことが知られているが、その理由は不明である。本学位授与申請者は初期化因子に含まれる <i>c-Myc</i> や <i>Klf4</i> が、がん原遺伝子であることから、発がん抑制機構を活性化して iPS 細胞の樹立効率を低下させているのではないかと考えた。<i>p53</i> はがん抑制遺伝子として知られるが、一方で ES 細胞の多能性維持に重要な <i>Nanog</i> 遺伝子の発現を抑制することも知られている。そこで、<i>p53</i> に着目し iPS 細胞の樹立過程に対する影響を検討した。 初めに優勢抑制型変異体を用いて p53 を抑制したマウス体細胞や、<i>p53</i> 欠損マウス由来の細胞で、iPS 細胞の誘導効率が上昇することを明らかにした。さらに、p53 の機能抑制による初期化効率の上昇はヒト細胞でも認められることを示した。なお、初期化因子の導入で p53 による転写活性が上昇し、<i>p53</i> の下流因子として知られる <i>p21</i> の発現量が増加したことから、<i>p53-p21</i> 経路が iPS 細胞の樹立抑制の一部を担っていると考えられた。<i>p53</i> を抑制して樹立した iPS 細胞は ES 細胞に類似していたが、一部の iPS 細胞は数回の継代後に ES 細胞様の性質を失うことが観察された。これらの細胞では、レトロウイルスベクターによる導入遺伝子のサイレンシングが行われず、分化能力が低下していることが明らかになった。 以上の研究は、iPS 細胞樹立過程における初期化抑制機構に着目し、その一端を明らかにしたことから細胞生物学、生命科学の発展に寄与すると共に、iPS 細胞樹立効率の改善を通して再生医療等への iPS 細胞の応用推進に貢献するところが大きい。 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 2 3 年 1 0 月 3 1 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			