

Title	Epigenetic variation between human induced pluripotent stem cell lines is an indicator of differentiation capacity( Abstract_要旨 )
Author(s)	Nishizawa, Masatoshi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-01-23
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/218003">http://hdl.handle.net/2433/218003</a>
Right	許諾条件により本文は2017-09-02に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医学）	氏名	西澤 正俊
論文題目	<b>Epigenetic variation between human induced pluripotent stem cell lines is an indicator of differentiation capacity</b> ヒト iPS 細胞の分化能はエピゲノム状態にて予測可能である		
（論文内容の要旨） ヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem: iPS 細胞）は再生医療や疾患モデルの作成に非常に有用であり大きな注目を集めている。しかしヒト iPS 細胞は分化能の株間差が大きく、iPS 細胞の応用に向けて障害となっている。本研究では、ヒト iPS 細胞の分化能の株間差の原因因子を明らかにするため、まず種々の体細胞（線維芽細胞、末梢血、臍帯血、ケラチノサイト、歯髄幹細胞）から作成したヒト iPS 細胞 35 株とヒト ES 細胞 4 株の血液分化能の評価を行った。血液分化能は iPS/ES 細胞から造血前駆細胞までの初期分化能（CD43 抗原陽性細胞産生数にて評価）と、造血前駆細胞から赤血球・血小板などの成熟血液細胞までの成熟分化能（造血前駆細胞のコロニー形成アッセイ、赤血球・血小板・T リンパ球への分化能にて評価）に分けて評価を行った。次にこれらの分化能と相関する因子や分子マーカーを明らかにするために、マイクロアレイや次世代シーケンサー等の技術を用いて、遺伝子発現、DNA メチル化、クロマチン状態の解析を行った。最後にこれらのデータの関連解析を行い、分化能に影響を与える因子の同定を行った。 これらの解析の結果、血液初期分化能は iPS 細胞の Insulin-like growth factor 2 (IGF2) 遺伝子の発現レベルと正相関することが明らかになった。さらに IGF2 遺伝子の強制発現もしくは IGF2 蛋白の培養液中への添加によって iPS 細胞からの血液初期分化は促進された。また RNA 干渉を用いた遺伝子ノックダウンもしくは IGF2 蛋白の主要な細胞膜レセプターである IGF1 レセプターへの阻害抗体によって初期分化は抑制された。これらの結果より IGF2 遺伝子の発現が iPS 細胞の血液初期分化に重要であり、IGF2 遺伝子の発現量の差が iPS 細胞の血液初期分化の株間差の原因となることが実験的に示された。次に我々は IGF2 遺伝子の遺伝子制御機構を調べた所、IGF2 遺伝子の発現量の株間差は、iPS 細胞のクロマチン状態の差異によること、またヒト iPS/ES 細胞では、IGF2 遺伝子の発現は Fibroblast growth factor (FGF) シグナル依存性にクロマチン構造が変化することによって制御されていることが明らかとなった。 次に血液成熟分化能に関しては、体細胞が iPS 細胞へリプログラミングされる過程で生じる異常 DNA メチル化の量と逆相関することが明らかとなった。過去の報告では、起源体細胞の種類が iPS 細胞の分化能に与える影響（体細胞メモリーと呼ばれる）が iPS 細胞の株間差の主な原因とされることが多かったが、本研究の解析では、体細胞メモリーよりもむしろリプログラミング関連の異常 DNA メチル化の量の方が成熟分化能を規定する主要な因子であった。さらに、従来非血液細胞由来の iPS 細胞は、体細胞メモリーのため血液由来 iPS 細胞に比べて成熟血液細胞への分化能が劣ると考えられてきたが、本研究ではリプログラミング関連の異常 DNA メチル化の量が少ない線維芽細胞もしくは歯髄幹細胞由来 iPS 細胞は、血液細胞由来 iPS 細胞と比べほぼ同等の血液細胞への成熟分化能を有することが分かり、この結果はリプログラミング関連の異常 DNA メチ			

ル化が成熟分化能を規定する主要な因子であることを支持する結果であった。 本研究により、ヒト iPS 細胞の株間の分化能の差の原因が明らかとなった。これらの知見は、ヒト iPS 細胞の生物学的な理解のみならず、臨床応用や疾患モデルに相応しい iPS 細胞株を選別するのに大変役立つと考えられる。
（論文審査の結果の要旨） ヒト iPS 細胞は臨床応用が強く期待されているが、iPS 細胞株ごとの分化能の差は臨床応用に際し大きな問題となる可能性がある。本研究では、様々な体細胞から複数の作製方法で樹立された多数のヒト iPS 細胞の分子プロファイルと血液分化能を詳細に検討することで、株ごとの分化能の差異の原因となる因子を明らかにすることを試みた。さらにこれらの解析にて明らかになった原因と推定される遺伝子の強制発現やノックアウトなどの実験を行い、その結果を実験的に確かめた。 これらの解析により iPS 細胞から造血前駆細胞までの初期の血液分化能は未分化 iPS 細胞の IGF2 遺伝子の発現レベルと相関していた。さらに IGF2 遺伝子が中内胚葉関連遺伝子の上昇を介して早期血液分化を促進すること、IGF2 遺伝子やその関連遺伝子の発現量の株間の差は、これらの遺伝子座のクロマチン構造の差に起因し、これらのクロマチン構造は FGF シグナル経路によって制御されていることが明らかとなった。また、iPS 細胞由来造血前駆細胞から系譜特異的血液細胞までの分化能の iPS 細胞株間の差は、リプログラミング中に生じる異常な DNA メチル化の量の株間の差に起因していた。本研究によってヒト iPS 細胞の分化能の株間の差が生じるメカニズムが明らかになるだけでなく、ヒト iPS 細胞の分化能をそのエピゲノム状態を詳細に調べることに予測することが可能となった。
以上の研究はヒト iPS 細胞株間の分化能の差の原因メカニズムの解明に貢献し、ヒト iPS 細胞の臨床応用への進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あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 12 月 26 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。

