

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Kremenska Yuliya

幹細胞研究は再生不能な臓器や疾患の治療を目的とした再生医療の分野で注目されている。中でも、胚性幹細胞 (ES 細胞) は初期発生における全ての胚葉系細胞 (内胚葉、外胚葉、中胚葉) に分化できる幅広い分化能を有するため、ES 細胞の研究に現在最も大きな期待が寄せられている。同様に、再生医療分野での新しいアプローチとして成体に存在する幹細胞の研究も注目されている。成体幹細胞で最もよく研究されている造血幹細胞は骨髄に分布し、各種血球の前駆細胞および免疫細胞に分化できる。また、骨髄には骨髄間質幹細胞 (BMS 細胞: 多能性成体前駆細胞) も存在し、成体臓器へ移植した際に、骨格筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、肺、胃、皮膚、神経外胚葉細胞へ分化することも報告されている。細胞の分化の基礎には、細胞の種類に依存した遺伝子発現の記憶の変化がある。DNA メチル化は哺乳類では主に連続する CG 二塩基配列 (CpG 配列) のシトシンにおこることが知られている。多くの場合、メチル化されたゲノム領域は不活性となり、遺伝子発現の記憶装置の 1 つとなっている。本論文は、再生医療への応用も視野に入れた幹細胞のエピジェネティック評価基準を示すために、ES 細胞や成体幹細胞のような分化多能性を持つ幹細胞がどのような DNA メチル化プロファイルを持つか、また、ES 細胞由来の胚様体 (embryoid body, EB) およびテラトーマが正常な発生段階と同様のエピジェネティック状態にあるかどうかを DNA メチル化解析によって評価したもので、以下の 3 章より構成されている。

第 1 章では、ES 細胞由来テラトーマの形態的観察および様々なマーカー遺伝子の発現が調べられた。ES 細胞から EB への分化過程は初期胚の分化過程をよく模倣しているとされ、哺乳類の初期発生における細胞系譜決定の試験管内モデルとして利用されている。また、ES 細胞および胚性生殖細胞は動物に移植することでテラトーマを形成する。マウスの腹腔内に形成されたテラトーマには、内胚葉、外胚葉および中胚葉系細胞をそれぞれ含む、正常細胞と思われる少なくとも 12 種の分化細胞が形態的観察で確認された。ところが、腎芽腫細胞や栄養膜巨細胞様の細胞など、明らかに異常細胞も含まれていた。これらの細胞について、細胞マーカーや分化マーカー遺伝子 (Oct-4, PL-1, Tpbp 遺伝子など) 発現をしらべ、正常発生では見られないような異常な細胞分化が起こることが示された。また、CpG アイランドに焦点をあてたゲノムワイド解析で、ES 細胞および EB は特異的な DNA メチル化プロファイルを示すことが示された。

第 2 章では、BMS 細胞と ES 細胞の多分化能の比較が行われた。培養下では、BMS 細胞は神経細胞、星状細胞および乏突起神経膠細胞の前駆細胞である clonogenic 神経幹細胞様細胞への分化が誘導され、ES 細胞と同様な分化多能性の特徴を持つことが示された。しかし、ES 細胞と BMS 細胞のテラトーマ形成能を調べた結果、BMS 細胞からはテラトーマは形成されないことが判明し、異常細胞の出現の可能性が低いことも示された。ES 細胞と BMS 細胞

はともに様々な体細胞に分化できるが、それらの分化能には相違点と類似点が存在するのである。そこで、BMS 細胞および ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化プロファイルの解析が行われ、BMS 細胞で ES 細胞と異なるメチル化状態を持つゲノム領域 (T-DMR) として、既知の 259 領域の T-DMR 中 85 領域が同定された。

第3章では ES 細胞から胎仔および成体組織への正常な発生過程と ES 細胞から EB を経てテラトーマへと分化するモデル発生過程における DNA メチル化プロファイル比較より、13 領域の T-DMR において逆のメチル化状態を示すことが見出された。このうちの1つの T-DMR は、全ゲノム配列データベースを基にしたコンピュータ上の RLGS 法 (Vi-RLGS) によって、Non-erythroid α II-spectrin 遺伝子領域であることがわかった。この遺伝子の転写開始領域に CpG アイランドが存在し、RT-PCR によりこの T-DMR のメチル化状態が遺伝子発現に影響することが確認された。

本研究では、ES 細胞と BMS 細胞の分化能およびゲノムワイド DNA メチル化情報に焦点をあて研究したもので、ES 細胞と BMS 細胞の分化に新たな概念を提供した。さらに、今後の再生医療に関する幹細胞研究において、エピジェネティック解析が基盤として貴重となることを示した。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。