

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 姫野 絵美

哺乳類の胚発生過程では、胚盤胞の形成に伴い、内部細胞塊と栄養外胚葉の 2 つの細胞系譜への分岐が起こる。内部細胞塊は着床後主に胚体組織の細胞へと分化し、栄養外胚葉は主に胎盤の大部分を構成する栄養膜細胞へと分化する。マウス胚性幹細胞(ES 細胞)は内部細胞塊より樹立され、生殖細胞を含むすべての胚体細胞に分化する能力を有する。一方、マウス栄養膜幹細胞(TS 細胞)は栄養外胚葉から樹立され、すべての栄養膜細胞に分化する能力を有する。これまでの研究で Lin28A 遺伝子が TS 細胞の分化に伴い発現が低下すること、Lin28A は ES 細胞でも発現し、やはりその分化に伴い発現量が低下することが明らかになっている。Lin28A は線虫の発生を制御する異時性遺伝子 lin-28 のホモログで、マウスゲノム上にはパラログである Lin28B も存在する。Lin28A および Lin28B は RNA 結合ドメインを有する。Lin28A および Lin28B が ES 細胞で microRNA let-7 の前駆体に結合すること、また筋芽細胞で Lin28A が IGF-2 mRNA に結合することが報告され、確かに Lin28 が RNA 結合タンパク質として機能し、かつ複数の種類の RNA をその標的とすることが明らかとなった。さらに近年、LIN28A、NANOG、SOX2 ならびに OCT4 の 4 遺伝子の導入によりヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)が作製され、LIN28A が体細胞核の分化多能性再獲得を促す因子であることが示された。これらから、マウス Lin28A および Lin28B は、自己複製能や多分化能維持のに関わる機能を担っていることが考えられた。

本研究は、マウス ES 細胞を用いた Lin28A の機能解析を中心に記載されたもので、以下の 3 章からなる。

第1章では Lin28A 標的 mRNA の探索が行われた。Lin28A は ES 細胞と TS 細胞で共に発現し、分化に伴い発現が低下することから、その標的 RNA が 2 つの幹細胞の持つ自己複製能や多分化能の維持機構に関与する可能性が考えられた。そこで、まず、ES 細胞と TS 細胞それぞれの細胞溶解液から抗 LIN28A 抗体を用いて得られた免疫沈降物を SDS-PAGE で解析した。その結果 2 つの細胞に共通するバンドとともにそれぞれに特有のバンドも複数検出され、Lin28A はそれぞれの幹細胞で異なるタンパク質を含む複合体を形成していることが示唆された。この免疫沈降産物から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、Lin28A 標的 mRNA として ES 細胞で 14 遺伝子、TS 細胞で 65 遺伝子が同定された。当研究室で過去になされた遺伝子発現アレイ解析結果との照合により、同定された標的 RNA は両幹細胞でも同程度に発現していることが明らかになった。これらの結果は、Lin28A が全 RNA に非特異的に結合したために発現量の高い mRNA が同定されたわけではなく、Lin28A は各幹細胞で特異的な mRNA と選択的に複合体を形成することを示している。

第2章では、ES 細胞における Lin28A の機能を明らかにするために、shRNA を用いた Lin28A knockdown 解析が行われた。shRNA 発現プラスミドが安定的に組み込まれた Lin28A knockdown 株が樹立されたことから、Lin28A 発現量の低下は未分化 ES 細胞の維持に重篤な影響を及ぼさないことが明らかになったが、Lin28A の発現量が 50%以上低下している株では Oct4 mRNA 量が

20%から 50%上昇していることが分かった。また、得られた Lin28A knockdown 株の中には Oct4 mRNA 量が低下している株も存在し、この株では Lin28B の mRNA 量が低下していた。そこで siRNA を用いて Lin28B transient knockdown を行ったところ、Lin28B knockdown によって Oct4 mRNA 量が低下し、また Lin28A mRNA 量も低下していた。したがって、Lin28A は Oct4 mRNA 量を負に制御し、Lin28B は Oct4 と Lin28A mRNA 量を正に制御する因子であることが示された。ES 細胞において Oct4 の発現量を人為的に半分にする外胚葉系に、逆に過剰発現させて 1.5 倍以上にすると内胚葉系の細胞に分化することが報告されている。すなわち、Oct4 mRNA 量が一定の範囲内に保たれることは、ES 細胞の自己複製能や多分化能の維持に重要な要素である。本章の研究により、Lin28A および Lin28B は Oct4 の発現量を一定の範囲内に保つことで ES 細胞の自己複製能や多分化能性の維持に寄与している可能性が考えられた。

第3章では、細胞・組織特異的 DNA メチル化領域 (Tissue-dependent and Differentially Methylated Regions, T-DMR) を中心に、Lin28A knockdown ES 細胞株のエピゲノム解析が行われた。ES 細胞特異的な T-DMR の中から 68 遺伝子座 (ES 細胞で特異的に低メチル化領域の 45 遺伝子座と高メチル化領域 23 遺伝子座)、それ以外の T-DMR 102 遺伝子座を選び、その上流域の HpyCH4IV 認識配列 (ACGT) のメチル化率を COBRA 法で測定した。その結果、Lin28A knockdown ES 細胞株では、コントロール ES 細胞株とメチル化状態の異なる領域が低メチル化領域から高メチル化領域まで幅広く認められた。また、Lin28A knockdown ES 細胞株におけるメチル化の変化は、低下と亢進の両方向の変化が引き起こされること、またその変化は各領域でランダムに起こるのではなく、それぞれの株である一定の方向へ変化する傾向をもつことが示された。さらに、Lin28A knockdown によるメチル化変化は ES 細胞特異 T-DMR と他の T-DMR の両グループで認められ、両グループにおけるメチル化変化の傾向 (低下または亢進) は共通していた。これらの結果から、Lin28A は ES 細胞の DNA メチル化プロファイル維持に重要な因子であることが示された。

以上、本論文では複数の観点から ES 細胞における Lin28 の役割を明らかにした。Lin28A は ES 細胞で複数の標的 RNA と複合体を形成し、標的 RNA の制御に関与していること、また、Lin28A の発現量は Oct4 の発現量に影響を与えることを明らかにした。Lin28A はゲノムワイドな ES 細胞の DNA メチル化プロファイル制御に役割をもつことが示唆された。これらの知見は幹細胞の基礎として重要であるばかりでなく、再生医療を含む臨床など応用研究としても価値がある。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。