

別紙 2

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名：印東厚

本研究はマウス ES 細胞に発現する膜タンパク質に関して質量分析によるプロテオミクス解析を行ったものである。ES 細胞は成長因子や細胞外基質などの外的要因を認識することにより、未分化性の維持、及び分化する方向を決定することが知られており、ES 細胞には外的要因を認識する未分化状態に特異的な膜タンパク質が存在すると予想されていた。本研究において ES 細胞に発現する膜タンパク質の網羅的な研究を行った理由は、①ES 細胞の未分化性維持機構の解析は細胞核内に発現する転写因子を中心に行われていたが、細胞表面膜タンパク質についてはその重要性にも関わらず詳しい解析は行われていなかったこと、②未分化状態に特異的な膜タンパク質群を同定することにより、細胞膜を介した ES 細胞の分子機構の知的基盤を得られると考えたこと、③細胞表面マーカータンパク質を用いた ES 細胞の精製・分離技術の確立が、幹細胞の安全な医療応用の実現に向けて特に重要になると予想されたこと、が挙げられる。膜タンパク質のプロテオミクス解析を大量培養が可能なマウス ES 細胞を用いて行い、未分化状態で特に発現が強い膜タンパク質群を多数同定するとともに、これまで汎用されてきた既知未分化幹細胞マーカーの SSEA1 よりも同定されたタンパク質のひとつである、EphA2 が未分化細胞の精製技術における細胞表面マーカーとしてより正確な指標となることを実証した。

本研究では特に以下の 3 つの大きな成果が得られた。一番目は膜タンパク質のプロテオミクス解析の同定効率を改善するため膨大なタンパク質抽出物に由来するペプチドの効率的な分離手法を開発したことである。二番目は未分化状態と分化したマウス ES 細胞に発現する膜タンパク質の比較定量的なプロテオミクス解析を行い、未分化状態に特異的に発現する膜タンパク質のデータセットを作成したことである。三番目として同定膜タンパク質の機能解析と表面マーカーとしての有効性を検証し、既知表面マーカーよりも効果的に未分化 ES 細胞を精製できる新規幹細胞操作技術へと発展させたことである。

まず一番目の膜タンパク質プロテオミクス解析の同定効率改善のための二次元クロマトグラフィーによるペプチドの新規分離法の開発については、プロテオミクス解析において、細胞や組織から溶出したタンパク質混合物はその翻訳後修飾を含めると極めて複雑な組成であるため、膜タンパク質などの比較的希少なタンパク質群を同定するにはペプチドを効果的に分離することが必要であった。本研究において、一次元目のカラムとして汎用されてきたカチオン交換カラム(SCX)よりも両性イオン交換カラム(ZIC-HILIC)の分離能が優れており、プロテオミクス解析における同定効率を顕著に改善できることを見出した。本研究で開発した手法は今後同様の解析を行う研究者たちに大いに参考とされる手法となるだろう。

次に、未分化状態のマウス ES 細胞と白血病阻害因子 (LIF) 除去により分化させたマウス ES 細胞から抽出した膜タンパク質を開発した二次元クロマトグラフィーによって分離・同定する手法と二次元電気泳動によって分離・同定する手法を相補的に行うことにより、マウス ES 細胞の膜タンパク質のプロテオミクス解析を行った。これらの手法によって 300 以上の膜タンパク質を同定することに成功した。プロテオミクス解析の比較定量結果を追試するためウェスタンブロット解析や免疫蛍光染色を行い、未分化状態での発現量が高い膜タンパク質のデータセットを作成した。印東君が同定した膜タンパク質群は ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞を制御し操作するための細胞表面マーカーとして、今後の幹細胞の研究に大きく貢献すると考えられる。

さらに本研究で同定した膜タンパク質群を細胞表面マーカーとして利用する技術の開発を行った。モデル動物などを用いた実験などから指摘されている再生医療の問題点として、ES 細胞や iPS 細胞などの未分化性を有する細胞を利用した場合、移植後に腫瘍化が起こる危険性があることが報告されていた。この原因の一つとして、移植細胞中に未分化細胞が残留している可能性が指摘されていた。この問題を解決するためには、遺伝子操作を用いない抗原抗体反応による安全で確実な方法で未分化細胞を選別できる技術が求められていた。プロテオミクス解析によって未分化状態の ES 細胞において強く発現していることが明らかになった EphA2 について詳細な検証を行い、EphA2 の ES 細胞における機能はリガンドのひとつである ephrinA1 と強調して増殖能に寄与していることを明らかにした。さらに FACS 解析により既知の細胞表面マーカーである SSEA1 や Cripto よりも未分化状態の ES 細胞で特異的に発現していることを見出した。さらに *in vitro* 系で肝臓に分化させた ES 細胞においても検証したところ、やはり既知マーカーとして利用されてきた SSEA1 や Cripto を用いた分離技術では不十分であった幹細胞の精製を、EphA2 を指標とした分離によって改善できることを示した。また印東君は、彼が同定した膜タンパク質のいくつかが未分化状態のヒト ES 細胞や iPS 細胞でも共通して発現していることを確認しており、本研究で扱った幹細胞特異的な細胞表面マーカーの研究が、近い将来行われる iPS 細胞や ES 細胞などの幹細胞を用いた医療応用の安全性を高める技術に大きく貢献すると期待できる重要な成果と言える。

したがって、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。