

審査の結果の要旨

氏名 安 東 赫

本研究は体細胞から多能性幹細胞の誘導を誘導するために、**Genomic Integration** やそれによる危険性を内在するウィルスベクターを使用せずに、初期化因子を融合蛋白として導入する。初期化因子の融合蛋白は哺乳類細胞から分泌させ、その初期化因子が体細胞に導入されるように **Protein Transduction Domain (PTD)** を応用する。最終的には体細胞を細胞導入型初期化因子を分泌する哺乳類細胞と共培養することによって、多能性幹細胞の誘導を目指す。この多能性幹細胞の誘導方の開発から、下記の結果を得ている。

1. CMV プロモーターの下流に分泌のシグナルペプチドである Ig kappa leader sequence や PTD の配列を融合させ、その下流に初期化因子である、c-MYC, OCT4, SOX2, KLF5 をそれぞれ融合させた。しかし、Ig kappa leader sequence による分泌は、Golgi apparatus や Endoplasmic Reticulum (ER) を経由し行われるがこの段階で furin によって蛋白が分解されるのが予想できる。Furin による分泌段階での初期化因子の分解を考慮し、その認識配列を Point Mutation させ、分解されないように期待した。その結果、分泌されたあとの初期化因子融合蛋白として、TAT4-c-MYC, TAT4-OCT4, TAT4-SOX2, TAT4-KLF5 を、そして、furin 耐性の蛋白として TAT4-c-MYC R367K R424Q, TAT4-SOX2 R43Q R114Q を使用した。
2. この蛋白を分泌する発現ベクターを SNL 細胞に Transfection し、Zeocin 処理によって細胞株、SP-SNL s、を作成した。この SP-SNL s 細胞を用いて、Western Blotting や免疫染色を行い、SP-SNL s が分泌している融合蛋白と Mutant の蛋白が Furin への耐性を持っている性質を確認した。
3. それぞれの初期化因子の融合蛋白を分泌する SP-SNL s を用いて Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) からマウス iPS 細胞を樹立することに成功した。この時、SP-SNLs 細胞は iPS 細胞の樹立のための Feeder 細胞として使用した。この実験から、細胞導入型初期化因子を分泌する SP-SNLs が iPS 細胞の誘導に効果があるのを確認した。その後は、*Oct4* のプロモーターの活性化によって EGFP を発現する MEFs 細胞を用いて iPS 細胞の作成を行い、EGFP 陽性のコロニーの数や未分化マーカーである SSEA-1 陽性のコロニーの数を確認し、

furin-sensitive と furin-resistant の初期化因子の融合蛋白の iPS 細胞誘導能を比べ、furin-resistant の蛋白の場合がより高い効率と早いスピードで樹立ができる事実を確認した。

4. マウス細胞からの iPS 細胞の樹立ができることを確認した上、次はヒト iPS 細胞の樹立を行った。同じく、SP-SNLs 細胞を Feeder 細胞として使用し、Human Dermal Fibroblasts (HDFs, neonate) からヒト iPS 細胞の樹立に成功した。樹立された iPS 細胞で Characterization を行い、融合蛋白から樹立されたこの iPS 細胞が多能性幹細胞であることを確認した。
5. 次は、TAT4-c-MYC や TAT4-c-MYC R367K R424Q を除いた 3 因子を用いて HDFs からヒト iPS 細胞の樹立に成功した。最後に、Human Cord Blood CD34⁺ Progenitor からの樹立にも成功した。

以上の結果から、本論文はウィルスベクターや Plasmid DNA, そして、分離精製する必要のある融合蛋白などを利用せずに、細胞導入型初期化因子を分泌する細胞を用いる iPS 細胞の樹立方法を開発し、分泌段階での furin による分解を回避することによって iPS の誘導がより高い効率で、そして、ウィルスと比べ遅くないスピードで早く樹立ができる事実を明らかにしたと判断する。