

論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

学位規則第 8 条に基づき、論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

フリガナ 氏名 (姓、名)	イシダ トモアキ 石田 智明	授与番号 甲 1723 号
学位の種類	博士(理学)	授与年月日 2023 年 9 月 25 日
学位授与の要件	本学学位規程第 18 条第 1 項該当者 [学位規則第 4 条第 1 項]	
博士論文の題名	多能性幹細胞への初期化機構の解析と経済的な心筋分化誘導法の開発	
審査委員	(主査) 川村 晃久 (立命館大学生命科学部教授)	田中 秀和 (立命館大学生命科学部教授)
	天野 晃 (立命館大学生命科学部教授)	
論文内容の要旨	<p>本論文は、多能性幹細胞への初期化過程で microRNA (miRNA) が果たす役割を解析し、さらに、多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導において、古典的 Wnt シグナル伝達経路を制御する人工キメラ受容体の開発を研究対象としたものである。第 1 章では、再生医療において多能性幹細胞に寄せられる期待とその課題について述べ、さらに、人工多能性幹 (iPS) 細胞の作製法と分化制御における効率的かつ経済的な技術の重要性について論じた。第 2 章では、miRNA の中でも未分化胚性幹細胞で高発現している miR-17-92 cluster に着目し、これが iPS 細胞への初期化に重要な役割を果たすことについて実験手法と実験結果の詳細をまとめた。ここでは、miR-17-92 cluster を構成する miRNA のうち、miR-17 及び miR-20a が共通の標的としてがん抑制遺伝子 <i>Pten</i> 及び <i>p21</i> にはたらきかけ iPS 細胞形成に関与していることを見出した。さらに、PTEN mRNA と p21 mRNA は miR-17-92 cluster に対する競合内因性 RNA として iPS 細胞形成を負に制御することを示した。第 3 章では、胚発生初期の中胚葉形成や幹細胞の増殖・分化に関わる古典的 Wnt シグナル伝達を安価な代替リガンドにより活性化できる人工キメラ受容体の構築と、これを多能性幹細胞に安定発現させることで効率的かつ経済的に心筋細胞を分化誘導する技術の開発について実験手法と実験結果をまとめた。ここでは、内因性 Wnt3a 受容体の細胞外領域を欠損させ、代替リガンドの抗原分子 Fluorescein (FL) に対する一本鎖抗体の可変部領域を融合させた人工キメラ受容体を作製した。次に、この人工キメラ受容体を多能性幹細胞に安定発現させ、代替リガンドで刺激すると古典的 Wnt シグナル伝達が活性化し、心筋分化誘導効率が高まることを示した。さらに、誘導された心筋細胞の特性について、マーカー遺伝子の発現解析、免疫組織学的解析、カルシウムオシレーション解析により明らかにした。第 4 章では、iPS 細胞の形成過程で miRNA や遺伝子の発現パターンが変化することを踏まえ、miR-17-92 cluster の果たす役割について論じ、さらに、人工キメラ受容体による古典的 Wnt シグナル伝達の活性化が効率的かつ経済的な心筋細胞作製に寄与することを論じ、最後に、多能性幹細胞を用いた医療応用の今後について考察した。以上の研究成果は、効率的な iPS 細胞作製技術の開発に貢献するものと考えられる。さらに、古典的 Wnt シグナル伝達経路を活性化できる人工キメラ受容体の開発は、iPS 細胞を用いた心筋再生療法の実用化において経済的な問題を解決する糸口になるものと期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨	<p>本論文は、miRNA の中でも miR-17-92 cluster に着目し多能性幹細胞形成（iPS 細胞への初期化）の分子機構の一旦を解明し、さらに、古典的 Wnt シグナル伝達を担う人工受容体を多能性幹細胞に安定発現させることで経済的な心筋細胞作製法を開発したことに特徴があり、以下の点に関して評価することができる。</p> <p>(1) マウス線維芽細胞から iPS 細胞が形成される過程で、miR-17-92 cluster の発現が、初期化誘導因子の一つ c-Myc により転写レベルで制御されていることを示した。</p> <p>(2) miR-17-92 cluster の中でも miR-17 と miR-20a が、共通の標的としてがん抑制遺伝子 <i>Pten</i> 及び細胞周期制御遺伝子 <i>p21</i> の発現を抑制することで iPS 細胞形成効率を高めることを示した。</p> <p>(3) PTEN mRNA と p21 mRNA は miR-17 や miR-20a に対する競合内因性 RNA として作用し、iPS 細胞形成を負に制御することを示した。</p> <p>(4) 古典的 Wnt シグナル伝達を担う人工受容体として、安価で毒性のない代替リガンドの抗原分子 FL に対する一本鎖抗体の変換領域を融合させた人工キメラ受容体を作製することに初めて成功した。</p> <p>(5) 古典的 Wnt 人工キメラ受容体を安定発現するマウス多能性幹細胞株において、古典的 Wnt リガンドの組換えタンパク質で刺激したときと同様に、代替リガンドにより β-catenin/TCF 依存性転写の活性化とその標的遺伝子の発現が誘導されることを示した。</p> <p>(6) 古典的 Wnt 人工キメラ受容体の安定発現マウス多能性幹細胞株で、古典的 Wnt リガンドの組換えタンパク質で刺激したときと同様に、代替リガンドにより心筋細胞への分化誘導効率が亢進することを明らかにした。</p> <p>本論文の審査に関して、2023 年 7 月 24 日（月）15 時 00 分から 16 時 20 分まで、びわこ・くさつキャンパスバイオリンク演習室 7 において公聴会を開催し、申請者石田智明による論文要旨の説明の後、審査委員は申請者に対する口頭試問を行った。各審査委員および公聴会参加者により以下のような質問がなされた。miR-17-92 cluster による標的遺伝子の発現抑制機の時期特異性とその分子機構について、miR-17-92 cluster が c-Myc の代替になりうるか、古典的 Wnt 人工受容体の設計・作製・多能性幹細胞への応用・分化効率の評価で申請者が寄与した内容について、人工受容体が内在性受容体によるシグナル伝達に影響するか否か、人工受容体を再生医療へ応用する上での将来構想など多くの質問が出され活発な議論がなされたが、いずれの質問に対しても申請者の回答は適切なものであった。また、本論文提出後、主査および副査はそれぞれの立場から本論文の内容について評価を行った。</p> <p>以上により、論文審査と公聴会での口頭試問結果を踏まえ、審査委員会は一致して、本論文は本研究科の博士学位論文審査基準を満たしており、博士学位を授与するに相応しいものと判断した。</p>
試験または学力確認の結果の要旨	<p>本論文の公聴会は 2023 年 7 月 24 日（月）15 時 00 分から 16 時 20 分まで、びわこ・くさつキャンパスバイオリンク演習室 7 で行われた。</p> <p>申請者は、本学学位規程第 18 条第 1 項該当者であり、本論文内容および公聴会での質疑応答を通して、主査および副査は、申請者が十分な学識を有し博士学位に相応しい学力を有していることを確認した。</p> <p>以上の諸点を総合し、申請者に対し、博士（理学 立命館大学）の学位を授与することが適当であると判断する。</p>