

博士論文要旨

論文題名：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

立命館大学大学院生命科学研究科

生命科学専攻博士課程後期課程

イシダ トモアキ

石田 智明

幹細胞は自己と同一の細胞を産生する自己複製能、自己と異なる細胞を産生する分化能を兼ね備えた細胞である。幹細胞の中でも、胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞、人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞は多能性幹細胞と呼ばれ、欠損あるいは機能喪失した生体組織に対する再生医療の新たな細胞供給源として強い期待が寄せられている。

iPS 細胞は、体細胞を培養皿上で初期化し作製することが出来るが、その作製効率の低さやがん化のリスクといった課題を抱えている。そこで、本論文の前半では、microRNA (miRNA) による iPS 細胞形成における遺伝子発現制御に着目した研究結果をまとめた。未分化な多能性幹細胞で高発現する miR-17-92 cluster において、その過剰発現は iPS 細胞形成を促進し、発現阻害は iPS 細胞形成を抑制した。また、*in silico* 解析及びマイクロアレイ解析の結果から、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 *Pten* 及び *p21* にはたらきかけ iPS 細胞形成に関与していることが見い出された。さらに、PTEN mRNA と p21 mRNA は miR-17-92 cluster に対する競合内因性 RNA (competing endogenous RNA) として iPS 細胞形成の抑制因子であることも示唆された。

再生医療への応用にあたり、多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞からの効率的かつ経済的な分化誘導法の開発が肝要である。心筋再生に関しては、分化誘導早期の古典的 Wnt 経路活性化による心筋分化の促進が報告されている。一方、Wnt タンパク質の精製は費用が大きいため、経済的な心筋分化誘導法の開発にも期待が寄せられている。そこで、本論文の後半では安価な代替リガンドに対する一本鎖の抗体断片を含む人工 Wnt3a キメラ受容体を構築し、これを安定発現させた ES 細胞から効率的な心筋分化誘導が可能か否かを検証した研究結果をまとめた。人工 Wnt3a キメラ受容体を導入した ES 細胞を代替リガンドで刺激した結果、自己拍動を呈する胚様体の割合が増加し、心筋マーカー遺伝子の発現増加やカルシウムオシレーションを認めた。以上の結果から、本研究で構築した人工 Wnt3a キメラ受容体は、効率的かつ経済的に多能性幹細胞を心筋細胞へ分化誘導するのに有用なツールとなることが示された。

以上より、本論文は、miR-17-92 cluster を介した初期化制御機構について、多能性幹細胞の経済的な心筋分化誘導に向けた人工キメラ受容体の応用について、それぞれ研究成果を示すものであり、多能性幹細胞を用いた再生医療の促進に寄与すると考えられる。

Abstract of Doctoral Thesis

Title: Analysis of reprogramming process to pluripotent stem cells and development of the economical myocardial differentiation method

Doctoral Program in Advanced Life Sciences
Graduate School of Life Sciences
Ritsumeikan University

イシダ トモアキ
ISHIDA Tomoaki

Pluripotent stem (PS) cells are unique cell types capable of self-renewal and differentiation into any other cell types. Thus, embryonic stem (ES) cells and induced-pluripotent stem (iPS) cells are expected as new cell sources for regenerative medicine. As iPS cells are generated by reprogramming somatic cells in culture with low efficiency and the risk of oncogenesis, it is necessary to clarify the details of reprogramming process to iPS cells. In the former part of the present study, I focused on the regulation of gene expression by microRNA (miRNA) during reprogramming to iPS cells. Thus, I investigated whether the miR-17-92 clusters, which are highly expressed in ES cells, affect the efficiency of iPS cell reprogramming. Overexpression of the miR-17-92 cluster promoted iPS cell formation, while knock-out of this cluster decreased the reprogramming efficiency. The combination of *in silico* analysis and microarray analysis identified *Pten* and *p21*, tumor suppressor genes, as targets of miR-17 and miR-20a, comprising the miR-17-92 clusters. Moreover, we found that both PTEN mRNA and p21 mRNA act as competing endogenous RNAs against miRNA-17-92 cluster. Taken together, miR-17-92 cluster contributes to iPS cell formation through the phase-dependent downregulation of PTEN and p21 expressions. With respect to application of PS cells for regenerative medicine, the effective and economical differentiation methods need to be developed. It has been reported that the activation of canonical Wnt signaling at an early stage of differentiation promotes cardiomyocyte production from PS cells. However, it costs to purify recombinant Wnt proteins because of their hydrophobicity. To solve this issue, in the latter part of this study, we developed the chimeric Wnt3a receptor which respond to a surrogate ligand via a single chain variable fragment in the extracellular region, and tested whether this chimeric receptor promoted the differentiation of cardiomyocytes from ES cells. Stimulation by surrogate ligands increased the incidence of spontaneously beating clusters with cardiac specific marker gene expressions and the oscillation of intercellular calcium ion levels. These results indicate that the chimeric Wnt3a receptor enables PS cells to differentiate into cardiomyocyte efficiently with low costs.