

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	古田 明日香
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2021年（令和3年）3月20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）
学位論文の題名	ES細胞に含まれる2細胞期様細胞の誘導とその制御
審査委員 主査	中村 肇伸 教授
副査	齊藤 修 教授
副査	向 由起夫 教授

論文内容要旨

哺乳類において受精卵は胎盤を含む全ての細胞に分化できる全能性という能力を獲得する。この全能性は胚の発生過程において胚盤胞期までに急速に低下する。ES(Embryonic stem)細胞は、胚盤胞期の将来胚体に分化する内部細胞塊から樹立された細胞であり、胚体外への分化能を失った多能性幹細胞であると考えられてきた。しかし、ES細胞には、非常に低い割合で全能性の能力を持つ細胞の亜集団が存在することが報告された。また、この集団には、2細胞期で一過的に発現する内在性レトロウイルスの一種である MuERV-L(Murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer)を発現することが示された。

本研究では、ES細胞に含まれる2細胞期様細胞を MuERV-L の発現を指標にして可視化し、2細胞期様細胞を効率よく誘導できる培養条件を検討した。また、MuERV-L 陽性細胞における遺伝子発現、エネルギー代謝経路、及び細胞内小器官の解析を行った。その結果、通常のES細胞用の培養に用いるFCS(Fetal Calf Serum)の代替物であるKSR(KnockOut Serum Replacement)を用いることにより MuERV-L 陽性細胞の割合が顕著に増加することを明らかにした。また、KSRの類似品であるSSR(StemSure Serum Replacement)を用いた場合でもKSRと同様に MuERV-L 陽性細胞を効率よく誘導することを明らかにした。さらに、MuERV-L 陽性細胞の誘導はアスコルビン酸により促進し、インスリンにより抑制されることを明らかにした。RNAseqを用いた遺伝子発現解析から、MuERV-L 陽性細胞では、初期の着床前胚に特異的に発現する遺伝子や2細胞期胚で一過的に発現する遺伝子の発現が認められた。

また、解糖系や酸化的リン酸化の阻害剤を用いた実験から、ES 細胞から MuERV-L 陽性細胞への変換時にはエネルギー代謝経路が解糖系から酸化的リン酸化に変換されることが示唆された。そこで、MuERV-L 陽性細胞のエネルギー代謝経路を担うミトコンドリアの形態変化について電子顕微鏡を用いて解析を行った。その結果、MuERV-L 陽性細胞において、ミトコンドリアは ES 細胞より顕著に発達しており、ミトコンドリアの内部構造であるクリステが顕著に複雑化していることが明らかとなった。さらに、ES 細胞には存在せず、卵子に存在する LD (Lipid Droplet) と類似した構造を有することが示された。このことから、2 細胞期様細胞の誘導はアスコルビン酸とインスリンにより制御され、エネルギー代謝経路の変換やミトコンドリアの形態変化、及び LD 生成などのオルガネラのリモデリングも重要であることが示唆された。

論文審査結果要旨

本論文では、ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換のメカニズムの一端を明らかにした結果と、この変換に伴い遺伝子発現やエネルギー代謝経路が変化し、オルガネラのリモデリングが生じることを明確な実験で証明した結果が記されている。本論文では、まず、ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞を MuERV-L の発現を指標にして可視化し、2 細胞期様細胞を効率よく誘導できる培養条件を検討した。その結果、ES 細胞や iPS 細胞の培養において血清の代替物として使用される KSR や SSR を用いることにより、効率よく 2 細胞期様細胞を誘導できることを明らかにした。また、特定の成分を含まない SSR を用いて、KSR や SSR に含まれる 2 細胞期様細胞への変換を促進するアスコルビン酸と抑制するインスリンを同定した。さらに、トランスクリプトーム解析や電子顕微鏡解析から、ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換には、遺伝子発現およびエネルギー代謝経路の変化とオルガネラのリモデリングが必要であると結論した。

本研究は、遺伝子を人為的に改変することなく 2 細胞期様細胞を誘導できる方法を世界に先駆けて開発したことが高く評価できる。また、研究も論理的に構成されており、研究のストラテジーも適切であり、質の高い論文であると言える。また、本論文の一部は、すでに査読付き国際学会誌に 2 報公表されている。さらに、国際学会での英語の発表が 3 回、国内学会での発表も数十回行っている。論文審査における口頭発表も他分野の者にも理解できるように工夫されていた。質疑応答では、この分野における豊富な知識量と論理的思考能力の高さが確認できた。以上のことから、本論文が長浜バイオ大学の博士 (バイサイエンス) の学位論文として相応しいものと判断した。