

コデール シェリフ マフルース氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Replacement of Sox2 in reprogramming by identification of the biphasic role of calcineurin pathway

(二方向性のカルシニューリン経路による Sox2 非依存的リプログラミングの同定)

転写因子を用いた体細胞リプログラミングにより作製される誘導型多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) は、幹細胞治療などを目指した応用研究が進められている。しかし、その一方で、安全性を担保するために重要であるリプログラミングの分子機構の解明は、まだ十分には進んでいない。本論文では、カルシニューリン/NFAT 経路のリプログラミング過程における役割を明らかにすることを、その目的とした。

カルシニューリン/NFAT 経路のリプログラミング過程における役割を明らかにするために、低分子化合物や遺伝子操作でカルシニューリンの活性と NFAT アイソフォームの発現を抑制したときの、体細胞リプログラミング各過程への影響を検討した。その検討には、定量 PCR による遺伝子発現定量、クロマチン免疫沈降によるヒストン修飾定量、ウエスタンブロットによる蛋白質発現定量、FACS による細胞周期解析などを用いた。リプログラミング効率は、アルカリホスファターゼ陽性コロニー数で定量化した。遺伝子の強制発現ならびにノックダウンによる機能抑制には、レトロウイルスならびにレンチウイルスベクターを用いた。

カルシニューリン/NFAT 経路のリプログラミングの各過程における役割を検討した結果、二通りの相反する効果が見出された。リプログラミング初期においては、カルシニューリン活性は、細胞増殖維持と間葉上皮転換を正に制御することにより、リプログラミングを促進する方向に機能していた。一方、リプログラミング後期においては、NFAT2c を介して多能性関連転写因子 Sox2 や Klf2 の発現を抑制することにより、リプログラミングを抑制する方向に機能していた。Sox2 については、低分子化合物や遺伝子ノックダウンによりカルシニューリン活性を抑制することが、そのリプログラミングにおける機能を置換できることを証明した。

審査において、(1) カルシニューリン活性の評価方法、(2) NFAT 免疫染色の評価方法、(3) 細胞内カルシウム濃度測定の意義、(4) リプログラミングの方法と本発見の相関、(5) Sox2 以外のリプログラミング因子機能の置換の可否、(6) Sox2 を用いずに作成された iPS 細胞の多能性評価方法、などについて質疑が行われ、申請者からは概ね適切な回答が得られた。

本論文は、カルシニューリン/NFAT 経路のリプログラミング過程における役割を網羅的に検討したものであり、その機能が二方向性であることと、その機能制御が Sox2 の機能を置換しうることを解明したことは、今後の iPS 細胞作製方法の検討や、発がんなどの細胞分化の異常における本経路の役割の検討に繋がらうものと考えられ、学位の授与に値するものと評価した。

審査委員長 多能性幹細胞学担当教授

丹羽 仁史