

氏名（本籍）	楊 正博		
学位の種類	博 士（ 理 学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7324	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Stem Cell Biology Using a Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (細胞周期可視化蛍光プローブを用いた幹細胞研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田 健一郎
副査	筑波大学教授	医学博士	中谷 敬

論 文 の 要 旨

幹細胞の細胞周期は、細胞社会のさまざまな環境下において厳密に制御されており、G₁期の長さは細胞の運命決定に非常に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでの細胞周期の研究は、細胞集団的な解析手法で行われてきたため、細胞集団内の不均一性や個々の細胞の時空間依存的な変化を調べることは不可能であった。Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator) は、ユビキチン-プロテアソーム系の細胞周期依存的なタンパク質分解を利用した蛍光タンパク質プローブで、個々の細胞の細胞周期進行をリアルタイムに観察することを可能にする。本研究では、Fucci トランスジェニック (TG) マウスを作製し、各種血球細胞での Fucci の発現解析を行い、造血幹細胞分画の細胞周期と造血能との関係を調べた。また、多能性幹細胞 (Pluripotent stem cells: PSCs) に Fucci を導入し、細胞周期と多能性の関係を解析した。

細胞周期の G₁期と S/G₂/M 期をそれぞれ可視化する FucciG₁(Red)と Fucci S/G₂/M(Green)を発現する TG マウスを作製し、骨髓、末梢血、胸腺、脾臓より血球細胞を単離し、細胞表面分化マーカーを組み合わせた FACS 解析を行った。その結果、各種血球細胞における細胞周期の解析が可能なラインを得た。造血幹細胞および前駆細胞の解析に最適なラインの FACS 解析では、造血幹細胞分画(CD34-

c-Kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻)の 95%以上の細胞が G₀/G₁期にあることが確認されたが、FucciG₁(Red)の発現は高い細胞が多いものの弱い細胞もあり、ヘテロな集団であることがわかった。そこで、FucciG₁(Red)の発現と幹細胞能力との関係を競合的骨髄再構築アッセイにより評価したところ、FucciG₁(Red)^{high}細胞にのみ高い骨髄再構築能がみられた。この結果から、Fucci G₁(Red)プローブの蛍光強度によって造血幹細胞分画の純度をさらに高めることができることが示された。

PSCs は自己複製能と個体を構成するすべての細胞へ分化できる多能性を有している。これまでに様々な生物種から PSCs が樹立されているが、PSCs は生物種により形態や性質が異なり、キメラ作出や生殖系列に寄与できる未分化性の高いナイーブ型とこれらの能力は持たないプライム型に分類することができる。ナイーブ/ プライム型の判断は、キメラ作出や未分化マーカーの発現などによって行われているが、増殖能や細胞周期の相違点についてはまだ詳細に解析されていない。そこで、細胞周期の G₁、S、G₂/M 期を可視化する Fucci プローブ (G₁/G₂/M-Red および S/G₂/M-Blue、G₁-Red および S/G₂/M-Yellow) を、レンチウイルスベクターを用いて、マウス、ウサギ、ヒトの PSCs に導入し、タイムラプスイメージングによる細胞周期を測定した。その結果、ナイーブ型であるマウス ESCs/iPSCs は G₁期が約 2~4 時間と非常に短いのに対して、プライム型であるマウス EpiSCs、ウサギ ESCs/iPSCs、ヒト ESCs/iPSCs は G₁期が約 2~10 時間であり、G₁期が有意に長くなっている細胞が確認された。さらに、既報の方法により、不完全ではあるがナイーブ化を行ったヒト、ウサギ iPSCs では、G₁期の平均値は短くなっていたが、G₁期が有意に長い細胞も存在した。また、分化した細胞やがん細胞株 (NMuMG、HeLa) では、細胞密度と G₁期の長さが比例の関係を示したが、ナイーブ型の G₁期の長さは細胞密度の影響を全く受けず、プライム型はその中間の性質を示すことがわかった。一方、S、G₂/M 期の長さはナイーブ型とプライム型で違いは見られなかった。また、個々の細胞の G₁期と S/G₂/M 期の長さに相関はなく、母細胞と娘細胞の細胞周期も無関係であることがわかった。以上のことから、PSCs の G₁期の長さの違いは、未分化性の程度の差異を反映していることが強く示唆された。

審 査 の 要 旨

本論文は、近年開発された Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator) 技術

を幹細胞研究に活用して各種血球細胞の細胞周期解析に最適な Fucci TG マウスを作製している。このような Fucci TG マウスを駆使して、造血幹細胞分画の細胞周期の時空間的な解析を可能したことは生物科学領域の基礎研究として高く評価できる。また、このような解析を通して造血幹細胞の純度を高めることに成功した点は独創性に秀でている。さらに、Fucci を導入した多能性幹細胞の細胞周期解析では、G₁期の長さの相違が多能性幹細胞の未分化状態の程度を判断するための指標となる可能性を提示しており、当該研究領域の先駆的な成果になると高く評価された。

平成27年2月3日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。