

氏 名 根 本 憲 一  
学 位 の 種 類 博 士 ( 医 学 )  
学 位 記 番 号 博 士 ( 論 ) 第 3 5 0 号  
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当  
学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 9 年 9 月 1 2 日  
学 位 論 文 題 目 Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in  
mouse and monkey ES cells

( マウス及びサル胚性幹細胞における siRNA を用いた遺伝子発現抑制と分化に関する研究 )

審 査 委 員 主 査 教 授 岡 部 英 俊  
副 査 教 授 佐 藤 浩  
副 査 教 授 田 中 俊 宏

## 論文内容要旨

*整理番号	354	(ふりがな) 氏名	ねもと けんいち 根本 憲一
学位論文題目	Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in mouse and monkey ES cells. (マウス及びサル胚性幹細胞における siRNA を用いた遺伝子発現抑制と分化に関する研究)		
<p><b>【目的】</b></p> <p>胚性幹細胞(ES 細胞)は自己複製能と様々な機能細胞に分化する多能性を有するため、幹細胞研究や再生医療への応用に不可欠である。これまで ES 細胞の分化方法としてレチノイン酸や DMSO などの薬物や、ある細胞系列に特異的に発現する遺伝子を導入する方法などが用いられていた。一方で、発生や分化過程においてはゲノムの広汎なメチル化や X 染色体の不活性化、genomic imprinting といった gene silencing が重要な役割を持つことが明らかにされてきた。そこで申請者は最近注目されている RNA 干渉法を ES 細胞の分化方法として利用することを試みた。特に化学合成 siRNA は導入が容易であり、ゲノムに組み込まれないため、ゲノム構造に影響を与えない利点があり、臨床応用に理想的な手段と考えられる。本研究では EGFP を発現するマウス及びサル ES 細胞を用いて siRNA による効率良い遺伝子抑制法を確立し、さらに多能性維持の主因子である POU 転写因子 Oct4 の gene silencing を行い ES 細胞を分化させることを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>1) マウス EGFP 発現 ES 細胞における EGFP の抑制: EGFP siRNA を lipofectamine 2000 にて導入後、EGFP 遺伝子抑制を経時的に蛍光顕微鏡、RT-PCR で解析した。さらに FACS を用いて EGFP の蛍光強度を定量的に評価した。</p> <p>2) マウス ES 細胞における Oct4 の抑制: Oct4 特異的な siRNA を導入し、mRNA の変化を RT-PCR にて評価した。栄養外胚葉の特異的マーカーである Hand1 と Cdx2 の発現についても同様に調べた。さらに Western blotting により Oct4 の蛋白質レベルでの変化を経時的に調べた。</p> <p>3) サル EGFP 発現 ES 細胞における EGFP の抑制: サル ES 細胞はヒト ES 細胞に非常に類似した性質を示すため、細胞移植医療の実用化研究の優れたモデルとなる。そこでサル ES 細胞における遺伝子抑制技術の確立も試みた。数種のカチオン性リポソーム試薬を試したが EGFP の導入効率が低かった。そこでセンダイウイルス(HVJ)エンベロープを用いて siRNA をサル ES 細胞内に導入し、mRNA および蛍光強度の変化をそれぞれ RT-PCR 及び FACS にて解析した。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>1) siRNA 導入は細胞が浮遊状態で行う方が、接着細胞で行うよりも高い導入効率を得られた。蛍光顕微鏡下の観察では EGFP の発現抑制効果は導入後 16 時間から確認され、48-96 時間で顕著となった。導入後</p>			

- 考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

120 時間では、発現は回復する傾向を示した。RT-PCR の結果、導入後 24 時間で mRNA の抑制が最大となり、48 時間後には回復が認められた。FACS 解析により、EGFP 蛍光の抑制が約 97%の細胞で検出され、導入後 48 時間で最大となり、約 1/13 に低下した。以上の結果からマウス ES 細胞において化学合成 siRNA により非常に効率良い発現抑制が可能であり、その抑制効果は4日間持続することがわかった。

2) Oct4-siRNA の導入により Oct4 mRNA の抑制は導入後 24 時間で最大となり、その後回復が認められた。また Oct4 の抑制に応じて原始外胚葉マーカー、Fgf5 も抑制され、一方で栄養外胚葉マーカー、Hand1、Cdx2 が急速に誘導された。Oct4 蛋白質は siRNA 導入後 24 時間から 4 日間低いレベルを維持した。さらに ES 細胞は栄養膜巨細胞の特徴である大きな核を持つ、大きく扁平な細胞形態へと変化した。以上の結果から Oct4 蛋白質が実際に siRNA によって抑制され、ES 細胞が栄養外胚葉系へ分化することが示唆された。

3) サル ES 細胞では HVJ エンベロープを用いた siRNA の導入が最も効率が良いことが蛍光顕微鏡による経時観察により示された。RT-PCR により mRNA は導入後 24 時間で最大抑制を示し、48 時間では回復し始めていたが、96 時間でも抑制状態にあることがわかった。FACS 解析においても EGFP 蛍光の抑制は導入後 24 時間で確認され、72-96 時間で最大の効果を示した。96 時間の時点で全細胞の約 98%において抑制が観察された。

#### 【考察】

マウス及びサル ES 細胞において効率良い siRNA の導入方法、遺伝子発現抑制方法を開発することができた。さらにマウス ES 細胞において、合成 siRNA を用いた Oct4 の一過性抑制により栄養外胚葉へ分化させることが可能であることがわかった。この際 mRNA レベルでは発現の回復が認められても蛋白質レベルでは抑制が継続していることも明らかとなった。siRNA 導入後、栄養外胚葉の特徴を示す細胞が認められた一方で Nanog 陽性の ES コロニーの増殖も認められた。この結果から Oct4 発現の回復は、分化しなかった ES 細胞集団の増殖によるものと考えられた。より効率良い分化のためには 25-30 塩基からなる合成二本鎖 RNA や合成 shRNA を用いた長期の抑制を必要とする可能性が示唆された。

サル ES 細胞においては、細胞膜上のシアル酸に結合し、膜融合により内部に封入された siRNA を放出する HVJ エンベロープベクターが有効であることが示され、その抑制効果は siRNA 導入後96時間以上継続した。この理由として、サル ES 細胞はマウス ES 細胞に比べ増殖速度が遅いことから、細胞分裂による細胞内残存 siRNA の希釈が遅れるためと考えられる。

#### 【結論】

マウス及びサル ES 細胞において化学合成した siRNA を利用して効率良く標的遺伝子を抑制する方法を開発した。さらに siRNA による Oct4 の一過性抑制により ES 細胞を栄養外胚葉に分化させることが可能であることを示した。合成 siRNA は導入が容易であり、特定遺伝子をターゲットとする上にゲノム構造を変化させないため細胞移植医療における細胞の分化方法として理想的である。今後 ES 細胞のみならず成体幹細胞への応用を試みることにより、新たな遺伝子治療法としての可能性も期待される。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	354	氏名	根本 寛一
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、マウス及びサル ES 細胞における siRNA を用いた遺伝子抑制と分化に関して検討を行ったものである。</p> <p>1. EGFP 発現マウス ES 細胞における EGFP の抑制  2. マウス ES 細胞における Oct4 の抑制  3. EGFP 発現サル ES 細胞における EGFP の抑制  の三段階により構成されていた。</p> <p>マウス ES 細胞においては、トリプシン処理により浮遊状態でカチオン性脂質を用いて導入することによりユニークかつ、効率のよい siRNA の導入条件を見出した。</p> <p>Oct4 の siRNA を用いて Oct4 遺伝子を一過性に抑制することにより、マウス ES 細胞を栄養外胚葉系へ分化誘導が可能なことを証明した。</p> <p>サル ES 細胞においては、コラゲナーゼ処理した ES コロニーに HVJ エンベロープベクターを用いてユニークかつ、効率の良い siRNA の導入条件を見出した。</p> <p>今後、この方法論を用いた ES 細胞の分化研究の推進、再生医療への応用が期待され、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>なお本学位授与申請者は平成 19 年 8 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
(平成 19 年 8 月 30 日)			