




審査委員会報告書

【書式11】

令和 4年 2月 4日

申請者	フリガナ	オグラ チカ	生年月日	昭和63年9月7日生
	氏名	小倉 千佳 (男・ <input checked="" type="radio"/> 女)	国籍又は本籍	大阪府
	学籍番号	13D5601	専攻名	生命情報工学専攻
論文題目		幹細胞におけるデルマタン硫酸の機能		
翻訳題目 (英文の場合のみ)				
審査 委員会 委員	(氏名) 印 (所属機関名) (役職名)			
	主査委員:	西原 祥子		創価大学大学院理工学研究科 教授
	委員:	高瀬 明		創価大学大学院理工学研究科 教授
	委員:	梅谷内 晶		創価大学大学院理工学研究科 教授
内容の要旨及び審査結果の要旨 最終試験の結果の要旨		別紙1 別紙2		
博士学位申請論文の受付		受付日: 令和 4年 1月 4日		
博士学位申請論文の受理		受理日: 令和 4年 1月 12日		<input checked="" type="radio"/> 可 ・ 不可
論文審査の可否		実施日: 令和 4年 1月 20日		<input checked="" type="radio"/> 合 ・ 否
最終試験の可否		実施日: 令和 4年 1月 20日		<input checked="" type="radio"/> 合 ・ 否
審査 委員会 の結論	審査委員会は、申請者である小倉千佳の提出した学位論文について詳細な検討を行い、かつ、申請者の学力および研究能力に関する試問を行った。その結果、論文の内容が博士(工学)の学位に値するものであり、かつ、申請者が十分な学力と研究能力を有するものと認定した。			

審査委員会の審査及び最終試験の結果を受け、当該研究科委員会は以下の通り判定しました。

研究科委員会の判定	開催日: 令和 4年 2月 15日		
	出席者数 31名	可数 31名	不可数 0名

最終合否 合 ・ 否

学位記番号	博 <input checked="" type="radio"/> 甲・乙 186号	授与年月日	令和 4年 3月 18日
学位の種類	博士 (工学)	備考	

研究科長 北野 晃朗 

内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1 (別紙 1)】

令和 4 年 2 月 4 日

氏名 (本籍)	小倉 千佳 (大阪府)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博甲186号
学位記の授与日	令和4年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 創価大学大学院学則第31条第2項該当 創価大学学位規則第3条の3第1項該当
論文題目	幹細胞におけるデルマトン硫酸の機能
論文審査機関	理工学研究科委員会
論文審査委員	主査委員 理学博士 西原 祥子 委員 獣医学博士 高瀬 明 委員 博士 (薬学) 梅谷内 晶



<論文の内容の要旨>

本論文は、グリコサミノグリカンの一種であるデルマトン硫酸に着目し、精製したデルマトン硫酸を用いた解析とデルマトン硫酸の合成に関わる硫酸転移酵素の発現制御を行い、これまでに全く不明であった「幹細胞におけるデルマトン硫酸の機能」を初めて明らかにした。デルマトン硫酸は、(1) マウス胚性幹細胞やヒト神経幹細胞からの神経分化を促進し、また一方で、(2) マウス胚性幹細胞においては、自己複製能と未分化性維持に必要であった。本論文は、序論、方法、結果、および、考察から構成されており、以下にその要旨を述べる。

序論

マウス胚性幹細胞は、着床前の胚性 3.5 日の内部細胞塊から樹立された細胞で、自己複製能と身体を構成する全ての細胞に分化する能力、すなわち多能性を有している。この二つの性質を維持して増殖することを未分化状態と呼ぶ。マウス胚性幹細胞の未分化状態の維持と分化誘導には、様々なシグナルや成長因子が寄与しており、そこへの糖鎖、特にグリコサミノグリカンの関与がこれまでに報告されている。

グリコサミノグリカンは、プロテオグリカンのコアタンパク質を除いた糖鎖部分の総称で、代表的なものには、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸 (DS)、ケラタン硫酸があり、細胞表面や細胞外マトリックスに存在する。ケラタン硫酸は、胚性幹細胞のマーカーとして用いられており、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸は、未分化状態の維持や分化に必要であることが報告されていた。しかし、これまで、マウス胚性幹細胞を含む幹細胞における DS の機能は不明であった。このため、本論文は、「幹細胞における DS の機能」を明らかにすることを目的とした。

方法

解析に用いた細胞は、マウス胚性幹細胞とヒト神経幹細胞、さらにマウス胚性幹細胞からの神経系への分化系、ヒト神経幹細胞から神経への分化系である。

神経への分化においては、マウス胚性幹細胞からの分化系と神経幹細胞からの分化系に精製 DS を加え、リアルタイム PCR 解析による各種神経分化マーカーの発現や神経突起の伸長から、その効果を判定した。

胚性幹細胞の未分化性の維持においては、DS の生合成経路でのみ働く硫酸転移酵素 Dermatan 4-Sulfotransferase 1 (D4ST1) をとりあげ、マウス胚性幹細胞において、*D4ST1* をノックダウン、あるいは、過剰発現させて、その影響を検討した。自己複製能はアルカリフォスファターゼ染色、

未分化性維持やそれに関わるシグナルに関しては、リアルタイム PCR 解析による未分化性維持転写因子の発現やシグナルのターゲット遺伝子の発現、ウエスタンブロット解析による各種シグナル構成因子のリン酸化などを解析した。

結果と考察

結果は、大きく 2 つ (1) 幹細胞からの神経分化における DS の機能と (2) D4ST1 のマウス胚性幹細胞における未分化性維持への寄与に分かれる。以下に、それぞれについて述べる。

(1) 幹細胞からの神経分化における DS の機能

マウス胚性幹細胞からの神経分化系では、神経分化に従い、DS と DS 合成に関わる 4 種の酵素がすべて増加しており、DS の神経分化における機能の存在が示唆された。分化系に精製した DS を加えたところ、神経分化マーカーの亢進と神経突起の伸長の促進が観察され、DS が神経分化を促進することが分かった。さらに、ヒト神経幹細胞からの神経分化においても、神経分化マーカーの亢進と細胞遊走の促進がみとめられ、DS が神経分化を促進することが分かった。これらの事実により、DS を用いたより効果的な神経分化系の構築が可能となった。

(2) D4ST1 のマウス胚性幹細胞における未分化性維持への寄与

マウス胚性幹細胞で DS の生合成に関わる *DAST1* をノックダウンすると、自己複製能が低下し、*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2* などの未分化性維持転写因子の発現が低下し、DS が未分化性維持に関わっていることが分かった。逆に、*DAST1* を過剰発現させると自己複製能が増すことも明らかになった。さらに、ノックダウン細胞では、未分化性維持に働く BMP シグナルが低下しており、DS は BMP シグナルを制御して未分化性維持に機能していると考えられた。また、Wnt シグナルの過剰な伝達を防いでいることも分かった。これらの事実から、DS がマウス胚性幹細胞の未分化性維持に機能していることが明らかになった。

<論文審査結果の要旨>

本論文では、これまでに幹細胞における機能が明らかにされていなかったデルマタン硫酸 (DS) に対し、(1) 精製した DS を用いた幹細胞の神経分化における機能解析と、(2) DS の生合成に特異的な硫酸転移酵素 *DAST1* の発現制御によりマウス胚性幹細胞における機能解析を行い、DS の幹細胞における機能を初めて明らかにした。すなわち、(1) DS がマウス ES 細胞とヒト神経幹細胞の神経分化を促進すること、(2) *DAST1* がマウス胚性幹細胞の未分化性と自己複製能に寄与することを新規に明らかにした。新規機能を証明する十分なデータも有し、また、再生医療や細胞治療への応用の可能性も期待できる。以上の理由で、本論文は、学位論文に値する内容であると認定する。




なお、本研究の結果は、以下の学術雑誌に掲載された。

1. Dermatan sulphate promotes neuronal differentiation in mouse and human stem cells. Ogura C, Hirano K, Mizumoto S, Yamada S, Nishihara S. *J Biochem.* 2021 Feb 6;169(1):55-64. doi: 10.1093/jb/mvaa087. PMID: 32730567
2. Dermatan-4-O-sulfotransferase-1 contributes to the undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. Ogura C, Nishihara S. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 23;9:733964. doi: 10.3389/fcell.2021.733964. eCollection 2021. PMID: 34631712

最終試験の結果の要旨

【書式11（別紙2）】

令和 4年 2月 4日

フリガナ 申請者氏名	オグラ チカ 小倉 千佳	専攻名	生命情報工学 専攻
審査委員会委員	主査委員	西原 祥子	
	委員	高瀬 明	
	委員	榎谷内 晶	
要旨			
<p>最終試験は、上記3名の審査委員により、令和4年1月20日に実施し、学位申請者に対して、研究内容に関する試問を行った。その結果、申請者は、博士（工学）としての十分な学力と研究能力を有するものと判定された。したがって、審査委員会は、最終試験を合格と認定した。</p>			