



Title	Study on Culture-Driven Epigenetic Memory during Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells
Author(s)	Thanuthanakhun, Naruchit
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88011
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (THANUTHANAKHUN NARUCHIT)	
Title	Study on Culture-Driven Epigenetic Memory during Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells (ヒトiPS細胞の増幅中における培養由来のエピジェネティックメモリーに関する研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are a promising source of stem cells for regenerative medicine. To control the quality and stability of hiPSC expansion for practical applications, understanding how the cell properties are affected by culture environmental factors during expansion process is critical. The main objective of this thesis is to elucidate the culture-driven epigenetic memory and its role in modulating the quality of cultured hiPSCs.</p> <p>In chapter 1, formation of epigenetic memory was firstly investigated in hiPSCs under general expansion conditions including two-dimensional (2D) monolayer and three-dimensional (3D) aggregate cultures. Quantitative analysis of global histone methylation by western blotting revealed that cells in 2D culture upregulated active H3K4me3 mark and downregulated repressive H3K27me3 mark, whereas the cells in 3D culture significantly earlier upregulated the H3K4me3 but constantly maintained the H3K27me3. After subculture into new culture vessels, the cells collected from both 2D and 3D cultures exhibited their ability to reset and initialize the epigenetic memory to baseline levels detected in the initial culture period before subculture. Moreover, compared to cells in 2D culture, the cells in 3D culture demonstrated distinct transcriptional activation of naïve pluripotency signatures. Overall, this chapter described the effect of different culture conditions on epigenetic memory formation and its initialization after subculture.</p> <p>In chapter 2, the epigenetic memory of hiPSCs was further examined during prolonged expansion culture at different cell growth phases. Cells collected from exponential and stationary growth phases maintained the capability of epigenetic memory initialization after subculture; however, the cells collected from long-term stationary growth phase that formed and lasted the epigenetic memory for several days in past culture distinctly showed consolidation of epigenetic memory after subculture. In addition, the epigenetic memory formed at different growth phases in past culture was found associated with the lineage differentiation preference. Concisely, prolonged expansion of hiPSCs under long-term stationary phase resulted in the epigenetic memory consolidation after subculture.</p> <p>Taken together, this thesis demonstrated epigenetic memory formation during expansion of hiPSCs and the impact of past culture experience on epigenetic memory initialization and consolidation after subculture. This study paves the way for controlling the cell quality by considering epigenetic memory mechanism, and the improved understanding of cellular responses to the culture environments may help enable the process design and optimization for manufacturing of hiPSCs.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (THANUTHANAKHUN NARUCHIT)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 紀ノ岡 正博
	副査 教授 渡邊 肇
	副査 教授 藤山 和仁

論文審査の結果の要旨

本論文では、ヒト多能性幹細胞の大量増幅における品質管理手法の提案として、培養中のエピジェネティックスに注目し、2次元単層培養やおよび3次元での集塊培養でのエピジェネティックスの変化、特に、ヒストン特定部位のメチル化の程度の経過や培養条件の違いによる影響について検討を行っている。

第1章においては、2次元単層培養やおよび3次元での集塊培養において、エピジェネティック記憶の形成を確認している。2次元培養中、ヒストンメチレーションの程度（以下、エピジェネティック記憶の程度）を定量的解析により、細胞はメチレーション部位 H3K4me3 のエピジェネティック記憶の程度は顕著に増加し、H3K27me3 は抑制されたことを示している。一方で、3次元培養において H3K4me3 でのエピジェネティック記憶の程度は増加し H3K27me3 では一定であることを示している。さらに、これらの通常培養条件での継代後のメエピジェネティック記憶の程度は、培養初期と同等に戻っていること、つまりエピジェネティック記憶の初期化を示している。これらの現象については、iPS細胞の2つの未分化状態（ナイーヴ、プライム）の状態変化を検討し原因について論じている。

第2章においては、連続した継代培養中のエピジェネティック記憶の変化を検討している。通常の培養条件での細胞では、H3K4me3 および H3K27me3 のメチル化が、継代後の新しい培養の初期でのエピジェネティック記憶は、以前の培養初期と同じレベル、つまり、記憶の初期化がなされていることを示している。一方、培養における定常期を長期化した継代培養において、エピジェネティック記憶が初期化されず固定されていること、つまり、記憶の固定を示している。さらに、この記憶の固定が、iPS細胞の誘導に際し、3胚葉系の分化の程度が変化、つまり分化の癖を有することを示している。これは、継代培養の条件によっては、エピジェネティック記憶の程度が変化し、細胞分化特性のポテンシー変化が生じていることを示している。

以上のように、本論文はヒト多能性幹細胞の培養におけるエピジェネティック記憶の変化、特に、継代による記憶の初期化、前培養の条件による継代後の記憶の固定、が生じていることを示している。さらに、品質管理として、このエピジェネティック記憶の変化がポテンシーを変化させ細胞特性が変化していることを示している。これは、iPS細胞の品質管理には、エピジェネティック記憶が重要な因子となりうることを示しており、今後期待される iPS細胞の商業化に向けて、品質管理の一助となる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。