The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro
Author(s)	下田, 雅史
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48948
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【24】

氏　　名	下（しも）　田（だ）　雅（まさ）　史（ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１６２３　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 11 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学　位　論　文　名	Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro （Sox17 は in vitro において胚体外内胚葉の後期分化で実質的な役割を果たす）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　仲野　　徹　　教　授　濱田　博司

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

胚体外内胚葉は、胚組織の構築に直接は寄与しないものの、哺乳類の胚発生において不可欠な役割を担っている。胚体外内胚葉は胚盤胞の内部細胞塊から生じて原始内胚葉へ分化し、さらにそれが臓側内胚葉と壁側内胚葉に分化する。胚体外内胚葉の発生途上では数々の転写因子の発現が認められるが、Sry 関連転写因子の Sox17 もそのうちのひとつである。Sox17 欠失マウスでは肝臓、膵臓、腸管などの胚性内胚葉由来の組織に致命的な欠損を生じるが、胚体外内胚葉は正常に発生する。これは、胚体外内胚葉では Sox7 という Sox17 に類似した構造をもつ転写因子が発現しているが、Sox17 欠失マウスの胚体外内胚葉では Sox7 が Sox17 の働きを代償するためではないかと推定されてきた。従って、Sox17 欠失マウスの解析によっても、Sox17 が胚体外内胚葉の発生に実質的に関与しているのかどうかは不明であった。

本研究では、胚体外内胚葉の発生が胚性幹細胞（ES 細胞）の in vitro 分化系で再現できることから、この系を使って Sox17 の胚体外内胚葉の発生における役割を明らかにしようとした。

〔　方法ならびに成績　〕

まず、Sox17 のコンディショナル発現 ES 細胞を作製し、Sox17 の gain-of-function 表現型を解析した。ES 細胞で Sox17 を強制発現させても、ES 細胞の形態や未分化マーカーの発現に変化は見られず、胚体外内胚葉マーカーの発現も認められなかった。さらに、leukemia inhibitory factor（LIF）非存在下で ES 細胞を懸垂培養し、胚様体を形成させたところ、胚体外内胚葉への分化は誘導されなかった。従って、Sox17 の強制発現は ES 細胞の胚体外内胚葉への分化を誘導しないと考えられた。

一般に、ES 細胞を LIF 存在下で凝集させると、凝集塊の表面の細胞は原始内胚葉に分化するが、それ以降の分化は生じない。これを利用して、Sox17 の強制発現により原始内胚葉から臓側・壁側内胚葉への分化が促進されるかどうかを検討した。Sox17 強制発現 ES 細胞を LIF 存在下で凝集させると、形態的に臓側・壁側内胚葉の存在を認めた。さらに、凝集させてからの時間とともに、臓側・壁側内胚葉マーカーの発現量が増加した。従って、Sox17 の強制発

現は原始内胚葉から臓側・壁側内胚葉への分化を促進させると考えられた。

Nanog は内部細胞塊および ES 細胞から胚体外内胚葉への分化を阻害する転写因子である。そこで、ES 細胞における Sox17 の強制発現が、Nanog の分化阻害効果を乗り越えることができるかどうかを検討した。Nanog を過剰発現し、Sox17 もコンディショナルに誘導させることのできる ES 細胞を作製した。両転写因子をこの ES 細胞で強制発現させ、LIF 存在下で凝集させたところ、胚体外内胚葉への分化が阻害された。従って、Sox17 の強制発現は Nanog の分化阻害効果を乗り越えることができないと考えられ、Sox17 の強制発現は ES 細胞から原始内胚葉への分化に関与しないとした先ほどの結果を支持するものであった。

次に、Sox17 欠失 ES 細胞を用いて胚様体を形成させたときに、胚体外内胚葉の分化が阻害されるかどうかを検討した。胚体外内胚葉マーカーの発現を調べたところ、原始内胚葉以降の分化マーカーの発現が減少していた。そこで胚葉体の形態および原始内胚葉マーカーの発現を免疫染色で検討したところ、原始内胚葉以降の分化が阻害され、原始内胚葉の蓄積を認めた。従って、in vitro においては Sox17 が原始内胚葉以降の分化に関与していると考えられた。

最後に、Sox17 欠失マウスにおいて、胚体外内胚葉の Sox17 の機能が Sox7 によって代償されうるかどうかを調べるために、Sox17 欠失マウスの胚体外組織中の Sox7 の発現を検討した。前項の結果では、Sox17 欠失 ES 細胞由来の胚葉体で Sox7 の発現が減少していたが、Sox17 欠失マウスにおいては Sox7 の発現が野生型と同レベルに保たれていた。これらの結果から、Sox17 欠失マウスの胚体外内胚葉が正常に発生する理由として、Sox7 による代償が働いているためであることが示唆された。

〔 総　　括 〕

本研究は、Sox17 が ES 細胞由来の胚体外内胚葉の後期分化、すなわち原始内胚葉から臓側・壁側内胚葉への分化に実質的に関与していることを明らかにした。さらに、in vivo においても、Sox7 の発現が低下している状態では Sox17 が胚体外内胚葉の後期分化に不可欠である可能性を示した。

胚体外内胚葉の発生において、後期の分化に特異的に働く転写因子を同定したのは本研究が初めてである。本研究のように ES 細胞を用いた in vitro 分化の研究を行うことで、細胞分化の分子生物学的な制御機構が明らかになるだけでなく、ES 細胞を用いた再生医療に貢献できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

本研究では胚体外内胚葉の発生過程において一過性に発現する Sox17 という転写因子に着目し、その分子の胚体外内胚葉の発生における関与を検討した。胚性幹細胞を用いることにより、胚体外内胚葉の発生が in vitro で再現できるため、申請者はこの in vitro 分化系を使って Sox17 の役割を解析した。Sox17 を強制発現させた胚性幹細胞および Sox17 を欠失させた胚性幹細胞を用い、Sox17 が in vitro において胚体外内胚葉の後期分化に関与することを明らかにした。さらに、Sox17 欠失マウスでは胚体外内胚葉の発生が正常に行われるが、その原因として、Sox17 と同じサブグループに属する Sox7 が代償していることを示唆した。従って、Sox17 が in vitro において胚体外内胚葉の分化に関与していることが明確になり、invivo においても Sox17 が Sox7 とともに胚体外内胚葉の分化に関与することが示唆された。本研究は、未だ不明な点の多い胚体外内胚葉の発生について、転写因子による制御機構の一端を明らかにし、同時に胚性幹細胞の再生医療への応用に貢献しうるという点で意義深く、学位の授与に値すると考えられる。