

Title	The Grb2/Mek Pathway Represses Nanog in Murine Embryonic Stem Cells
Author(s)	濱崎, 考史
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48984
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	はま 濱 ざき 崎 たか 考 し 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 5 2 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 8 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	The Grb2/Mek Pathway Represses Nanog in Murine Embryonic Stem Cells (マウス胚性幹細胞において Grb2/Mek 経路が Nanog を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 仲 野 徹 (副査) 教 授 米 田 悦 啓 教 授 宮 崎 純 一

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

胚性幹細胞は、胎生初期の個体発生を培養皿の上で再現しながら分化する。胚性幹細胞を **Hanging Drop** 法を用い凝集させた時、最初に認められる分化細胞は、最外層に現れる原始内胚葉の細胞である。この過程は、初期胚である後期胚盤胞の内細胞塊の外層が原始内胚葉に分化する過程を正確に再現している。これまでに我々は胚性幹細胞の分化抑制因子である **Leukemia inhibitory factor (LIF)** 存在下においても細胞凝集により原始内胚葉への分化が誘導され、最外層におけるホメオボックス遺伝子 **Nanog** の抑制が必須であることをつきとめた(参考論文1参照)今回、胚性幹細胞から原始内胚葉への分化における **Nanog** 遺伝子発現抑制に関わるシグナル伝達機構の解明を試みた。

[方法ならびに成績]

これまでにマウスの遺伝学的解析により原始内胚葉の形成には、線維芽細胞成長因子 (**FGF**) とその受容体 (**FGFR**) との結合が必須であることが報告されている。しかし、線維芽細胞成長因子で胚性幹細胞を刺激しても原始内胚葉へは分化誘導できない。その原因として、**FGFR** をはじめとするレセプター型チロシンカイネースがプロテインチロシンリンフォスファターゼ (**PTP**) による負のフィードバック調節をうけていると考えられた。そこで、**PTP** に対する阻害剤 (バナジン酸ナトリウム) を胚性幹細胞に加えたときにおこる変化を観察し以下の結果を得た。

- 1) バナジン酸ナトリウム添加により、細胞内蛋白のチロシンリン酸化が増大し、原始内胚葉への分化した細胞が細胞凝集の最外層だけでなく内層にも出現した。
- 2) その時間経過において、**Nanog** 遺伝子の発現抑制は、**Nanog** の制御因子である **Oct3/4** および **Sox2** の発現量が低下する前に認められた。
- 3) さらに、**Nanog** 遺伝子を強制発現させた条件においても、内在する **Nanog** 遺伝子の発現はバナジン酸ナトリウムにより抑制された。
- 4) チロシンリン酸化アダプター分子である **Grb2** 欠乏胚性幹細胞においては、バナジン酸ナトリウムによる **Nanog** 遺伝子発現抑制は認められなかった。
- 5) バナジン酸ナトリウムの添加により **Erk**、**AKT** および **JNK** のリン酸化が増大したが、それぞれの経路に対する

特異的阻害剤存在下でバナジン酸ナトリウムの効果を判定すると、Erk に対する Mek 阻害剤存在下でのみ Nanog 遺伝子の発現抑制はおこらなかった。

これらの実験結果より、Nanog 遺伝子の発現抑制はチロシンリン酸化により Grb2 を介して Mek/Erk 経路の活性化によりおこることが推論された。

さらに、細胞凝集した際の最外層での Nanog 遺伝子の発現抑制においても FGFR/Grb2/Mek/Erk を介していることの確認を種々の阻害剤を用いて調べた。

FGFR 阻害剤または Mek 阻害剤を細胞凝集時に添加した場合のみ、最外層での Nanog 遺伝子の抑制が阻害されることを確認した。

また、胚性幹細胞を未分化状態で維持している培養条件下で、一部の細胞においてすでに Nanog 遺伝子の発現が低下していることが観察され、さらには FGFR 阻害剤添加により Nanog 遺伝子が低下した細胞が消失し、Nanog の発現が均一の細胞集団になることがわかった。

最後に Mek 活性型変異体を直接胚性幹細胞に導入すると Nanog 遺伝子が抑制され原始内胚葉へ分化が誘導されることを確認できた。

[総 括]

胚性幹細胞における多能性維持および細胞運命決定にホメオボックス遺伝子、Nanog が重要な役割を果たしていることが近年明らかになりつつある。しかし Nanog 遺伝子の発現を制御する細胞外因子およびシグナル伝達系についてはまだ不明な点が多い。今回われわれは、さまざまな遺伝子工学的および薬理学的手法を駆使して Nanog 遺伝子の発現抑制には FGFR/Grb2/Mek/Erk 経路の活性化が重要であることを見出した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、胚性幹細胞（ES 細胞）における多能性維持および細胞運命決定に重要な Nanog 遺伝子の発現を制御する細胞外因子およびシグナル伝達系について、遺伝子工学的および薬理学的手法により解明を試みたものである。

まず、ES 細胞内蛋白のチロシンリン酸化をバナジン酸ナトリウムにて増大させ、原始内胚葉へ高率に分化誘導できることを見出している。その際、Nanog 遺伝子の発現が、多能性維持に関与する他の遺伝子と比し選択的に抑制され、Nanog 遺伝子を強制発現させた条件においても、内在する Nanog 遺伝子が抑制されることを確認している。さらにチロシンリン酸化アダプター分子である Grb2 欠損 ES 細胞においては、バナジン酸ナトリウムによる Nanog 遺伝子発現抑制反応が失われ、Grb2 を発現させることにより回復することを示している。またバナジン酸ナトリウムの添加により活性化される PI3K、MEK および JNK 経路のうち Mek/Erk 経路の活性化が必須であることを、Mek 阻害剤存在下でのみ Nanog 遺伝子の発現抑制反応が消失し、逆に Mek 活性型変異体により Nanog 遺伝子が抑制されることで証明している。また、未分化状態を維持している ES 細胞において、Grb2/Mek 経路を生理的に活性化し Nanog 遺伝子を抑制しているのは、レセプターチロシンキナーゼの FGFR であることを、その特異的阻害剤により Nanog 遺伝子の発現が上昇することから示している。

以上要するに、本論文は、胚性幹細胞（ES 細胞）における多能性維持および細胞運命決定に重要な Nanog 遺伝子の発現を積極的に抑制する細胞外因子およびシグナル伝達系として、FGFR/Grb2/Mek/Erk 経路の活性化が重要であることを明らかにしたものであり、この成果は幹細胞研究および再生医療の発展に寄与することが極めて大きい。

よって本論文は、学位請求論文として認められる。