

Title	Efficient Derivation of Embryonic Stem Cells by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3
Author(s)	榎原, 宏紀
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49305">https://hdl.handle.net/11094/49305</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	うめ ぼん ひろ き 榎 原 宏 紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 2 1 8 5 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Efficient Derivation of Embryonic Stem Cells by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3 阻害による効率的な ES 細胞樹立法の確立)
論文審査委員	(主査) 教授 仲野 徹  (副査) 教授 近藤 寿人 教授 米田 悦啓

#### 論 文 内 容 の 要 旨

Embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts. The efficiency of ES cell derivation is affected by genetic variation in mice, i.e., some mouse strains such as C57BL/6 are amenable to ES cell derivation, whereas others such as BALB/c are refractory. Developing an efficient method to establish ES cells from strains of various genetic backgrounds should be valuable for derivation of ES cells in various mammalian species including human. Although it is well established that various signaling pathways, including phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt and Wnt/ $\beta$ -catenin, regulate the maintenance of ES cell pluripotency, little is known about the signaling pathways involved in the derivation of ES cells from ICMs.

In this study, we analyzed the effects of inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), one of the crucial molecules in the regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin, and activation of Akt signaling on ES cell derivation from ICM cultures. Pharmacological inhibition of GSK-3 signaling suppressed the outgrowth of endodermal cells and augmented the efficiency of ES cell derivation from ICM cultures in both C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In the *in vitro* differentiation assays, expression of the marker genes for three germ layers was efficiently induced in these ES cell lines. When transplanted into nude mice, the ES cells produced various differentiated tissues. Furthermore, these ES cells were incorporated and contributed to the development of chimeric mice when injected into blastocysts. Taken together with the above *in vitro* and *in vivo* differentiation assays, our data indicate that the ES cells established by GSK-3 inhibition possessed pluripotent differentiation ability. In contrast to GSK-3 inhibition, activation of Akt signaling did not show a supportive effect on ES cell derivation. Our pharmacological approach using a GSK-3 inhibitor potentially provides a general strategy to improve ES cell derivation from diverse mammalian species.

## 論文審査の結果の要旨

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell ; ES 細胞) は胚盤胞の内部細胞塊から樹立される細胞株であり、試験管内において未分化性を維持したまま増殖することができる。マウス ES 細胞の樹立効率は遺伝的背景や培養方法などに大きく影響されるが、内部細胞塊から ES 細胞が樹立される機構については、ほとんどわかっていない。

榎原宏紀氏は、「効率的な ES 細胞樹立法の確立」を目指し、とくに [PI3K-Akt] と [Wnt/ $\beta$ -catenin] シグナル経路が、内部細胞塊から ES 細胞が樹立される際に及ぼす影響を調べた。まず、Akt を活性化させた場合の効果を調べたところ、いったん樹立された ES 細胞の未分化性維持には重要であるものの、ES 細胞の樹立効率への影響は観察されなかった。次に、Wnt シグナルを負に制御する酵素である Glycogen Synthase Kinase (GSK-3) の阻害剤 (BIO) の効果を調べたところ、ES 細胞の樹立効率を有意に上昇させた。この効果は C57BL/6 系統マウスだけでなく、BALB/c 系統マウスにおいても顕著だった。この阻害剤を用いて樹立された ES 細胞は、試験管内での分化誘導実験及びキメラマウス作成実験により、正常な多分化能を持っている事が確認された。さらに、C57BL/6 系統マウスから BIO を用いて樹立した ES 細胞は、生殖細胞へ寄与する能力も持っていた。ES 細胞樹立効率が上昇する機構を調べたところ、GSK-3 の阻害により、Nanog 陽性細胞は維持されるが、一方で Nanog 陰性細胞が減少することが判った。すなわち、GSK-3 の阻害により、epiblast は維持されるが原始内胚葉細胞が減少するためと考えられた。

以上の研究結果は、ES 細胞が樹立される機構に新たな知見を加えるだけでなく、効率の良い樹立方法を開発したことの意味・波及効果は大きい。従って、本論文は博士 (理学) の学位に値するものと認める。