



Title	Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation under mesoderm induction
Author(s)	山野, 範子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57733">https://hdl.handle.net/11094/57733</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">大阪大学の博士論文について</a>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

【84】	
氏 名	やま 野 範 子
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学 位 記 番 号	第 23939 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23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	Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation under mesoderm induction (マウスES細胞から中胚葉への分化過程においてAktの活性化により誘導された始原生殖様細胞とその可塑性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 仲野 徹 (副査) 教 授 近藤 寿人 教 授 濱田 博司

#### 論 文 内 容 の 要 旨

Specification to primordial germ cells (PGCs) is initially mediated by mesoderm-induction signals during gastrulation. However, PGCs avoid the further differentiation into mesoderm and one of the

important events for the development of PGCs is the repression of mesoderm related genes. Although the developmental potency of PGCs is restricted to the germ lineage in normal development, PGCs can easily dedifferentiate into cells with broader differentiation potential in the presence of a few growth factors.

Phosphoinositide-3 kinase and its downstream kinase Akt maintain pluripotency of embryonic stem cells (ESCs), and promote dedifferentiation of PGCs *in vitro* and formation of testicular teratoma *in vivo*. I investigated the effects of Akt activation on mesoderm induction using an *in vitro* differentiation induction method for murine ESCs on OP9 stromal cells. I found that Akt activation during *in vitro* mesodermal differentiation of ESCs generated self-renewing spheres with differentiation states between those of ESCs and PGCs. The spheres could be expanded for many generations when cultured on the OP9 layer with continuous Akt activation. Essential regulators for PGC specification and their downstream germ cell-specific genes were expressed in the spheres, indicating that the sphere cells had commenced differentiation to the germ lineage. However, the sphere cells did not proceed to spermatogenesis after transplantation into the germ cell lacking testes. Sphere cell transfer to the original feeder-free ESC cultures resulted in chaotic differentiation. Although the addition of 4OHT enhanced cell survival after transfer, differentiation was inevitable and the ESC-like cells never emerged from the spheres during long-term observation. In contrast, when the sphere cells were cultured on mouse embryonic fibroblasts, reversion to the ESC-like state was observed. The ESC-like cells could be expanded under the feeder-free ESC culture condition, unlike the sphere cells. The ESC-like cells also appeared from the sphere cells in feeder-free cultures with ERK-cascade and GSK3 inhibitors. These results indicate that Akt signaling promotes a novel metastable and pluripotent state that is intermediate to those of ESCs and PGCs.

#### 論文審査の結果の要旨

セリンスレオニンキナーゼAktは、始原生殖細胞における分化多能性の再獲得、またES細胞の分化多能性維持に重要なシグナルの一つである。申請者は、OP9フィーダー細胞を用いたES細胞の中胚葉への分化過程において、Aktがその分化能に与える影響を調べた。その結果、Aktの活性化により、中胚葉細胞ではない浮遊した細胞塊を生じることを見出した。この細胞塊は、自己複製能があり、OP9上でAktを活性化し続けることにより数か月以上に渡って培養を続けることができる。この細胞塊をAkt-sphereと名付け、その特性を解析したところ、始原生殖細胞の分化のきっかけとなる転写因子およびその下流の遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。Akt-sphereの細胞は、W/W<sup>v</sup>マウスの精巣に移植しても奇形腫を形成するのみで精子形成には至らなかったことから、成熟した始原生殖細胞の性質を持つわけではない。一方で、マウス胚纖維芽細胞をフィーダーとした培養条件下や、ERKカスケードおよびGSK3阻害剤の存在下において、元のES細胞の分化段階に戻ることができる、metastableな分化状態にあることが分かった。遺伝子の発現パターンやヒストンの修飾状況から、

Akt-sphereの細胞はE7.5マウス胚程度の、初期の始原生殖細胞に対応することが推定される。今後は、Akt-sphereの細胞をより成熟した、機能的な始原生殖細胞の状態に変化させる条件を調べること、また、始原生殖細胞分化におけるAktの役割を明らかにすることが課題であろう。

本研究は、始原生殖細胞の分化制御において極めて新しい知見をもたらした。論文内容は明解で分かりやすく、背景から考察までしっかりと書かれたものであった。博士（理学）の学位に値するものと認める。