

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

## Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells (胚性幹細胞の胚体外内胚葉分化におけるRasの関与)

氏名 小出(吉田) 麗

胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) は、胚盤胞の内部細胞塊あるいはエピブラストより樹立された全能性を有する細胞株である。ES 細胞は胚盤胞へ注入することによって生殖細胞を含む全ての細胞系譜に分化できるため、ノックアウトマウスの作成など発生工学の道具として利用されてきたが、ヒト ES 細胞の樹立により、最近では再生医学への応用も期待されている。ES 細胞は *in vitro* でも様々な細胞系譜へ分化する能力を持つ。*in vitro* で分化を誘導するために最も用いられている方法として、胚様体を形成させる方法がある。ES 細胞を浮遊状態で培養すると、胚様体と呼ばれる球形の細胞塊を形成する。胚様体は、外層が胚体外内胚葉、内層が原始外胚葉からなる二層構造をとる。胚体外内胚葉は原始内胚葉、近位内胚葉、ならびに遠位内胚葉を指し、将来羊膜へ発生する。これに対して、原始外胚葉は外胚葉、中胚葉、内胚葉へ分化し、将来個体を形成する部分である。胚様体は、その構造がマウス6日胚の円筒胚によく似ているだけでなく、胚体外内胚葉系のマーカーである *gata4* や原始外胚葉のマーカーである *fibroblast growth factor (fgf) 5* などの遺伝子発現パターンも共通であることから、初期発生を研究する上で便利な系と成り得る。

Ras は低分子量 GTP 結合タンパク質に属し、H-, N-, K-Ras の3種類が存在する。Ras はヒト癌の約 30% でその活性型変異が報告されており癌遺伝子として有名ではあるが、その一方で、PC12 細胞の NGF による神経細胞への分化や、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化に必要であることが知られている。また *K-ras* のノックアウトマウスは胎生致死であることから、発生においても重要な役割を果たしていることが推測される。しかしながら、これまで Ras の ES 細胞における役割に関する知見は得られていなかった。

まず最初に、ES 細胞に Ras の活性型変異体 (Ras[G12V]) を強制発現させたところ、ES 細胞の未分化状態維持因子である白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) 存在下で培養しているにも関わらず、未分化 ES 細胞に特徴的なコンパクトコロニーが観察されず、*oct3/4* および *rex-1* といった未分化状態特異的な遺伝子マーカーの発現も抑制されていた。この結果は、Ras が ES 細胞の分化へ関与している可能性を示唆する。そこで次に、*in vitro* の系を用いて Ras の役割を探索した。胚様体形成に伴う Ras の活性の変化を GTP 結合型 Ras を測定する pull-down 法を用いて調べたところ、Ras は胚様体形成に伴い活性化されることを見出した (図 1)。また、Ras の優性抑制型変異体 (Ras[S17N]) を胚様体で発現させ、Ras の活性化を抑制したところ、*nodal*、*gooseoid* といった外胚葉、中胚葉の分化マーカー遺伝子の発現はほとんど影響を受けなかったが、*gata4*、*gata6*、*hepatocyte nuclear factor (hnf) 3 $\beta$* 、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP) などの胚体外内胚葉マーカー遺伝子の発現は著しく抑制された (図 2)。一方、Ras の活性型変異体を胚様体で強制発現させると、これらの胚体外内胚葉遺伝子群の誘導が促進されたことから、Ras が胚体外内胚葉への分化において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Ras の下流に位置する経路として、Raf/MEK/Erk、PI3 kinase/Akt および RalGEF/Ral 経路が知られているが、Raf/MEK/Erk 経路を選択的に活性化する Ras の変異体 (Ras[G12V, E37G]) を胚様体において発現させると、胚体外内胚葉分化マーカー遺伝子の発現が促進された。一方、胚様体を MEK 阻害剤である U0126 で処理したところ、これらの遺伝子の発現は抑制され、形態的にも胚体外内胚葉層の発達が阻害されていた (図 3)。さらに、胚様体での Erk のリン酸化の局在および胚体外内胚葉のマーカー遺伝子である *afp* の発現を免疫組織化学的手法によって検討したところ、両者とも胚体外内胚葉層での発現が認められた。これらのことから、Ras が Raf/MEK/Erk 経路を介して胚体外内胚葉への分化を誘導していることが推測された。

Ras の下流に位置する経路として、Raf/MEK/Erk、PI3 kinase/Akt および RalGEF/Ral 経路が知られているが、Raf/MEK/Erk 経路を選択的に活性化する Ras の変異体 (Ras[G12V, E37G]) を胚様体において発現させると、胚体外内胚葉分化マーカー遺伝子の発現が促進された。一方で、胚様体を MEK 阻害剤である U0126 で処理したところ、これらの遺伝子の発現は抑制され、形態的にも胚体外内胚葉層の発達が阻害されていた (図 3)。さらに、胚様体での Erk のリン酸化の局在および胚体外内胚葉のマーカー遺伝子である *afp* の発現を免疫組織化学的手法によって検討したところ、両者とも胚体外内胚葉層での発現が認められた。これらのことから、Ras が Raf/MEK/Erk 経路を介して胚体外内胚葉への分化を誘導していることが推測された。最近、ES 細胞の胚体外内胚葉への分化阻害因子として Nanog というホメオプロテインが報告された。Nanog ノックアウト ES 細胞は、LIF 存在下でも胚体外内胚葉の系譜へと分化する。そこで、胚葉体形成時における *nanog* の発現様式を調べたところ、胚葉体形成 4 日目迄は発現が認められたのに対し、6 日目以降は発現が観察されなかった。さらに、胚様体での *nanog* の強制発現が、*afp* などのいくつかの胚体外内胚葉マーカー遺伝子の発現を抑制したことから、Nanog は胚様体においても胚体外内胚葉への分化を抑制しうることが示唆された。胚様体形成時における Ras の活性化と *nanog* の発現変動の関係を検討するために、*nanog* の発現に対する Ras 変異体の効果を調べたところ、胚様体での活性化型 Ras の発現は *nanog* の発現減少を引き起こし、Ras の優性抑制型変異体の発現並びに MEK 阻害剤による処理は *nanog* の発現を上昇させた。これらの結果から、胚様体形成時に何らかの因子によって活性化された Ras が Raf/MEK/Erk 経路を介して胚体外内胚葉への分化抑制因子である *nanog* の発現を抑制することにより、胚体外内胚葉への分化を誘導していることが考えられる (図 4)。

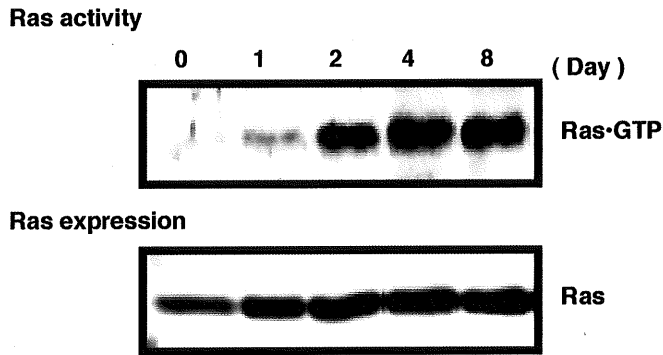


図1 胚様体形成に伴って Ras が活性化される

胚様体形成に伴う Ras の活性化を pull-down assay によって測定した。Ras の発現量は一定だが、GTP結合型 Ras の量は胚様体の発生が進むのに伴い増加する。

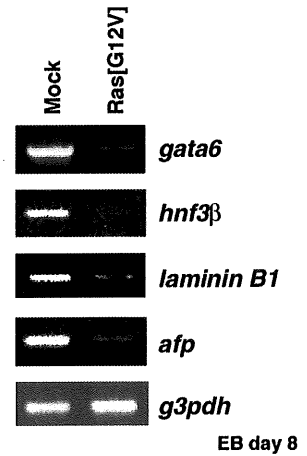


図2 優性抑制型 Ras は胚体外内胚葉の分化マーカー遺伝子の発現を抑制する

Ras の優性抑制型変異体を強制発現させた胚様体における胚体外内胚葉の分化マーカー遺伝子の発現を、RT-PCR 法によって調べた。優性抑制型 Ras の発現により胚様体分化時の Ras の活性抑制化を行うと、胚体外内胚葉の分化マーカー遺伝子の発現が抑制される。

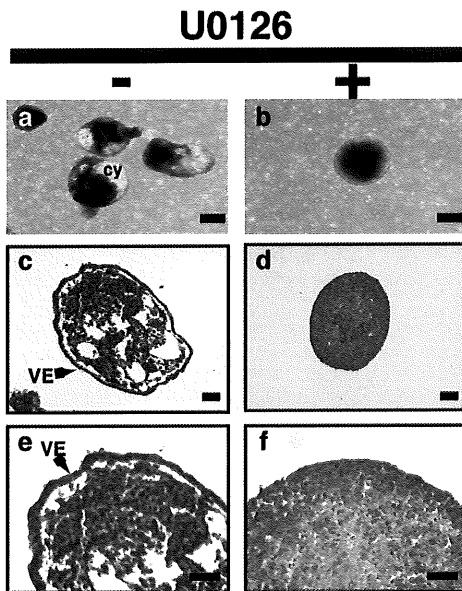


図3 MEK 阻害剤は胚様体の胚体外内胚葉への分化を阻害する

U0126 (10  $\mu$ M) 存在下(b, d, f)、または非存在(a, c, e)で8日間培養した胚様体の位相差顕微鏡写真(a,b)、ヘマトキシリン・エオシン染色像(c-f)。VE, visceral endoderm; cy, cystic cavity. Scale bar = 100  $\mu$ m (a, b), 20  $\mu$ m (c-f)

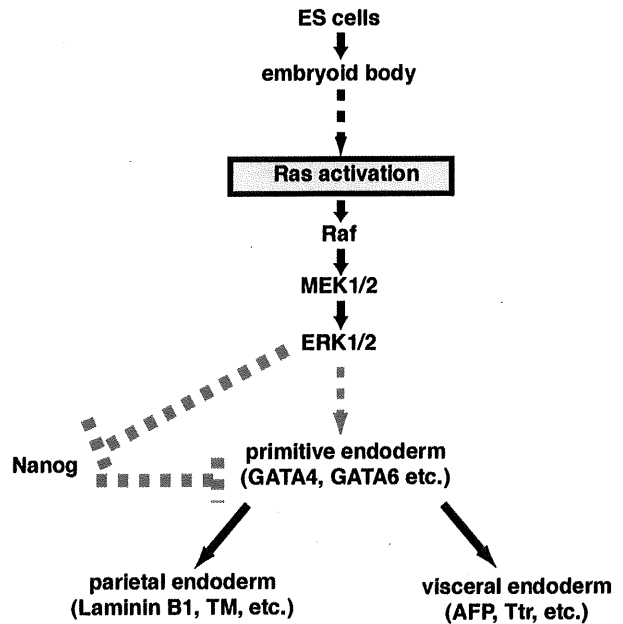


図4 胚様体から胚体外内胚葉へ分化が誘導される時のモデル図