

## 論文審査の結果の要旨

氏名 小出 (吉田) 麗

本論文は、胚性幹細胞 (Embryonic stem cells: ES 細胞)における分化の分子メカニズムを解析し、それを明らかにした。内部細胞塊に由来する ES 細胞は、胚様体形成を介して様々な細胞系譜へと分化できることが知られているが、その分子メカニズムに関しては不明な点が多い。ES 細胞においては、低分子量 GTP 結合タンパク質の一種である Ras は分化に関与しているのではないかと考えられていたが、直接的に Ras の分化における役割を検討した報告はなされていない。このような理由から、本論文では Ras に着目し、ES 細胞の分化における Ras の役割を解析している。

胚様体は球形の細胞塊で、外層が胚体外内胚葉、内層が原始外胚葉に相当する構造をとる。胚様体は、その構造及び遺伝子発現様式がマウス円筒胚と似ていることから、初期発生を研究する上で便利な系であると考えられ、様々な実験において用いられている。論文提出者は、まず、胚様体形成時に Ras が活性化されることを見出した。Ras の活性化は leukemia inhibitory factor (LIF) によって阻害されることを明らかにし、Ras の活性化が分化に伴う現象であることを見出した。そして、Ras の優性抑制型変異体を胚様体で発現させたところ、*gata-4*、*gata-6*、*hepatocyte nuclear factor (hnf) 3 $\beta$* 、 *$\alpha$ -fetoprotein (afp)* などの胚体外内胚葉分化のマーカ―遺伝子の発現と胚体外内胚葉層の形成が抑制され、その一方で、Ras の活性型変異体の発現は胚体外内胚葉分化のマーカ―遺伝子の誘導を促進したことから、Ras が胚体外内胚葉への分化に関与しているのではないかと考えた。そこで論文提出者は、Ras の effector 変異体や阻害剤等を用いて、更に詳細な解析を行った。Raf/MEK/ERK 経路を選択的に活性化する Ras の effector 変異体の胚様体における発現は、胚体外内胚葉の分化マーカ―遺伝子の発現を促進し、MEK 阻害剤である U0126 による処理はこれらの遺伝子の発現を抑制する結果を得た。さらに、胚様体の MEK 阻害剤処理は形態的にも胚体外

内胚葉層の発達を阻害することも明らかにした。このことから、Ras が Raf/MEK/ERK 経路を介して胚体外内胚葉の分化に関与しているという結論を得た。また、論文提出者はホメオプロテイン Nanog に着目し、この分子の胚様体形成時の胚体外内胚葉分化に与える影響を調べた。Nanog 欠損 ES 細胞は、LIF 存在下でも胚体外内胚葉へ分化する事から、ES 細胞における胚体外内胚葉の分化抑制因子と考えられている。そこで、胚様体で *nanog* の強制発現を行ったところ、*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する結果を得た。そして、*nanog* の発現を確認したところ、胚葉体形成 4 日目まで発現がみとめられたが、6 日目以降では発現の減少することを明らかにした。そして、胚様体における *nanog* の発現における Ras/Raf/MEK/Erk 経路の関与の検討を行い、胚様体での活性型 Ras の発現は *nanog* の発現減少を引き起こす一方で、Ras の優性抑制型変異体の発現および MEK 阻害剤による処理は *nanog* の発現量を上昇させることを明らかにした。これらの結果より、胚様体形成時に活性化された Ras が、内胚葉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という結論に達した。

本論文では、ES 細胞から胚様体を形成させ分化が誘導される際、何らかのメカニズムによって Ras の活性化が起こる事を見出し、その分化における意義を明らかにした。Ras からのシグナルは Raf/MEK/Erk 経路を介し、少なくとも *nanog* の発現抑制を経て、胚体外内胚葉への分化に関与している事を明らかにした。本論文から得られた知見は ES 細胞、及びマウス初期胚の初期発生を解明する上での手がかりと成り得るものであり、これらの研究分野に対する本論文の寄与は大きいと思われる。

なお、本論文は、松田孝彦、齊川邦和、中沼安二、横田崇、浅島誠、小出寛との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。