

論文の内容の要旨

論文題目

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) の増殖制御機構における TGF- β スーパーファミリーの役割

指導教官 滝澤始 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 齋藤 朗

胚性幹 (ES) 細胞は胚盤胞の内部細胞塊から得られる細胞であり、多分化能と自己複製能によって特徴付けられる。ES 細胞は再生医療における様々な組織細胞の供給源として期待されているが、その増殖調節機構には未解明な部分が多い。TGF- β スーパーファミリーは TGF- β 、Activin、Nodal、骨形成因子 (BMP: bone morphogenetic protein) を含み、これらのシグナルの伝達分子のノックアウトマウスの表現型の解析から、ES 細胞の増殖において重要な役割を果たしていることが示唆されている。

ES 細胞の培養方法として血清を含む培地の使用が一般的であったが、無血清培養によって TGF- β スーパーファミリー因子の ES 細胞増殖への効果を検討することとした。血清を代替する添加物として Gibco 社の KSR (knockout serum replacement) を用い、さらに ACTH を加えることで ES 細胞の無血清培養が可能となった。血清の存在する条件では、TGF- β 、Activin、Nodal および BMP の増殖への影響はみられなかったが、無血清の培養方法では Activin、Nodal によって濃度依存的に増殖促進効果が認められた。この効果は TGF- β 、Activin、Nodal の阻害剤である SB431542 の共刺激によって抑制された。

マウス ES 細胞である EB5 および MGZ 細胞において TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達因子の発現を RT-PCR 法にて検討したところ、Activin、Nodal および BMP のシグナル伝達に必要

な分子を全て発現していることを確認した。

次に TGF- β スーパーファミリーのシグナルへの応答性をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、Activin、Nodal および BMP のシグナルに対応するレポーターの応答が認められた。

さらに TGF- β スーパーファミリーのシグナルへの応答性を、細胞内シグナル伝達因子である Smad のリン酸化により検討した。Activin、Nodal により Smad2 のリン酸化が検出されたが、TGF- β によるリン酸化は認められなかった。Activin、Nodal による Smad2 のリン酸化は TGF- β 、Activin、Nodal シグナルの阻害剤である SB431542 によって抑制された。また、BMP による Smad1/5/8 のリン酸化が確認された。

リアルタイム PCR 法により、Activin、Nodal 刺激によって標的遺伝子である Lefty-1、Lefty-2 の発現上昇が認められた。増殖促進効果に関与する多様な分子の発現変化を調べたが、その同定には到らなかった。

Activin のノックアウトマウスでは発生初期の異常は認められないが、Nodal のノックアウトマウスでは発生初期の原腸陥入の時期に胎生致死となる。したがって ES 細胞においては Activin よりも Nodal のシグナルの重要性が高いと考えた。ES 細胞における Nodal の役割をさらに解析するため、Nodal 蛋白の精製を試みた。Flag タグを結合させた Nodal 分子を発現するベクターを作成し、293T 細胞に発現させ、その培養上清を回収した。この培養上清を Flag に対するアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

ルシフェラーゼアッセイを用いて内因性の ARE 活性 (Activin、Nodal 活性) を測定したところ、無血清培養では血清存在下に比べ活性が低く保たれ、外因性の Nodal 刺激により活性化されることが確認された。この外因性の Nodal の効果は血清の存在下では顕在化しないことも確認した。Nodal シグナルの阻害剤である SB431542 による ARE 活性の顕著な抑制も認められた。

TGF- β スーパーファミリーのシグナルの抑制因子である Smad7、c-Ski、SnoN を ES 細胞に強制発現させたところ、増殖抑制効果およびコロニーの縮小効果を認めた。さらに Nodal シグナルの下流の転写因子である FAST のドミナントネガティブ変異体を強制発現させても同様の効果を認めた。一方、Nodal シグナルの共受容体である Cripto-1 の強制発現により細胞増殖促進効果が認められた。BMP シグナルのみを抑制する Smad6 の発現による増殖への影響はみられなかった。

ES 細胞を Nodal で刺激した後も、ES 細胞の未分化性のマーカーである Oct-3/4、UTF-1、FoxD3、Nanog の発現に変化がみられないことを RT-PCR 法により確認した。さらに、胚様体の形成能を Nodal で刺激した群と未刺激群とで比較したが、有意な差は認めなかった。Nodal で刺激した ES 細胞をヌードマウスに皮下注射したところ、未刺激群と変わらず奇形腫を形成する能力を保持していることが確認された。以上より Nodal 刺激によっても ES 細胞の未分化性が維持されることが証明された。

Nodal の細胞周期への効果を検討したところ、Nodal 刺激群では G1 期の減少、G2M 期の増加が認められたが、その変化は僅かであり有意差に到らなかった。次にアポトーシスへの影響を検討したところ、DNA ラダーアッセイにおいて DNA 断片化は検出されなかった。

以上の結果から内因性の Nodal シグナルが ES 細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。