

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 齋藤 朗

本研究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胚性幹 (ES) 細胞の増殖・自己複製の制御機構における TGF- β スーパーファミリーの役割について解析を試みたものであり、マウス ES 細胞である MGZ5 細胞と EB5 細胞を用い、下記の結果を得ている。

1. 血清の存在する培養条件では、TGF- β 、Activin、Nodal および BMP の増殖への影響はみられなかったが、無血清培養条件では Activin、Nodal によって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 によって抑制された。
2. 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、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が示された。
3. TGF- β スーパーファミリーのシグナルへの応答性を luciferase アッセイにより解析し、Activin、Nodal および BMP のシグナルに対し各々に対応するレポーターの応答が認められた。さらに細胞内シグナル伝達因子である Smad のリン酸化を検討し、Activin、Nodal による Smad2 のリン酸化と、BMP による Smad1/5/8 のリン酸化が検出された。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 Realtime PCR 法により示された。
4. luciferase 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、外因性の Nodal 刺激により活性化されることが示された。また、SB431542 による ARE 活性の顕著な抑制も認められた。

5. 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、増殖抑制効果が認められた。さらに転写因子 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 Cripto-1 の強制発現によって細胞増殖促進が認められた。BMP シグナルのみを抑制する Smad6 を発現させても増殖への影響は認めなかった。
6. ES 細胞を Nodal で刺激した後も、ES 細胞の未分化マーカーである Oct-3/4、UTF-1、FoxD3、Nanog の発現に変化がみられなかった。Nodal 刺激後においても胚様体の形成能や奇形腫の形成能を保持していることが示された。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示された。
7. Nodal の細胞周期への効果を検討し、有意差に到らなかったものの、Nodal 刺激群では G1 期の減少、G2M 期の増加が認められた。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、本論文はマウス ES 細胞 (MGZ5 および EB5) において、内因性の Activin、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を明らかにした。ES 細胞はあらゆる細胞・組織へと分化する能力を有し、様々な疾患の治療に貢献しうる可能性を秘めた、再生医療の中核をなす存在である。本研究は ES 細胞の増殖制御のメカニズムを解明したものであり、ES 細胞の臨床応用において基盤となる重要な新知見であると考えられ、学位の授与に値すると考えられる。