

審査の結果の要旨

氏名 吳 金展

胚性幹細胞 (ES 細胞) は生体外で自己複製能を保ちながら、すべての細胞に分化誘導することが可能なため、疾患モデル研究や再生医療への応用に注目が集まっている。マウス ES 細胞は 3.5 日胚から樹立された多能性幹細胞であり、適切な分化誘導法によって心筋細胞や神経細胞などの様々な細胞系へと分化誘導することが可能である。目的とする細胞へと効率よく高純度に分化誘導するために、ES 細胞の分化を制御する分子メカニズムの解明は非常に重要であるが、細胞分化決定の分子機構は依然として不明な点が多い。「Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in lineage commitment of mouse ES cells (p38 MAP キナーゼのマウス ES 細胞分化決定における役割)」と題した本論文においては、ES 細胞の分化過程において p38 MAP キナーゼが活性化され、転写因子 MEF2C を介して骨形成因子 BMP-2 の発現を制御し、心筋分化を促進すると同時に神経分化を抑制することを見出している。

1. p38 MAP キナーゼ阻害薬 (SB203580) は心筋分化を抑制して神経分化を促進する

ES 細胞の分化過程において、MAP キナーゼを中心とした各種阻害薬 (ERK 系阻害薬 U0126、p38 阻害薬 SB203580、JNK 阻害薬 SP600125) と PI3 キナーゼ阻害薬 wortmanin を用いてその分化に及ぼす影響を検討した。その結果、ERK 系阻害薬 U0126 と p38 阻害薬 SB203580 を添加すると、拍動する EB の割合は、阻害薬非存在下の 90% 以上から 5% 以下にまで顕著に抑制された。一方、JNK 阻害薬 SP600125 と PI3 キナーゼ阻害薬 wortmanin を添加した場合には、顕著な影響が認められなかった。興味深いことに、p38 阻害薬である SB203580 は、心筋分化を抑制する同時に、胚葉体 (EB) の周りに突起伸長を誘導した。神経マーカーである抗  $\beta$  III tubulin 抗体を用いて免疫染色した結果、この突起伸長が陽性像を示した。一方、SB203580 と同様に心筋分化を抑制する ERK 系阻害薬 U0126 を添加した場合には、陽性像が観察されなかった。これらの結果より、心筋分化の抑制が単に神経分化を促進したのではなく、p38 の阻害薬 SB203580 は特異的に神経分化を促進することが示唆された。

2. p38 は時期特異的に心筋と神経への分化決定を制御する

分化過程における p38 の活性状態を、活性化型であるリン酸化 p38 を特異的に認識する抗体を用いて Western Blotting により検討した。その結果、分化開始直前の day 0 の単層培養時には p38 の活性が認められなかったが、EB の形成とともに、p38 が day2 から day6 の期間で持続的に活性化された。次に、day1 から day6

までの分化過程に、一定の期間のみ SB203580 を添加して、p38 の作用時期を検討した。day3-4 と day1-6 に SB203580 を添加すると、顕著に心筋分化を抑制し、神経分化を促進した。さらに、Day12 に細胞を回収し、RT-PCR で心筋と神経分化のマーカ分子を解析した結果、day3-4 と day1-6 に SB203580 を添加した細胞では、無添加の対照と比較して、神経マーカ分子の発現が強く誘導され、逆に、心筋マーカ分子の発現が抑制された。これらの結果から、SB203580 が day3-4 の時期に特異的に心筋分化を抑制し、神経分化を促進することが示された。

### 3. p38 シグナル経路の下流に骨形成因子 BMP-2 が存在する

p38 の下流標的分子の同定に向けて、ES 細胞分化決定に重要な時期である day3-4 に SB203580 を添加して RT-PCR により心筋や神経の分化決定に関わる因子を探索した。その結果、SB203580 の添加により BMP-2 遺伝子の発現に変化が見られた。SB203580 の存在下で BMP-2 を添加すると、SB203580 依存的な神突起伸長が顕著に抑制された。さらに、BMP-2 阻害因子である Noggin を用いて BMP シグナルを遮断すると、SB203580 と同様に心筋分化を顕著に抑制し、神経分化を促進することが示された。これらの結果より、p38 はその下流の因子である BMP-2 を介して、心筋分化を制御すると同時に、神経分化を抑制することが明らかにされた。

### 4. p38 の基質である MEF2C が BMP-2 の転写発現を制御する

p38 の基質である MEF2C は、心臓の発生に必須な転写因子である。BMP-2 のプロモーター領域には MEF2 転写因子の応答配列がマウスのみならずヒトにも存在し、ES 細胞の分化過程において、MEF2C は BMP-2 と類似する発現パターンを示した。そこで、マウス BMP-2 遺伝子の MEF2 応答配列を含むプロモーター領域を PCR により増幅し、ルシフェラーゼ遺伝子と融合させたベクターを作成してプロモーター解析を行った。BMP-2 プロモーターの転写活性は、MEF2C を過剰発現すると顕著に上昇し、SB203580 を添加すると抑制された。さらに、クロマチン免疫沈降実験により、MEF2C が BMP-2 プロモーターの MEF2 応答配列に結合することが示された。これらの結果から、転写因子 MEF2C が直接に BMP-2 の発現を制御していることが示された。

本論文から、p38 は ES 細胞の分化において分子スイッチとして機能し、心筋と神経分化の運命決定を制御していることが明らかにされた。また、p38 シグナル経路の下流に骨形成因子 BMP-2 が存在すること、さらに、p38 の基質である転写因子 MEF2C が BMP-2 の発現を制御していることが示された。以上を要するに、本論文は、ES 細胞の分化決定における MAP キナーゼの役割とそのシグナル伝達系について、新たに重要な知見を提示しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。