

平成 21年 2月

# 川添真史郎 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三  
副主査 久 留 一 郎  
同 押 村 光 雄

## 主論文

Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway

(マウス胚性癌細胞株由来細胞外因子は、新規シグナル経路を介してマウス胚性幹細胞の多能性を維持する)

(著者：川添真史郎、池田信人、三木研吾、渋谷昌幸、森川久美、中野星児、押村光雄、久留一郎、白吉安昭)

平成20年 Development Growth & Differentiation 掲載予定

# 学位論文要旨

**Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway**

**(マウス胚性癌細胞株由来細胞外因子は、新規シグナル経路を介してマウス胚性幹細胞の多能性を維持する)**

胚性幹(ES)細胞の多能性を制御するメカニズムについては、依然として解明されていない点があった。著者らは胚性癌(EC)細胞の培養上清を用い、ES細胞の多能性、未分化性に与える影響、さらにはシグナル経路を解析した。この結果、EC細胞の培養上清にはES細胞の未分化性を維持する活性が含まれること、さらにはこれまでには報告のない新規のシグナル経路を介していることを突き止めた。

## 方法

未分化マーカーであるRex1遺伝子座へ緑色蛍光タンパク遺伝子をノックインしたES細胞株REB-MG、REN-TT2を樹立した。EC細胞株であるF9、P19、PCC3細胞の培養上清からそれぞれ調整した培地(CM)が、REB-ES、REN-TT2 ES細胞の未分化性に与える影響をEGFPの蛍光を指標にフローサイトメーターにより定量化した。これら未分化性維持活性の定量化実験は低密度、高密度、胚様体形成という異なる培養条件下で検討した。また、EC細胞上清に含まれる因子が、ES細胞内のどのシグナル経路を介しているかを明らかにするため、これまでにES細胞の未分化性維持に機能するとの報告のある、Leukemia Inhibitory Factor (LIF)-Stat3、Canonical-Wntシグナル経路およびAktの活性化状態をウエスタンブロッティング法、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。さらに、LIF-Stat3シグナル経路に関しては、JAK阻害薬を用いた阻害実験によりEC-CMはStat3の活性化状態に非依存的に未分化性を維持できるのか検討した。EC細胞の調整培地で維持したES細胞の多能性の有無を、SDIA法による神経細胞誘導(外胚葉)、および胚様体形成による分化誘導(主に中胚葉、内胚葉)した後、免疫染色法、RT-PCRにより三胚葉それぞれのマーカーの発現解析により検討した。

## 結果

低密度、高密度、胚様体形成という異なる培養条件下において、F9、P19、PCC3それぞれのEC-CMにおいてES細胞の未分化性を維持する活性がみられた。しかし、F9-CMには、P19-

PCC3-CMによる細胞の増殖を促進するような活性はみられず、むしろ抑制的な活性をもっていた。LIF-Stat3シグナル経路の活性化はF9-、P19-CMにおいては検出されず、PCC3-CMにおいてのみ検出された。Canonical-Wntシグナル経路およびAktの活性化はF9-、P19-、PCC3-CMいずれの場合も活性化されていなかった。さらに、JAK阻害薬を用いた阻害実験で、Stat3の活性化を完全に消失させたところ、PCC3-CMにおいて未分化性維持活性は半減するものの、全てのEC-CMにおいて未分化性維持活性は依然として残っていた。また、EC-CMによって維持されたES細胞は試験管内で、三胚葉への分化能を示し多能性を維持していた。

## 考 察

多能性を持つEC細胞 PSA1と分化能を持たないEC細胞 F9との混合胚様体を形成させると、PSA1細胞の分化が抑制されること示されている。またマウスES細胞はEC-CMによっても樹立可能である。これらの報告は、EC細胞は分化抑制、あるいは未分化性維持に機能する因子を分泌している可能性を示唆していた。本研究では、EC-CMには未分化性維持に機能し、かつこれまでに報告のあるシグナル経路のいずれも介さない新規の経路を介する因子が含まれる可能性を示唆した。またF9-CMと、P19-およびPCC3-CMに含まれるES細胞未分化性維持因子は、細胞増殖に与える影響が異なることから、別々の因子により担われている可能性が考えられる。PCC3-CMにおいては、LIF以外のStat3を活性化する因子と活性化しない因子によってES細胞の未分化性が維持されていると考えられる。これらEC細胞特異的な未分化性維持因子は、ES細胞のみでなく、EC細胞自身の未分化性維持にも機能している可能性がある。

## 結 論

EC-CMに含まれる未同定因子は、これまでに報告のあるどのシグナル経路も介さずES細胞の未分化性を維持することから新規シグナル経路を介する因子であると考えられる。これらEC細胞由来新規未分化性維持因子を同定することは、多能性幹細胞の制御メカニズムにとどまらず生体内における多能性維持機構の解明にもつながる可能性がある。