

論文内容の要旨

申請者氏名 徳澤 佳美

胚性幹細胞(ES 細胞)は胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性細胞である。マウス ES 細胞における多能性維持機構として LIF/STAT3 経路が知られている。しかし、LIF 欠損マウスは正常に発生し、STAT3 欠損マウスも胎生 7.5 日まで発生するため、内部細胞塊の多能性は LIF/STAT3 以外の因子によって制御されることが示唆される。我々は多能性細胞の未分化状態維持に関わる新規遺伝子を同定するため、ES 細胞と初期胚で特異的に発現する遺伝子 ECATs を digital differential display により同定した。私はその内の Fbx15 (ECAT3), Nanog (ECAT4) and ECAT8 を解析した。

Fbx15 は F-box ドメインを含有した。私は Fbx15 欠損 ES 細胞と Fbx15 欠損マウスを作製した。Fbx15 欠損マウスは正常であり、Fbx15 欠損 ES 細胞も形態、増殖、*in vitro* での分化誘導は正常であった。しかし Fbx15 欠損 ES 細胞由来の奇形腫において栄養外胚葉系への分化が確認された。ES 細胞での Fbx15 の発現は Oct3/4 によって調節されることがすでに示されている。さらに Oct3/4 は ES 細胞の栄養外胚葉への分化を抑制する。このことから Fbx15 は Oct3/4 による栄養外胚葉への分化の抑制に寄与していることが示唆された。

Nanog (ECAT4)はホメオボックス遺伝子でジーンターゲットングの結果から Nanog が ES 細胞と内部細胞塊の多能性に必須であることが示されている。Nanog が多能性細胞の未分化維持に十分か調べるため、私は ES 細胞で Nanog の過剰発現を行った。その結果、Nanog 過剰発現細胞は LIF のアンタゴニストである hLIF05 や JAK キナーゼインヒビターである SOCS3 による STAT3 の抑制による分化誘導を受けなかった。以上の結果は Nanog が STAT3 非依存的に未分化を維持するということを示唆する。

STAT3 と Nanog の下流因子を DNA マイクロアレイを用いて探索した結果、Kruppel-like factor 4 (Klf4)が STAT3 の抑制によって発現が著しく減少していた。Klf4 は未分化 ES 細胞において高発現し、分化誘導すると発現が消失した。また、Klf4 の過剰発現は LIF 非依存的にマウス ES 細胞を未分化状態に保持した。以上の結果は Klf4 がマウス ES 細胞において STAT3 の重要な標的遺伝子であることを示唆している。

ECAT8 は tudor ドメインを含有した。生体での ECAT8 の機能を解析するために、私は ECAT8 欠損マウスと ES 細胞を作製した。ECAT8 欠損 ES は正常であった。ECAT8 欠損マウスは雄が不妊を示したので私は ECAT8 欠損マウスの精巣を解析した。その結果、ECAT8 欠損マウスの精巣は野生型と比較して非常に小さく、精子形成はパキテン期初期で停止し、相同染色体の対合時に見られるシナプトネマ構造の形成が抑制されていることが明らかになった。これらの結果は ECAT8 が精母細胞の減数分裂において重要な役割を果たしていることを示唆している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 徳澤 佳美

胚性幹細胞(ES 細胞)は胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性細胞である。マウス ES 細胞における多能性維持機構は LIF/STAT3 経路が知られている。しかし、LIF 欠損マウスは正常に発生し、STAT3 欠損マウスも胎生 7.5 日まで発生するため、内部細胞塊の多能性は LIF/STAT3 以外の因子によって制御されることが示唆される。申請者らは多能性細胞の未分化維持に関わる新規遺伝子を同定するため、ES 細胞と初期胚で特異的に発現する遺伝子 ECATs を digital differential display により同定した。申請者はその内の Fbx15 (ECAT3), Nanog (ECAT4) and ECAT8 を解析し、以下のことを明らかにした。

申請者は Fbx15 欠損 ES 細胞と Fbx15 欠損マウスを作製した。Fbx15 欠損マウスは正常であり、Fbx15 欠損 ES 細胞も形態、増殖、*in vitro* での分化誘導は正常であったが Fbx15 欠損 ES 細胞由来の奇形腫において栄養外胚葉系への分化が確認された。ES 細胞での Fbx15 の発現は Oct3/4 によって調節されることがすでに示されている。さらに Oct3/4 は ES 細胞の栄養外胚葉への分化を抑制する。このことから申請者は Fbx15 が Oct3/4 による栄養外胚葉への分化の抑制に寄与していることを示した。

Nanog (ECAT4)はホメオボックス遺伝子でジーンターゲットングの結果から Nanog が ES 細胞と内部細胞塊の多能性に必須であることが示されている。Nanog が多能性細胞の未分化維持に十分か調べるため、申請者は ES 細胞で Nanog の過剰発現を行った。その結果、申請者は Nanog が STAT3 非依存的に未分化を維持するということを明らかにした。

さらに申請者は STAT3 と Nanog の下流因子を探索し、Kruppel-like factor 4 (Klf4)が STAT3 の抑制によって発現が著しく減少すること、また、Klf4 が未分化 ES 細胞において高発現し、分化誘導すると発現が消失することを示した。Klf4 の過剰発現は LIF 非依存的にマウス ES 細胞を未分化状態に保持した。以上の結果から、申請者は Klf4 がマウス ES 細胞において STAT3 の重要な標的遺伝子であることを示した。

さらに申請者は ECAT8 欠損マウスと ES 細胞を作製した。ECAT8 欠損 ES は正常であったが ECAT8 欠損マウスは雄が不妊を示したので申請者は ECAT8 欠損マウスの精巣を解析した。その結果、ECAT8 欠損マウスの精巣は野生型と比較して非常に小さく、精子形成はパキテン期初期で停止し、相同染色体の対合時に見られるシナプトネマ構造の形成が抑制されていることを示した。これらの結果から ECAT8 が精母細胞の減数分裂において重要な役割を果たしていることを申請者は明らかにした。

以上のように、本論文は ES 細胞の未分化維持機構および精子形成機構の一端を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。