

## 論文内容の要旨

申請者氏名 高橋 和利

胚性幹 (ES) 細胞は分化多能性を維持した状態において、非常に速いスピードで増殖を続ける。また、生体内に移植した際には、三胚葉系からなる奇形腫を形成する。このように細胞増殖という点において ES 細胞と腫瘍細胞は類似点が多く、この事実が臨床応用への大きな壁のひとつとなっている。由来の異なる多能性細胞である胚性癌腫 (EC) 細胞や胚性生殖 (EG) 細胞においても同様に類腫瘍特性が観察されることから、多能性幹細胞独自の増殖メカニズムが存在する可能性が考えられるが、その詳細はほとんど明らかになっていなかった。そこで、本研究では ES 細胞の高い増殖能に関与する分子の同定およびその機構解明を目的とした。

ES 細胞の有する高い増殖能は分化誘導後に著しく低下することに着目し、我々は未分化状態において特異的に発現する新規 Ras 遺伝子である ERas を同定した。ERas は Ras タンパク質の GTP 加水分解活性に重要であるアミノ酸が保存されておらず、免疫沈降産物を薄層クロマトグラフィーで展開した結果、95%以上が GTP 結合型として存在していることを明らかにした。ERas を強制発現させたところ、NIH3T3 細胞の形質転換およびマウス初代胎仔繊維芽細胞の増殖促進を引き起こすことがわかった。さらに免疫共沈降実験により、ERas は HRas とは異なり、Raf1、BRaf および RalGDS といった Ras タンパク質のエフェクター分子とは相互作用せず、PI3 kinase p110 と相互作用することを示した。

形質転換能を有する癌遺伝子 ERas の ES 細胞における役割を解析するために、ERas 欠損 ES 細胞を樹立した。ERas 欠損細胞は外観上正常であり、ブラストシストインジェクションにより生殖系列に寄与したことから、分化多能性を保持していると考えられた。

一方で ERas 欠損 ES 細胞は野生型と比較して、*in vitro* における増殖能の低下が確認された。さらに、免疫不全マウスへの皮下注射により、生体内における腫瘍形成能の著しい低下が確認された。ERas 欠損細胞における類腫瘍特性の低下は、ERas または活性型 PI3 kinase の cDNA を導入することにより回復した。

さらに ES 細胞における PI3 kinase 経路の役割を厳密に解析するために、優性抑制型の発現および特異的阻害剤を用いた検討を行った結果、PI3 kinase 活性の抑制は ES 細胞の分化促進を引き起こすことが示唆された。PI3 kinase の抑制による分化誘導の原因を明らかにするために、Nanog 強制発現細胞に対して PI3 kinase 阻害剤処理を行った結果、未分化状態を維持していたが内在性 Nanog の発現が低下していることがわかった。レポーター実験およびクロマチン免疫沈降により、PI3 kinase を抑制した状態では、Nanog 遺伝子の遠位エンハンサー活性が低下および SOX2 タンパク質の結合量減少が見られた。

以上の結果より、未分化 ES 細胞において特異的に発現する ERas は PI3 kinase 経路を選択的且つ恒常的に活性化することにより ES 細胞の増殖と腫瘍形成能を促進していることを明らかにした。さらに、ES 細胞において PI3 kinase は増殖のみならず、未分化状態の維持にも関与していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 高橋 和利

分化多能性を有する胚性幹 (ES) 細胞は非常に高い増殖能を備えている。そのため、再生医療資源を無限に確保できるという利点が考えられる一方で、生体内に移植した際に奇形腫を形成するという事実が臨床応用への大きな壁のひとつとなっている。癌細胞とは対照的に染色体異常をまったく持たない ES 細胞が生体内で腫瘍を形成する機構についてその詳細はほとんど明らかになっていなかった。

申請者は ES 細胞の有する高い増殖能は分化誘導後に著しく低下することに着目し、未分化 ES 細胞特異的に発現する新規 Ras 遺伝子である ERas を同定した。ERas は Ras タンパク質の GTP 加水分解活性に重要であるアミノ酸が保存されておらず、二次元構造から推測されたとおり、大部分が細胞内において活性型として存在していることを明らかにした。さらに申請者は恒常的に活性を有する ERas を強制発現させることによって NIH3T3 細胞の形質転換およびマウス初代胎仔繊維芽細胞の増殖促進を引き起こすことを示した。また ERas と HRas の機能の差異は相互作用する分子の違いによるとの観点から、ERas は Raf1, BRaf および RalGDS とは相互作用せず、PI3 kinase p110 と相互作用することを免疫共沈降実験により示した。

次に ERas が本来発現している ES 細胞における機能を明らかにするために、申請者はジーンターゲットングにより ERas 欠損 ES 細胞を樹立した。ERas 欠損細胞の外観は正常であり、ブラストシストインジェクションにより生殖系列に寄与したという事実は、必ずしも ERas が分化多能性維持に必須の分子ではないことを示唆している。

一方で申請者は ERas 欠損細胞の *in vitro* における増殖能および生体内における腫瘍形成能の低下を観察し、ES 細胞の有するもうひとつの大きな特徴である類腫瘍特性において ERas が重要な役割を果たしていることを明らかにした。このような類腫瘍特性の低下は、ERas または活性型 PI3 kinase の cDNA を導入により回復するという現象は、ERas/PI3 kinase 経路が ES 細胞の増殖を促進しているという結果を強く支持するものである。

さらに ES 細胞における PI3 kinase 経路の役割を厳密に解析するために、申請者は優性抑制型の発現および特異的阻害剤を用いた検討を行った。その結果、PI3 kinase 活性の抑制は ES 細胞の分化促進を引き起こすことが示唆された。さらに、Nanog 強制発現細胞に対して PI3 kinase 阻害剤処理を行い、内在性 Nanog の発現が低下していることを確認した。PI3 kinase の抑制による Nanog の発現量低下は Nanog 遺伝子の遠位エンハンサーに対する SOX2 タンパク質の結合量減少が関与していることを示唆している。

これらの結果は ES 細胞の分化多能性と類腫瘍特性の間に何らかの相関関係が存在することを示唆するものであり、今後の研究が期待される。

以上のように、本論文は ES 細胞の類腫瘍特性を支える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。