

氏 名	ふじ 藤 くら 倉 じゅん 純 じ 二
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2636 号
学位授与の日付	平 成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors (胚性幹細胞分化における転写因子GATAの作用に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 中畑龍俊 教授 中辻憲夫 教授 中尾一和

### 論 文 内 容 の 要 旨

マウス初期発生において、ジンクフィンガー型転写因子Gata-6やGata-4は原始内胚葉やそれに由来する臓側内胚葉、壁側内胚葉などの胚外内胚葉組織に発現する。Gata-6欠損マウスは胎生7.5日までに臓側内胚葉の分化障害を来して死亡する。Gata-4欠損マウスも臓側内胚葉や前腸内胚葉への分化障害があり、内胚葉から中胚葉へのシグナル欠如により胎生9日までに心形成障害により死亡する。これらより、胚外内胚葉分化の開始、促進においてGATA転写因子が重要な役割を果たしていることが予想された。また、胚性幹細胞(ES細胞)の未分化維持にはOct-3/4が一定量で存在していることが必要であり、白血病阻止因子(leukemia inhibitory factor; LIF)を培地から除いたり、Oct-3/4発現量を外来遺伝子導入により増加させたりすると未分化状態が解除されると共にGata-4 mRNA量が増加することが判明している。本研究ではGATAの発現が胚外内胚葉系への分化に必要な十分条件であるかをES細胞を用いて検討した。

胚外内胚葉にはGATAや肝細胞核因子(hepatocyte nuclear factor; HNF)など多くの転写因子が発現している。これらのうち、Hnf3 $\alpha$ 、Hnf3 $\beta$ 、Hnf4 $\alpha$ 、Pdx1、Pax6、Pax4、Ngn3、などをES細胞へ発現させても分化は認められなかった。Gata-6やGata-4を発現させると、紡錘型をした遊走する胚外葉様細胞へと変化し、Gata-6、4は胚外内胚葉分化を促進する転写因子におけるヒエラルキーの中で最上位に位置するものと確認された。

遺伝子および蛋白発現を検討したところ、外来性のGata-6やGata-4発現に伴い内因性のGata-6およびGata-4発現が誘導されており、Gata-6、4自身、及びGata-6とGata-4との間に相互活性化機構があることが明らかとなった。

未分化ES細胞では微量のGata-6、4発現があるが、Oct-3/4の強制発現やLIFシグナルを阻害するStat3の優性阻害型変異体を発現させ未分化状態を解除させた時には発現が増加し、GATAの強制発現率ではより強い発現レベルが確認された。Hnf3 $\beta$ やlaminin B1等の胚外内胚葉関連遺伝子はGATA発現量に比例した発現が認められ、量的効果の存在を確認した。

また、原始外胚葉、中胚葉、神経外胚葉マーカーはGata-6、4発現系では検出されずGata-6、4は原始内胚葉系へ分化を限定すると考えられた。

更に、単に未分化状態を解除した時のOct-3/4発現量の低下に比べGata-6、4発現系では完全な抑制がみられ、Gata-6、4からOct-3/4を積極的に抑制する系の存在が考えられた。

Gata-6を誘導発現できるES細胞を樹立して経時的に観察したところ、Gata-6発現後24時間でHnf3 $\beta$ が誘導され、72時間で明らかな形態変化を来すことが観察された。LIFを除去して未分化状態を解除させた後に、Gata-6を発現させても胚外内胚葉へ分化したことからGata-6は分化開始だけでなく最終分化を可能にする転写因子であると考えられた。

この細胞を用いてGata-6を発現させながら、浮遊培養下で胚様体を形成させると、 $\alpha$ -fetoprotein等の臓側内胚葉遺伝子の発現も促進されることが分かった。

以上より、Gata-6は哺乳類初期発生において未分化状態を解除し、壁側および臓側の両胚外内胚葉を形成するのに重要な役割をはたすことが証明された。

## 論文審査の結果の要旨

マウス初期発生において、ジンクフィンガー型転写因子 Gata-6 や Gata-4 は原始内胚葉やそれに由来する臓側内胚葉、壁側内胚葉などの胚外内胚葉組織に発現し、これらを欠損するマウスはその分化障害のため胎児期に死亡する。これらのことから、胚外内胚葉分化において GATA が重要な役割を果たしていることが予想されていた。本研究では GATA が胚外内胚葉系分化に必要な十分条件であるかを ES 細胞を用いて検討したものである。

Gata-6 や Gata-4 を未分化 ES 細胞に発現させると、形態観察・遺伝子発現の検討等により壁側内胚葉細胞へと分化することが確認された。また、Gata-6, 4 自身、及び Gata-6 と Gata-4 との間に相互活性化機構があることや、Gata-6, -4 が未分化維持に必要な Oct-3/4 を積極的に抑制し、未分化状態を解除することなどが明らかにされた。

また、分化後期から Gata-6 を発現させても胚外内胚葉への分化が促進されることから Gata-6 は分子開始因子というだけでなく最終分化にまで至らしめる因子であると考えられた。

また、培養条件によっては臓側内胚葉系遺伝子の発現も促進されることが示された。

申請者は、これらの実験結果により、Gata-6 は哺乳類初期発生において未分化状態を解除し、壁側および臓側の両胚外内胚葉を形成するのに決定的な役割をはたことを証明している。

以上の研究は、哺乳類初期発生機構の解明に貢献し、発生・再生医療に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年5月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。