

京都大学	博士 ( 医 学 )	氏 名	鄭 羽 伸
論文題目	<b>Simultaneous binding of bFGF to both FGFR and integrin maintains properties of primed human induced pluripotent stem cells</b> (bFGF が FGFR とインテグリンに同時に結合することがプライム型ヒト人工多能性幹細胞の未分化状態を維持する)		
(論文内容の要旨) ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell、iPS 細胞) や胚性幹細胞 (embryonic stem cell、ES 細胞) の維持培養には、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor、bFGF) が FGF レセプター (FGFR) と結合して生じるシグナルと、細胞-基質間接着分子のインテグリンが細胞外マトリックスと結合して生じるシグナルの両方が必要であることが知られている。近年、ガン細胞株において bFGF とインテグリンの結合が報告され、この結合を阻害したところ、ガン細胞の血管新生に影響を及ぼすことが明らかとなった。これは bFGF とインテグリンの相互作用によるクロストークの重要性を示す結果であり、さらには bFGF が FGFR とインテグリンの両方に結合して機能している可能性を示唆している。ヒト多能性幹細胞の未分化性維持に重要な働きをするインテグリン (インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ ) と癌細胞の血管新生に重要なインテグリン (インテグリン $\alpha v \beta 3$ ) は異なっており、ヒト多能性幹細胞で bFGF とインテグリンが結合しているかどうかは不明である。 本研究では、ヒト iPS 細胞において bFGF が FGFR とインテグリンの両方に結合するかどうかを検証し、これらの相互作用が生み出すシグナルのクロストークが未分化性維持に与える影響を明らかにすることを目的とした。 組換え蛋白質の bFGF を用いて FGFR とインテグリンとの結合を検討した結果、ヒト iPS 細胞において bFGF が FGFR およびインテグリンの両方と相互作用することを見出した。また、in vitro において bFGF が FGFR とインテグリンに直接結合することがわかった。これらの結果は、ヒト多能性幹細胞において bFGF が FGFR とインテグリンの両方に結合し、三者複合体を形成して機能している可能性を示唆した。 次に、FGFR またはインテグリン、または両方に結合しない bFGF 変異体を作製し、未分化性維持に対する影響を検討した。その結果、インテグリンに結合できない bFGF 変異体は未分化性を維持することができなかった。さらに詳細な検討により、細胞播種後から 24 時間の間に bFGF が FGFR と結合することが未分化性維持に必須であるが、その時に bFGF がインテグリンに結合することは必須でないことが分かった。未分化性維持には細胞内の ERK の活性化が密接に関わっており、さらに細胞基質間接着部位に形成される focal adhesion の FAK の活性化も影響していることが分かった。 最後に、bFGF が FGFR とインテグリンの両方に結合することが未分化性維持に重要かどうかを検討するために、FGFR に結合できない bFGF 変異体とインテグリンに結合できない bFGF 変異体を混合した bFGF mixture の未分化維持に与える影響を検討した。その結果、bFGF mixture は未分化性を維持することができなかった。この結果は bFGF が FGFR とインテグリンの両方に結合することが必要であることを示唆している。 本研究により、ヒト多能性幹細胞の未分化性維持には bFGF が FGFR とインテグリンの両方に結合することが重要であることが明らかとなった。bFGF と FGFR の結合は細胞播種直後に必須であり、bFGF とインテグリンの結合はその後培養期間が終了するまで必要であることから、bFGF-FGFR と bFGF-インテグリンによるシグナルのクロストークが重要であることが示唆された。今後はシグナルのクロストークと三者複合体形成の解析が期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

bFGF とインテグリンはプライム型ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell、iPS 細胞) の維持培養に重要な因子である。がん細胞において bFGF とインテグリンの結合の重要性が判明していたが、ヒト iPS 細胞において bFGF とインテグリンの結合やその役割は不明であった。

本研究では、組換え bFGF タンパク質を用いたプルダウンアッセイによって、ヒト iPS 細胞において bFGF が FGFR およびインテグリンの両方と結合することを確認した。次に、FGFR またはインテグリン、または両方に結合しない bFGF 変異体を用いてヒト iPS 細胞の維持培養を行ったところ、bFGF が FGFR とインテグリンの両方と結合することが未分化性の維持に重要であることが判明した。特に、維持培養初期には bFGF と FGFR の結合による ERK 活性化が重要であり、その後は FGFR に加えてインテグリンとの結合がコロニー形成時にみられる接着斑中の FAK の活性化を促すことで、未分化性維持に寄与することを見出した。さらに、bFGF が FGFR とインテグリンの両方に同時に結合することが重要であることを明らかとし、bFGF-FGFR-インテグリン複合体の形成が示唆された。

以上の研究はプライム型ヒト iPS 細胞の未分化性維持機構の解明に貢献し高品質・均一な次世代ヒト iPS 細胞培養法の発展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、令和 6 年 3 月 4 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。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降