

審査の結果の要旨

氏名 葛岡 桜

本研究は、小児脳腫瘍に多い中枢神経系胚細胞腫、なかでもジャーミノーマが、*KIT* 遺伝子に変異の入った胎生期の生殖細胞を起源とする、という仮説を検証することを目的とした。そこで、*KIT* 変異をもつヒト iPS 細胞株を樹立し、胎児期生殖細胞の発生過程を再現した分化誘導系を用い、始原生殖細胞様細胞 (PGCLC) へと分化させ、*KIT* 変異による表現型の変化を解析し、下記の結果を得ている。

1. ヒト iPS 細胞に、ジャーミノーマに最も高頻度にみられる *KIT*^{D816V} 変異を導入し、遺伝子型解析で変異導入を確認した。また、*KIT* 変異導入後も染色体型が正常であること、マーカー遺伝子の発現やテラトーマ形成能から多能性が保たれていることを示した。さらに親株と同程度に PGCLCs へ誘導が可能なことを確認した。
2. 変異導入した iPS 細胞において、*KIT*^{D816V} による *KIT* シグナル活性の変化を検証するため、*KIT* および下流の *AKT*、*ERK* のリン酸化をウェスタンブロッティングで評価した。その結果、変異導入前の親株では *SCF* 依存的に *KIT* がリン酸化されるのに対し、*KIT* 変異株では *SCF* 非依存的に *KIT* リン酸化を認めた。さらに、*KIT* 下流の活性について、ヒト iPS 細胞の維持培地で高濃度に含まれる *FGF* を阻害して評価したところ、*ERK* は親株・*KIT* 変異株いずれもリン酸化シグナルが消失した一方で、*AKT* は親株で最もリン酸化が減少し、*KIT* ヘテロ変異株、ホモ変異株の順にリン酸化を認めた。以上より、iPS 細胞で発現する *KIT*^{D816V} は *SCF* 非依存的な *KIT* のリン酸化を獲得し、下流のリン酸化に寄与する活性型変異であることが確認できた。また iPS 細胞において、*KIT*^{D816V} は *AKT* のリン酸化に寄与するが、*ERK* のリン酸化への寄与は低いことを明らかにした。
3. *KIT*^{D816V} iPS 細胞を用い、PGCLCs への分化誘導による表現型の変化を解析した。*SCF* 無添加 (*SCF*⁻) と *SCF* 添加 (*SCF*⁺) の条件で PGCLC 誘導を行い、細胞表面の *KIT* 発現量を FACS で解析したところ、*SCF*⁻ の PGCLCs では、親株で *KIT* 発現が最も高く、ヘテロ変異株、ホモ変異株の順に減少し、*SCF*⁺ では全ての株でホモ変異株と同等に低値であった。続いて、*SCF*⁻ と *SCF*⁺ によって誘導される PGCLC 数を比較したところ、*SCF*⁻ では親株よりも *KIT* 変異株が多かったが、*SCF*⁺ では逆に親株よりも

KIT 変異株で PGCLC 数が減少した。これらより、*KIT*^{D816V} PGCLC では細胞表面での *KIT* 発現量が低下し、SCF 非依存的に生存することを証明した。

以上のように、本論文では *KIT*^{D816V} iPS 細胞を樹立し、これを発生初期の PGCLCs へ誘導することに成功し、導入した変異 *KIT* が活性型であることを証明した。本研究はジャーミノーマモデルの基盤を完成させ、これまで仮説のままであった胚細胞腫の発生過程の再現に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。