

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 足達 冬規

---

マウス胚性幹細胞(mESC)は、通常の分化誘導系では胎盤を構成する細胞である栄養膜細胞に分化しない。しかし近年、人為的な操作により mESC の栄養膜細胞への分化転換を誘導できることが報告された。細胞の分化にはエピジェネティックな制御が重要である。本論文では、ES 細胞の分化転換へのエピジェネティック因子の関与を解明することを目的とし、BMP4 処理によって誘起される mESC から栄養膜細胞への分化転換系を用いた研究が行われた。

第一章では、mESC から栄養膜細胞への分化転換過程に、栄養膜細胞への分化能を有する幹細胞の状態を経るとする仮説の検証が行われた。BMP4 による分化転換の際には細胞外基質のラミニンが用いられる。ラミニンは mESC の原始外胚葉様細胞への分化を誘導し、また、原始外胚葉から樹立される原始外胚葉幹細胞(EpiSC)は、BMP4 処理によって栄養膜細胞への分化が誘導される。これらのことから、BMP4 で誘導される分化転換において、mESC が EpiSC 様の状態に変化するのではないかと考えられた。EpiSC は Activin A と FGF4(AF)により未分化状態が保たれる細胞である。そこで、分化転換の誘導に必要なであると判明した 24 時間 BMP4 処理後に AF を添加すると、AF 依存的に増殖する細胞株が得られた。AFC と命名したこの細胞は EpiSC 様の遺伝子発現を示し、BMP4 処理によって栄養膜細胞の 3 つのサブタイプのうち合胞栄養膜細胞(SynT)への分化が確認された。これらのことから、BMP4 による分化転換過程には EpiSC 様の状態を経て SynT に分化する経路が存在することが明らかになった。しかし、残るサブタイプである栄養膜巨細胞(TGC)と海綿状栄養膜細胞(SpT)への分化転換経路は確認できておらず、分化転換へのエピジェネティック因子の解析に有用と思われる、全ての栄養膜サブタイプが出現するような分化転換系の必要性が示された。

そこで、第二章では、新たな分化転換系の構築が試みられた。Activin シグナルの阻害はヒト ESC の BMP4 処理による栄養膜細胞への分化を促進する。mESC の分化転換でも、アクチビンシグナル阻害剤(SB431542)を添加することで SynT と SpT の分化マーカー遺伝子の発現レベルが上昇した。さらに、TGC の分化マーカー遺伝子は BMP4 処理後に SB431542 処理を行った場合にのみ発現が誘導されていた。異なる系統の mESC 株でも全サブタイプへの分化転換が確認できたことから、これを新たな分化転換の条件とし、以降の解析に用いられた。

新たな分化転換誘導系におけるエピジェネティック因子遺伝子の発現変化を解析すると、ヒストン H3 のメチル化酵素である Suv39h の発現が BMP4 処理に依存して一過的に上昇することが分かり、分化転換に Suv39h が関与する可能性が示唆された。そこで Suv39h 欠損 mESC を用いて分化転換を誘導すると、全ての栄養膜細胞サブタイプへの分化転換が抑制されていた。Suv39h 欠損 mESC では分化転換誘導後も mESC の未分化維持遺伝子である Oct4 の発現が残っていたが、RNAi により Oct4 の発現抑制を行っても、分化転換誘導により体細胞分化マーカー遺伝子の発現が上昇するものの、栄養膜細胞へは分化転換しなかった。このことから、Suv39h の欠損による分化転換の抑制は Oct4 の発現の残存によるものではないことが示唆された。また、Suv39h 欠損 mESC

からも AFC を樹立することができたが、Suv39h 欠損 AFC を分化誘導しても SynT へ分化しなかった。このことから、Suv39h は EpiSC 様の状態から SynT への分化に必要な因子であることが示された。

本論文で確立された mESC の新たな分化転換系は、幹細胞の分化方向を厳密に制御する機構の解明に有用である。この系を用いて分化転換に必要なことが明らかにされた Suv39h、遺伝子の発現抑制に関わる因子とされている。よって、mESC では Oct4 以外にも栄養膜細胞への分化転換を抑制する因子が存在しており、Suv39h がその因子の発現を抑制することで栄養膜細胞への分化抑制を解除すると考えることが出来る。これらの発見はほ乳類胚発生における細胞分化のエピジェネティック制御機構に新たな知見をもたらすものである。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。