

Title	Regulation of Nodal-Lefty Expression by TGF-Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Derived from Mouse Oral Mucosal Tissue
Author(s)	岡田, 晶子
Journal	歯科学報, 113(3): 334-335
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3107">http://hdl.handle.net/10130/3107</a>
Right	

氏名(本籍)	おかだしょうこ 岡田晶子 (愛知県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1936号(甲第1182号)
学位授与の日付	平成24年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Regulation of Nodal-Lefty Expression by TGF- Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Derived from Mouse Oral Mucosal Tissue
掲載雑誌名	Journal of Hard Tissue Biology 第21巻 4号 391-398頁 2012年12月
論文審査委員	(主査) 東 俊文教授 (副査) 柳澤 孝彰教授 阿部 伸一教授 井上 孝教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

Nodal-Lefty 経路は ES 細胞の未分化性、胚の体軸対称性などの重要な調節因子で、ガンの悪性度にも関わっている。特に Nodal は高転移性悪性黒色腫や高転移性乳がんでは発現が高いことが知られている。Lefty は腫瘍での発現が確認されていなかったが、我々は膀胱癌細胞において Lefty 遺伝子の発現が TGF- $\beta$  により強く誘導されることを発見した。一方 ES 細胞や iPS 細胞では Nodal-Lefty 発現調節に TGF- $\beta$  が関与するか否かわかっていない。そこで我々はマウス ES 細胞および当講座で樹立したマウス iPS 細胞でこの遺伝子の TGF- $\beta$  による発現調節と比較検討することとした。

#### 2. 研究方法

マウス口腔粘膜より細胞を播種し、10cm dish で培養を行った。その後 pMXs-IRES-puro レトロウイルスベクターを用いて c-Myc, Oct3/4, Sox 2, Klf 4 で iPS 細胞を作製した。樹立した iPS 細胞は免疫染色を用いて ES 細胞の未分化マーカーである SSEA-1, Oct3/4, Nanog, 三胚葉分化マーカーである  $\beta$  III tubulin,  $\alpha$  1-fetoprotein (AFP),  $\alpha$ -smooth muscle action ( $\alpha$ -SMA) について確認した。ES 細胞, iPS 細胞は常法に従い培養した。TGF- $\beta$  又は TGF- $\beta$  と MAPK inhibitor で刺激し 48h で RNA を抽出した。これをサンプルとしてリアルタイム PCR をおこない、Nodal, Lefty 遺伝子の発現量を解析した。

#### 3. 研究成績および結論

樹立したマウス iPS 細胞は ES 細胞の未分化マーカー SSEA-1, Oct3/4, Nanog を免疫染色で示し、その未分化性を提示した。また分化マーカーである  $\beta$  III tubulin,  $\alpha$  1-fetoprotein (AFP),  $\alpha$ -smooth muscle action ( $\alpha$ -SMA) を免疫染色で示し多分化能があることを示した。

MAPK inhibitor 刺激群では Nodal 発現量は変化がなかった。Lefty 発現量は p38 inhibitor 刺激群で有意な減少がみられるが、他の inhibitor 群では差はみられなかった。TGF- $\beta$ +MAPK inhibitor 刺激群では MAPK inhibitor 刺激群と同様差が見られないが、Lefty 発現量は iPS 細胞でのみ有意に増加した。しかし TGF- $\beta$  刺激群と TGF- $\beta$ +MAPK inhibitor 刺激群では Lefty 発現量に違いはなかった。

上皮癌では Lefty の発現が TGF- $\beta$  で刺激し、TGF- $\beta$  に対して抑制的な調節をする MAPK を各種 inhibitor

で阻害すると Lefty 発現はさらに増加した。一方 ES 細胞では Lefty の発現誘導はほぼ認められなかった。また iPS 細胞では Lefty の発現量増加はみとめられたものの、TGF- $\beta$  刺激群のみと TGF- $\beta$  と MAPK inhibitor 刺激群での差はなく、ガン細胞での Lefty 発現とは異なったものとなった。

これらの結果より Lefty 遺伝子の挙動には ES 細胞と iPS 細胞の間に違いがある可能性が示唆された。Nodal-Lefty は協調して未分化細胞の機能を維持するが、iPS 細胞では 4 因子の導入により Lefty 発現調節が変化することから、その未分化性の維持や体軸の形成、さらには分化したあとの組織の発癌の頻度に影響を与える可能性がある。

### 論文審査の要旨

Nodal-Lefty 経路は ES 細胞の未分化性、胚の体軸対称性などの重要な調節因子であり、特に Nodal は高転移性悪性黒色腫で発現が高いことが知られている。我々は膀胱癌細胞において通常、発現していない Lefty 遺伝子の発現が TGF- $\beta$  により強く誘導されることを発見した。そこでマウス ES 細胞および当講座で樹立したマウス iPS 細胞で Lefty 遺伝子の TGF- $\beta$  による発現調節と比較検討した。その結果 TGF- $\beta$  により Lefty 発現量は iPS 細胞でのみ有意に増加した。しかし TGF- $\beta$  刺激群と TGF- $\beta$ +MAPK 阻害剤刺激群では Lefty 発現量に違いはなかった。このことより本論文では Lefty 遺伝子の挙動には ES 細胞と iPS 細胞の間に違いがある可能性、iPS 細胞では TGF- $\beta$  により Nodal-Lefty 遺伝子が誘導される可能性が示唆された。

本審査委員会では、1) タイトルへ TGF- $\beta$ , Nodal および oral mucosal(口腔粘膜)の記載、2) iPS 細胞について、3) 研究の目的について、4) 今後の臨床への展開等、討議ならびに質疑がなされたが、概ね妥当な解答を得られた。そのほか、論文記載方法について指摘があり、修正がなされた。

本研究で得られた知見は歯学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。