

論文内容の要旨

申請者氏名 村上 未玲

ES 細胞は分化多能性に加えて、腫瘍細胞に匹敵する高い増殖能を有している。腫瘍細胞においては、PI3 kinase 経路が増殖促進において重要な役割を果たしていることが報告されているが、ES 細胞においても、同経路が増殖促進に関与していることがわかってきた。ES 細胞における PI3 kinase 経路は、培地中に含まれるインスリンや増殖因子に加えて、RAS 類似タンパク ERas により恒常的に活性化されている。申請者は、インスリン様作用を持つことが知られている Visfatin や PI3 kinase の下流で働く因子である mTOR (Target of rapamycin) が未分化 ES 細胞において高発現していることを見いだした。しかし、Visfatin や mTOR の ES 細胞や初期胚における役割は不明である。そこで本研究においては遺伝子ノックアウトの手法により Visfatin と mTOR の生理的役割を検討した。

Visfatin は、B リンパ球のコロニー形成を促進するサイトカイン、NAD 生合成に関与する酵素、およびインスリン様作用を示す分泌蛋白質としての 3 つの機能が報告されている蛋白質である。これまで脂肪組織において高発現していることが示されていたが、申請者は未分化 ES 細胞においても Visfatin が高発現していることを見いだした。Visfatin の生理的機能を解析するために ES 細胞における相同組み換えにより遺伝子ノックアウトを行った。Visfatin ヘテロ変異マウスは正常に発生し、妊性も有していた。しかしヘテロ変異マウス同志の交配からホモ変異マウスは誕生しなかった。組織学的に解析した結果、ホモ変異胚は着床直後に致死となることがわかった。ホモ変異の胚盤胞は正常の形態を示したが、*in vitro* で増殖できないことがわかった。この際、培地中に NAD を加えると増殖能が回復した。一方、インスリンによる増殖能の回復は認められなかった。Visfatin ホモ変異の ES 細胞は樹立することはできなかった。RNAi により ES 細胞において Visfatin の発現を抑制すると、増殖能の低下が認められた。以上の結果から、Visfatin は ES 細胞および初期胚の増殖に必須であるが、インスリン様作用より NAD 合成酵素としての機能が関与していると考えられた。

mTOR は PI3 kinase の下流で作用するキナーゼであり蛋白質翻訳調節などへの関与が示唆されている。遺伝子ノックアウトの結果、Visfatin の場合と同様に、ホモ変異胚は着床直後に致死であり、ホモ変異胚盤法の *in vitro* での増殖能が著しく低下していることがわかった。またホモ変異 ES 細胞は樹立できなかった。そこで Cre-loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトを行った。その結果、mTOR は ES 細胞の増殖に必須であることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 村上 未玲

ES細胞は分化多能性を維持したまま長期間にわたり培養が可能であり、再生医学への利用が期待されている。ES細胞の特性維持機構を理解することは、重要な課題である。最近、ES細胞の多能性と高い増殖能の両者においてPI3 kinase経路が増殖促進において重要な役割を果たしていることが報告されている。申請者は、インスリン様作用を持つことが知られているVisfatinやPI3 kinaseの下流で働く因子であるmTOR (Target of rapamycin) が未分化ES細胞において高発現していることを見だし、そのES細胞や初期胚における役割を解明することを目的に本研究を行った。

まず申請者はVisfatinの生理的機能を解析するために、ES細胞における相同組み換えにより遺伝子ノックアウトを行った。Visfatinヘテロ変異マウスは正常に発生し、妊性も有していた。しかしヘテロ変異マウス同志の交配からホモ変異マウスは誕生しなかった。組織学的に解析した結果、ホモ変異胚は着床直後に致死となることがわかった。ホモ変異の胚盤胞は正常の形態を示したが、*in vitro*で増殖できないことがわかった。Visfatinは、インスリン様作用に加えて、NAD生合成に関与する細胞内酵素として機能することが報告されている。そこで申請者は、Visfatin欠損胚盤胞の増殖がインスリンまたはNADにより回復するかを検討した。その結果、培地中にNADを加えると増殖能が回復した。一方、インスリンによる増殖能の回復は認められなかった。さらに申請者はRNAiによりES細胞においてVisfatinの発現を抑制させた結果、増殖能の低下を認めた。以上の結果から、VisfatinはES細胞および初期胚の増殖に必須であるが、インスリン様作用よりNAD合成酵素としての機能が関与していると結論づけた。

次に申請者はmTOR遺伝子のノックアウトマウスを作成し、Visfatinの場合と同様に、ホモ変異胚は着床直後に致死であり、ホモ変異胚盤法の*in vitro*での増殖能が著しく低下していることを見いだした。次いで申請者はホモ変異ES細胞の樹立を試みたが2つ方法によっても樹立できなかった。そこでCre-loxPシステムを用いたコンディショナルノックアウトを行った。その結果、mTORはES細胞の増殖に必須であることを明らかにした。

以上のように、本論文は十分に科学的意義のあるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。