

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 地 神 貴 史

Wnt シグナルは個体の発生、癌化に重要な働きをしている。これまで、Wnt シグナルに関して多くの知見が蓄積され、このシグナルによって制御される様々な現象に対する理解も深まりつつある。Wnt シグナルが活性化すると細胞内では  $\beta$ -catenin が蓄積し、核内へ移行して転写因子 TCF/LEF と相互作用することにより転写標的遺伝子の転写制御が引き起こされる。既に申請者らは Wnt シグナルの新たな制御因子 B9L を同定し、 $\beta$ -catenin/Tcf を介した転写を制御していることを明らかにしている。転写制御機構の破綻は大腸癌などにおいて認められているがそのメカニズムについては完全には明らかとなっていない。本研究は、B9L の生体での機能を明らかにするためノックアウトマウスの作製を行い、その表現型を明らかにしたものである。

第一章では、B9L に関する基礎的な知見をまとめ本論文の目的を述べた。

第二章では、ノックアウトマウス作製について述べた。ターゲティングベクター作製時に、LacZ 遺伝子を B9L の ATG 下流にフレームの合うように挿入し B9L の機能が欠失するように設計した。ES 細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入、G418 によるスクリーニングの後、PCR およびサザンプロットで相同組み換え体を同定した。得られたポジティブクローンをを用いてアグリゲーション法によりキメラマウスの作製を行い、キメラマウスの作出に成功した。

第三章では、B9L ヘテロマウスを用いて B9L 遺伝子の発現解析を報告した。前述のストラテジーによる LacZ 遺伝子の活性を指標に X-gal 染色により B9L の発現を解析した。E10.5 の卵黄嚢、胎盤、胎仔を用いて解析した結果、卵黄嚢では脈管系でシグナルが認められ、特に血管内皮細胞 (EC) やその周辺の mesothelial layer、一部の endothelial cell でシグナルが認められたことを報告した。胎盤ではラビリンスレイヤーに発現が認められた。一方胎仔では、背側大動脈や心嚢膜、脊索などにシグナルが認められた。

第四章では、B9L ノックアウトマウスの表現型の解析結果を述べた。B9L のホモ欠損個体は胎生 11 日で胎生致死となった。その顕著な表現型は卵黄嚢に認められ、E10.5 の野生型では血管構造、血流が認められる一方、ホモ個体では卵黄嚢表面が蒼白であり、切片の染色により血流の減少、血管形成の不全が認められた。また、胎盤ではラビリンスレイヤーにおける胎仔型血管構造の形成不全が見出され、胚体外組織での B9L の重要性が明らかとなった。一方胎仔では、野生型に比べ発育遅滞や心臓領域での浮腫、内出血が認められた。さらに、血管内皮細胞のマーカーである抗 PECAM 抗体を用いた免疫組織染色や電子顕微鏡観察により血管構造の異常を明らかにした。また、心臓の形成不全を連続切片の HE 染色により明らかにし、B9L がマウス胎仔における脈管形成や心臓の形態形成に重要な働きをしていることを明らかにした。

本研究では Wnt シグナル制御因子 B9L がマウスの発生段階において胚体外組織の形態形

成や、胎仔での脈管形成、心臓の形態形成に重要な働きをしていることを明らかにした。

血管形成のメカニズムは癌などにおける腫瘍血管形成のメカニズムにも共通する事象であり、血管形成の研究の発展は、血管制御によって病態の改善を誘導する血管治療の開発にも重要な知見を与えてくれると期待される。

以上、本論文は B9L ノックアウトマウスの作製および機能解析を行ったもので、その表現型は興味深く、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。