

論文の内容の要旨

論文題目

遺伝子欠損 ES 細胞を用いたポリピリミジン配列結合タンパク PTB の機能解析

指導教官 吉田 進昭 教授

東京大学医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 柴山 正樹

マウス胚性幹 (Embryonic Stem: ES) 細胞は、胚盤胞の内部細胞塊より樹立される細胞株であり、未分化状態を維持したまま無限に増殖することができる。ES 細胞を再び胚盤胞へ移植すると ES 細胞由来の細胞を備えたキメラマウスを作成できることから、ES 細胞はマウス個体の全ての細胞への多分化能を備えた内部細胞塊または胚盤葉上層の *in vitro counter part* であると考えられている。初期胚に含まれる幹細胞および ES 細胞の未分化状態を維持するために必要な分子機構として、転写因子 Oct-3/4 や Nanog などの重要性が示されている。一方 ES 細胞の増殖を制御するシグナル経路として ERas を介した PI3 キナーゼ活性化経路の重要性が明らかとなっている。ES 細胞の未分化状態を維持するために必要な遺伝子のいくつかは ES 細胞の増殖能を高く保つ為にも必要であり、*Dicer-null* ES 細胞は多分化能を失うと同時に増殖能も低下していた。このように ES 細胞の幹細胞としての性質を維

持するために必要な因子の同定は進んでいるが、それらが互いにどのような関係にあるのかといった研究は始まったばかりであり、ES 細胞の多分化能の維持と増殖制御メカニズムとの関係について分子レベルで明らかにしていく必要があると考えられる。

Polypyrimidine tract binding protein (PTB) は成体組織に広く発現が見られる 58 kD のタンパクで、pre-mRNA に結合する hnRNP の一つとして同定された。PTB は mRNA のスプライシング制御を始めとして、mRNA の安定化、internal ribosomal entry site (IRES) を介した翻訳開始、転写調節といった働きを持つ多機能な因子であることが示されている。また当研究室におけるこれまでの研究から、PTB は ES 細胞に特異的に発現する *Rex-1* および *Nanog* の発現制御に関与する可能性があると考えられた。PTB の機能に関する知見が蓄積しているが、PTB が細胞の生存に不可欠なのか、分化運命の決定や増殖制御に関与するのか、また個体発生過程においてどのような役割を担うのかに関しては明らかではなかった。そこで本研究では、PTB が細胞の生存、分化、増殖においてどのような役割を果たしているのかを明らかにするために、*Ptb* ノックアウト (KO) マウスおよび *Ptb*-null ES 細胞を作製し、その解析を行った。

胚盤胞において、PTB の発現は内部細胞塊および栄養外胚葉で見られた。発生過程における PTB の生理学的機能を明らかにするために、*Ptb* KO マウスの作製を試みた。*Ptb* +/- マウス同士を交配して得られた新生仔の遺伝子型をサザンブロット解析したところ、*Ptb* -/- マウスは存在せず、*Ptb* KO マウスは胚生致死であると考えられた。そこで各発生段階の胎仔の遺伝子型を PCR 法によって解析したところ、*Ptb* KO マウスは着床前後の時期 (胚生 4-6 日) に致死であることが示された。着床前の *Ptb* KO マウスは胚盤胞期までは形態上は正常に発生するように見えたが、その胚盤胞から新たに ES 細胞株を樹立することはできなかった。*Ptb* KO マウスは胚盤胞期に既に株化可能な未分化な細胞集団を失っているのではないかと考えられたため、初期胚に含まれる幹細胞の生存、分化運命の決定、増殖制御に PTB がどのような役割を果たしているのかに関してさらに詳細な解析を行うために、*Ptb*-null ES 細胞を樹立し、解析を行った。

Cre/loxP システムを用いて *Ptb* 遺伝子の両アレルを破壊し、2 クローン of *Ptb*-null ES 細胞を得ることができた。*Ptb*-null ES 細胞は生存し、継代培養可能であり、形態上は未分化状態を維持した ES 細胞に特徴的なコンパクトなコロニーを形成した。そこで ES 細胞特異的に発現が見られる遺伝子に

関してノザンブロット解析を行ったところ、*Ptb* null ES 細胞において *Oct-3/4* mRNA の発現量は *Ptb* +/+、+/- ES 細胞と同程度に維持されていたのに対して、*Rex-1* および *Nanog* mRNA の発現量は減少していた。これは、PTB が *Rex-1*、*Nanog* の発現制御に関与するのではないかという仮説と一致すると考えられた。この時、*Ptb* null ES 細胞が未分化な ES 細胞の性質を維持しているのかどうかは明らかでなかったため、増殖能および多分化能に関して以下の解析を行った。

Ptb +/+、+/- および -/- ES 細胞を 5 日間培養して細胞数を計数したところ、*Ptb* -/- ES 細胞は *Ptb* +/+、+/- ES 細胞の十分の一程度までしか増加しなかった。この結果から、*Ptb* null ES 細胞は増殖能が低下していることが強く示唆された。そこで細胞内 DNA 量を測定して細胞周期分布の解析を行ったところ、*Ptb* -/- ES 細胞では S 期の細胞の割合が減少していた。DNA 合成をしている細胞の割合を bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み量を指標に測定したところ、*Ptb* -/- ES 細胞では BrdU 陽性の細胞の割合が減少していた。このとき、TdT によって断片化 DNA 末端が蛍光標識された細胞をアポトーシスを起こしている細胞として判定したところ、*Ptb* null ES 細胞ではコントロールと比較してアポトーシスの亢進は見られなかった。*Ptb* -/- ES 細胞に *Ptb* を強制発現させると、増殖能がコントロールと同程度までに回復した。次に、*Ptb* null ES 細胞がテラトーマ形成能を維持しているのどうかを検討した。5 x 10⁶ の *Ptb* +/+ または -/- ES 細胞を、それぞれ 5 匹のスキッドマウスの腎皮膜下に移植し、3 週間後に腎臓を取り出し観察した。*Ptb* +/+ ES 細胞を移植した場合、4 匹のマウスの腎臓周囲にテラトーマが形成されており、残り 1 匹では腎臓と周囲組織の癒合が観察された。それに対し、*Ptb* -/- ES 細胞を移植した全てのマウスの腎臓でテラトーマの形成を確認できず、*Ptb* null ES 細胞はテラトーマ形成能を持たないことが示された。以上の結果から、*Ptb* null ES 細胞は生存するが、S 期の細胞の割合が減少しており、*in vitro*、*in vivo* いずれの条件下でも増殖能が低下していることが明らかとなった。

Ptb null ES 細胞の多分化能について検討するために、胚様体を形成させて分化誘導を行い、分化マーカー遺伝子の発現量の変化をノザンブロット解析した。*Ptb* null ES 細胞を分化誘導したところ、原始外胚葉マーカー *Fgf5* mRNA の発現誘導はわずかに確認されたが、原始内胚葉マーカー *Gata4*、*Gata6* mRNA の発現はほとんど誘導が見られず、臓側内胚葉マーカー *H19* mRNA の発現量は分化誘導する前よりも低下していた。この結果から、*Ptb* null ES 細胞は原始外胚葉への分化能が低下しており、原始内胚葉への分化能をほとんど維持していないことが示唆された。即ち *Ptb* null ES 細胞は *Oct-3/4*

の発現を維持しているものの部分的に多分化能を失っており、未分化状態を完全には維持していないと考えられた。

これまで述べてきたように、本研究により以下の結果を得た。(1) *Ptb* KO マウスは着床前後の時期に致死であり、(2) *Ptb* KO マウスの胚盤胞からは新たに ES 細胞株を樹立できなかった。(3) Cre/loxP システムを用いて作製した *Ptb* null ES 細胞では、*Oct-3/4* の発現量はコントロールと同程度に維持されていたが、*Nanog*、*Rex-1* の発現量が減少していた。(4) *Ptb* null ES 細胞は増殖能が低下しており、(5) 部分的に多分化能が失われていた。従って、PTB は初期胚に含まれる幹細胞および ES 細胞が活発に増殖し、分化する際に必要であると考えられる。

ES 細胞の増殖および分化状態の制御に関与するシグナル経路として PI3 キナーゼを介した経路が知られているが、PTB の機能とどのように関わるのかは不明である。既知のシグナル経路と PTB との関連性が解明されることが期待される。また、PTB と相同性の高い因子として regulator of differentiation 1 (Rod1) および brain-enriched PTB (brPTB) の存在が知られている。Rod1、brPTB はいずれも PTB とアミノ酸配列で 70-80% の相同性を持ち、機能ドメインの構造もよく保存されており、PTB と類似した機能を持つ可能性がある。一方、生体組織における発現様式は相互に異なっている。PTB とこれらの因子との機能的な異同や、組織における発現分布の相違に基づいた生理的役割の異同に関して、今後の解析が展開することが期待される。

本研究で得られた知見は、*in vivo*、*in vitro* 双方から細胞の増殖制御、多分化能の維持における PTB の重要性を示すと共に、今後本研究を基にして更なる解析をしていく礎になることが期待される。