

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 齊 藤 亮 太

マウス胚性幹 (ES) 細胞は、受精後 3.5 日のマウス胚に存在する内部細胞塊から樹立される幹細胞で、自らと同じ細胞を生み出す自己複製と全ての体細胞や生殖細胞へと分化できる能力をもつ。そのため、ES 細胞の自己複製能と多分化能の理解は、初期胚発生の機構や、幹細胞を用いた再生医療の発展に役立つと考えられる。これらの能力は、ES 細胞を含む限られた細胞に特異的なものであり、多くの転写因子の介在が報告されているが、その詳細は不明である。「ホメオボックス遺伝子 *CrxOS* の ES 細胞の自己複製・多分化能に果たす役割の解明」と題した本論文においては、ES 細胞に特異的に発現する転写因子として *CrxOS* を新たに同定し、*CrxOS* が ES 細胞の自己複製能と多分化能に重要な役割を果たすことを見出している。

1. ES 細胞に特異的に発現する *CrxOS* 遺伝子の同定

EST (Expression Sequence Tag) データベースを用いて、転写因子のドメインの 1 つであるホメオボックスをもつ遺伝子の中から、ES 細胞に特異的に発現する遺伝子を探索した。データベース上の 240 種類のマウスホメオボックス遺伝子のうち、ES 細胞に特異的に発現するものは、その遺伝子の EST の総数に占める、3.5 日胚由来または ES 細胞由来の EST の数の割合が比較的高いことが予想される。そこで、これらの値を算出し、最も高い値を示すホメオボックス遺伝子として *CrxOS* を見出した。*CrxOS* は、マウス網膜での発現が知られていたが、ES 細胞での発現や機能は不明であった。そこで、RT-PCR 法により、ES 細胞、それを分化誘導させた細胞、3.5 日胚、9.5~12.5 日胚、さらに成体マウスの各臓器における *CrxOS* の発現量を検討した。その結果、未分化な細胞を多く含む精巣を除くと、ES 細胞や ES 細胞の由来である 3.5 日胚でのみ *CrxOS* の発現が確認された。これらの結果から、*CrxOS* が ES 細胞に特異的に発現することが示された。

2. ES 細胞に発現する *CrxOS* short フォーム

CrxOS には、DNA 結合ドメインであるホメオドメインを N 末端側と C 末端側に 2 つをもつ long フォームと、N 末端側のホメオドメインのみをもつ short フォームが知られていた。マウスホメオドメインの系統樹解析から、*CrxOS* のこの 2 つのホメオドメインは、共に既知のホメオドメインのサブファミリーには属さないことが示された。したがって、*CrxOS* の DNA 結合特異性は他のホメオボックス遺伝子とは大きく異なり、ES 細胞において独自の標的遺伝子をもつことが予想された。さらに、ES 細胞で、*CrxOS* long と *CrxOS* short のどちらが発現しているかを調べる

ため、long と short で共通の部分ペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を製し、ES 細胞の抽出物に対してウェスタンブロットを行った。その結果、ES 細胞では、CrxOS の short フォームが発現していることが明らかにされた。

3. ES 細胞の分化を抑制する CrxOS short フォーム

CrxOS short フォームが ES 細胞の分化を抑制している可能性を考え、CrxOS short を過剰発現させた ES 細胞から未分化維持因子の LIF (leukemia inhibitory factor) を除去した時の影響を検討した。その結果、CrxOS short フォームの過剰発現により、未分化な細胞の指標となる丸い盛り上がったコロニーが多く残存すること、さらに ES 細胞の特徴である高い増殖能が維持されることが見出された。これらの結果から、CrxOS short フォームが ES 細胞の分化抑制に十分であることが示された。

4. ES 細胞の自己複製能および *foxD3* の発現に必要な CrxOS short フォーム

CrxOS が ES 細胞の自己複製に必要なかを検討するために、ES 細胞で RNAi 法により *CrxOS* を発現抑制したところ、生存細胞数が減少することが見出された。また、この生存細胞数の減少は RNAi 非感受性の *CrxOS short* の過剰発現により救助されることが見出された。このことから、*CrxOS short* が ES 細胞の生存細胞数維持に必要であり、ES 細胞の正常な自己複製に必要であることが示された。次に、*CrxOS* 発現抑制時の生存細胞数の減少がどのような過程で生じているかを調べるために、ES 細胞の自己複製に必要なことが知られているいくつかの転写因子の遺伝子発現の変化を RT-PCR 法により検討した。その結果、*CrxOS* 発現抑制時に、*foxD3* の発現の低下が見出された。この結果から、*CrxOS* が *foxD3* の発現に必要なことが示唆された。したがって、*CrxOS* 発現抑制により自己複製能に異常が生じる一因として、*foxD3* の発現低下が考えられた。また、*CrxOS* 発現抑制時に ES 細胞のマーカーである *oct3/4* や *nanog* の発現に変化が見られないこと、さらに、ES 細胞の分化時に見られるような際立った形態変化が観察されないことから、*CrxOS* 発現抑制時に ES 細胞の未分化状態は維持されることが示された。

本論文から、ES 細胞に特異的に発現し、ユニークな DNA 結合ドメインをもつ転写因子 *CrxOS* の short フォームが、ES 細胞の分化の抑制に十分であり、ES 細胞の正常な自己複製能に必須の役割を果たすことが示された。さらに、*CrxOS short* フォームは、既知の転写因子とは異なる独自の転写経路を介して、ES 細胞の分化を抑制し、*FoxD3* の発現維持等により早い増殖を維持するという、2つの重要な作用機構のモデルが提示された。以上を要するに、本論文は、ES 細胞の自己複製能と多分化能の維持に介在する転写経路を理解する上で、新たに重要な知見を提示しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。