京都大学	博士（　　医科学）	氏　名	山　口　新　平
論文題目	Conditional Knockdown of *Nanog* Induces Apoptotic Cell Death in Mouse Migrating Primordial Germ Cells （*Nanog* の抑制は移動期の生殖細胞において細胞死を誘導する）		

（論文内容の要旨）

[背景]生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達する、生体内でも最重要な細胞であり、出現から移動、増殖、減数分裂に至る複雑な過程を経て発生する。このうち移動期は、増殖を繰り返しながらゲノムのリプログラミングを受ける重要なステージである。*Nanog* は胚性幹（ES）細胞の未分化維持に必須の因子として同定された。ホメオドメインをもつ転写因子である *Nanog* は、*Oct4* や *Sox2* と協調的に働き、分化関連遺伝子の抑制や未分化関連遺伝子の活性化に寄与する。*Nanog* は桑実胚から胚盤胞の内部細胞塊細胞だけでなく、着床後の発生段階における生殖細胞でも高発現している事がわかっている。しかし *Nanog* 欠損マウスは着床直後に致死となるため、生殖細胞での機能は不明のままである。

[目的]本研究では *Nanog* の生殖細胞における役割を明らかにし、生殖細胞発生メカニズムの一端を明らかにする事を目的とした。

[方法]RNA 干渉を誘導する *Nanog*-shRNA を、DNA 組み換え酵素 Cre 依存的に発現する条件的 *Nanog* ノックダウン（KD）マウスを作製した。*Nanog*-shRNA の発現は、生殖細胞特異的に発現する TNAP-Cre トランスジェニックマウス、または薬剤（タモキシフェン）投与により Cre 発現が誘導可能な ER-Cre トランスジェニックマウスとの交配により誘導した。

[結果]*Nanog* KD 胚の生体内生殖細胞の解析、培養生殖細胞の解析、生体内生殖細胞の包括的遺伝子発現解析から、以下の結果が得られた。

1) TNAP-Cre および ER-Cre のいずれを用いた *Nanog* KD 胚（E11.5-12.5）においても生殖巣内生殖細胞数がコントロールに比べて有意（　30%）に減少していた。
2) 生殖巣移入前である移動期の *Nanog* KD 生殖細胞（　E10.5）では、Nanog の発現が抑制されるが Oct4 の発現は維持されていた。
3) 移動期の *Nanog* KD 胚では、アポトーシスを示す生殖細胞が有意に増加していた。また、細胞増殖の有意な減少も確認された。
4) 薬剤投与時期を遅らせて *Nanog* KD の時期を遅らせたところ、生殖巣内生殖細胞数の減少は確認できなくなった。
5) 生体または培養生殖細胞の経時的観察から、*Nanog* KD から 24 時間以内に生殖細胞のアポトーシスが誘導されることが示された。
6) 単一細胞遺伝子発現解析の結果、*Nanog* KD 生殖細胞では *Id1*、*Tial1*、*Suz12* の発現減少を含む、700 以上の遺伝子発現変化が確認できた。

[結論]本研究により、*Nanog* は移動期の生殖細胞において、複数の因子を制御する事で増殖とアポトーシス阻害に機能している事が示された。この結果は欠損によって分化が誘導される ES 細胞での表現形とは異なり、同じ分子でも異なる細胞種の分子ネットワーク内では異なる機能を果たすことを示している。

（論文審査の結果の要旨）

本研究は、新たに作製した条件的Nanogノックダウン（KD）マウスを用いて、未分化性維持因子Nanogの生殖細胞における機能を明らかにしたものである。

幹細胞で鍵となる転写因子Nanogは、未分化な胚細胞のみならず、発生初期の移動期生殖細胞でも高発現している事を示した。KDによりNanog発現が抑制された生殖細胞では細胞死（アポトーシス）が誘導され、初期生殖巣内での生殖細胞数に有意な減少が認められた。生殖細胞の培養実験からも、Nanogの発現抑制から24時間以内の速やかな細胞死が確認された。生殖細胞での遺伝子発現の包括的な解析により、Nanogの発現抑制に伴って700種類以上の遺伝子発現に変動が現れ、分子ネットワークの崩壊による細胞死誘導が示唆された。胚性幹細胞では分化抑制に働くNanogが、初期生殖細胞では細胞増殖維持と細胞死抑制に機能している事を明らかにした。

以上の研究は、未分化性維持因子Nanogの生殖細胞における分子機能を明らかにしており、幹細胞の性質と分子機構の解明に寄与している。再生医学において重要な幹細胞の多能性と未分化性の理解に貢献した意義は大きい。

したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成21年12月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降