

審査の結果の要旨

氏名 齋藤 奈央子

本論文は妊娠期母体の肝臓に生じる変化を、胚のエネルギー代謝様式が変化すると共に胎盤からの栄養供給が高まる妊娠初期から中期に着目し、マウスをモデルとして分子的に明らかにした研究成果を述べたものである。学位申請者は、漿尿膜胎盤が形成され始める妊娠 8 日の母体肝臓では、アミノ酸、脂質、ビタミン等の分解酵素の発現が抑制傾向にあることを明らかにした。また、*Ascl1* をはじめとした通常状態の肝臓では発現しない遺伝子発現に着目することで、それらの遺伝子群が母体肝臓の妊娠特異的な性質の発現に関わる可能性を見出した。

申請者は、胚・胎盤依存的な母体肝臓変化を検討するため、妊娠マウス、偽妊娠マウスの肝臓について RNA-seq 解析を行なった。これまで多くの先行研究は妊娠中期以降のマウス肝臓における遺伝子発現変化の解明を目的としていたが、申請者はこれらの先行研究との差別化を図るため、詳細な胚発生ステージ及び肝臓・脾臓肥大化に基づく妊娠初期から中期にかけてのマウス母体肝臓を研究対象とした。さらに、妊娠期の母体肝臓で見られた遺伝子発現変化が胚・胎盤依存的であるか否かを判断するため、妊娠 8 日と偽妊娠 8 日の肝臓を比較した。その結果、妊娠 8 日のみで発現変動し偽妊娠 8 日では発現変動しない遺伝子群の同定に成功した。さらに、それらの遺伝子が含まれる KEGG PATHWAY を同定した。偽妊娠の成立は、偽妊娠マウスの肝臓肥大化の測定及び肝臓における遺伝子発現変動から判断した。また、RNA-seq 解析の信頼性を確認するため、定量リアルタイム PCR によって RNA-seq の結果を確認することで、RNA-seq が適切に測定されたと判断した。妊娠期の肝臓細胞での遺伝子発現変化を定量リアルタイム PCR によって確認するために適切な内部標準遺伝子は先行研究では厳密には検討されていなかったため、本論文では適切な内部標準遺伝子を予め検討した。従って、本論文での母体肝臓細胞における RNA-seq 解析及び定量リアルタイム PCR は信頼性が高い測定系であると考えられる。

申請者は RNA-seq の階層的クラスタリングと hydrodynamic injection という *in vivo* 肝臓特異的遺伝子過剰発現系を利用することで、肝臓細胞で転写因子 *Ascl1* によって発現誘導される遺伝子候補も同定した。*Ascl1* は神経系発生に重要な転写因子であるが、RNA-seq によって *Ascl1* が非妊娠時と比べて妊娠 8 日の母体肝臓で最も発現上昇度の大きな遺伝子であることがわかった。*ASCL1* は妊娠期母体の肝臓サイズ調節及び胎児発生に関わることが先行研究で示唆されていたことから、申請者は *Ascl1* が妊娠期の母体肝臓状態を誘導する制御因子である可能性を考え、*Ascl1* によって発現誘導される遺伝子の探索を試みた。RNA-seq の階層的クラスタリングにより、転写因子 *Ascl1* と類似の発現変化を示す遺伝子群が同定されるので、その中には *Ascl1* ターゲット遺伝子が含まれるのではないかというアイデアである。この方法で、申請者は実際に *in vivo* 肝臓特異的遺伝子過剰発現系により *Ascl1* を肝臓で過剰発現した場合に発現上昇する遺伝子 *Klk1b4* と *Slc16a6* を同定した。これらの結果は、RNA-seq 解析の階層的クラスタリングの利用が転写因子によるターゲット遺伝子の絞り込みに有効な手法となり得ることを示唆するものである。また、この手法は hydrodynamic injection という *in vivo* 肝臓特異的遺伝子過剰発現系を組み合わせることで、*in vivo* 肝臓細胞での遺伝子発現誘導の探索がより簡便に行えることを示す知見である。

また、申請者は妊娠初期から中期にかけての tryptophan 代謝についても解析を行なった。その結果、母体肝臓での Trp-K 代謝変動を遺伝子発現及び代謝産物濃度変化の点から明らかにし、子宮脱落膜における Trp-K 代謝変動も同時に検討することで母体全身性の代謝変化の意義を示唆する知見を得た。妊娠 8 日のマウス母体肝臓で見られた顕著な *Tdo2* 発現低下は、Trp-K 代謝の抑制及び肝臓中 Trp 量の保存につながると考えられ、実際に母体肝臓では非妊娠と比べて妊娠 8 日に Trp 濃度が上昇することがわかった。また、同一個体の子宮脱落膜では非妊娠と比べて妊

娠 8 日では細胞あたり **Tdo2** 発現量が肝臓細胞と同程度まで上昇すること及び **Kyn** 濃度が顕著に上昇することの知見を得た。先行研究から **Kyn** 代謝産物は抗炎症作用や胎盤での免疫抑制作用を有し、胎児に対する免疫寛容に働くとされる。従って、本論文で得られた知見は妊娠 8 日の母体では胚・胎盤発生を支えるため、肝臓での **Trp** 分解が抑制され、子宮で多くの **Trp** を代謝する機構が働いている可能性を示唆するものである。妊娠期母体肝臓での **Trp** 代謝調節と子宮脱落膜及び血清中の代謝産物濃度との連動性、意義は未だ不明であるが、本論文で得られた結果は、母体血清中の栄養物質濃度を一定に維持する制御機構を示唆する知見となり得る。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。