

## 論文内容の要旨

申請者氏名      FIQRI DIZAR BIN KHAIDIZAR

Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) is an important multifunctional small molecule involved in energy metabolism and modification of DNA/proteins in order to integrate cellular homeostasis and survival. Tissues from aged mice have been found to be depleted intracellular NAD<sup>+</sup> level partly due to the decrease of Nicotinamide phosphoribosyl-transferase (NAMPT), a rate-limiting enzyme in the NAD<sup>+</sup> salvage pathway. In vitro NAMPT inhibition in human cells has been shown to deplete NAD<sup>+</sup> level and promote cellular senescence, while NAMPT upregulation through *Nampt* overexpression can increase NAD<sup>+</sup> level and promote cellular proliferation. Although this suggests a role for NAMPT in supporting NAD<sup>+</sup>-regulated cellular proliferation and senescence, it is not known if the same effects are conserved in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells.

The applicant used primary MEF cells derived from mice with stable overexpression of *Nampt* (*Nampt*-OE) to investigate the effect of constitutively elevated intracellular NAD<sup>+</sup> level on cellular proliferation/senescence. *Nampt*-OE managed to elevate intracellular NAD<sup>+</sup> level, enhanced the population doubling capacity and suppressed senescence markers, indicating an impact on the onset of senescence by NAD<sup>+</sup> upregulation in *Nampt*-OE cells.

As in vitro culture primary cells under atmospheric oxygen condition has been associated with replicative senescence, it was hypothesized that the delayed onset of senescence in *Nampt*-OE cells is mediated by enhanced mitigation of oxidative stress. The applicant demonstrated that reactive oxygen species (ROS) level in *Nampt*-OE cells have lower compared to WT cells and *Nampt*-OE cells have increased *Sod2* and *Catalase* (ROS scavenging enzymes) gene expression. SIRT1 activity was also found to be increased in *Nampt*-OE cells.

In conclusion, this study suggests that increasing intracellular NAD<sup>+</sup> level by overexpressing *Nampt* can influence cell proliferation/senescence fate in murine cells, similar to that observed in the human cells. This is achieved by increasing NAD<sup>+</sup> in turn enhance SIRT1-mediated antioxidant gene expressions and bolster the resistance against oxidative stress.

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名      FIQRI DIZAR BIN KHAIDIZAR

生物個体から分離した初代正常細胞は、生物種・細胞種に固有の分裂回数を経ると、それ以上分裂しない“老化細胞”になり、またその状態を細胞老化という。これまで細胞老化は個体老化とは関連しない *in vitro* の現象であると考えられてきたので、細胞老化の分子メカニズムは詳細には解析されてこなかった。しかし近年、個体の組織にも老化細胞が存在することが示され、また個体の組織から老化細胞を取り除くと老化関連疾患の進行の遅延することや個体の寿命が延長することが証明されつつある。このことから、細胞レベルでの細胞老化は個体の老化に深く関与していることが示唆されている。

本研究において申請者は、個体老化および細胞老化においてその重要性が指摘されている  $\text{NAD}^+$  とその合成を制御する酵素である *Nampt* に注目して、細胞老化進行のメカニズムの解明を試みた。*Nampt* は、細胞内  $\text{NAD}^+$  量を制御する  $\text{NAD}^+$  再利用経路の律速酵素であり、細胞内  $\text{NAD}^+$  量を制御していることが知られている。また、加齢により *Nampt* および  $\text{NAD}^+$  量が減少することがヒトおよびマウスを用いた研究で明らかになっている。申請者は、所属する研究室で作成された複数ラインの *Nampt* 高発現トランスジェニックマウスの胚から初代 MEF 細胞を樹立し、*Nampt* 発現量依存的に  $\text{NAD}^+$  量が増加すること、さらに細胞老化が遅延することを明らかにした。この結果は、既にヒト初代細胞で見出されており、*Nampt*/ $\text{NAD}^+$  経路による細胞老化制御機構は種を超えた普遍的な機構である可能性を示した。

さらに申請者は、細胞老化を引き起こす主な原因である酸化ストレスが *Nampt* 高発現 MEF 細胞で減少していること、そのメカニズムが  $\text{NAD}^+$  依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の活性上昇による抗酸化遺伝子 *Sod2*、*Catalase* の発現促進による可能性を示した。また、細胞増殖停止と細胞老化マーカーである細胞老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性上昇のタイミングが野生型 MEF 細胞では同時であるのに対し、*Nampt* 高発現 MEF 細胞は増殖停止後、細胞老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇するまでにタイムラグがあることを見出し、その原因を mTOR 経路の活性抑制と関連づけて議論しているなど、*Nampt*/ $\text{NAD}^+$  経路による細胞老化制御機構のさらなる解明が期待できる。

以上のように、本論文は *Nampt*/ $\text{NAD}^+$  が細胞老化遅延に関与すること、さらにその分子メカニズムの一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。