

氏 名	よし かわ よし あき 吉 川 義 顕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2057 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse (マウスにおけるWnt-3aシグナルの欠失は体節中胚葉にかわり神経系形成を促進する) (主査)
論文調査委員	教 授 西 川 伸 一 教 授 川 口 三 郎 教 授 宮 地 良 樹

論 文 内 容 の 要 旨

初期発生の研究には、主に両生類の胚が用いられており、FGF, TGF- β , Wnt等の細胞増殖因子が中胚葉誘導活性をもつことが明らかにされている。一方、マウスにおいては、ノックアウトマウスの解析から、いくつかの細胞増殖因子がマウス初期発生に関与していることが、遺伝学的に証明されている。そのなかでも、Wnt-3a遺伝子は、その発現領域およびノックアウトマウスの表現型から、初期発生を研究するうえで、着目すべき遺伝子の1つと考えられる。

Wnt-3aノックアウトマウスは、Wnt-3a遺伝子のエクソン3にネオマイシン耐性遺伝子を挿入し作製された。ホモ欠損マウスの多くは胎生12.5日までに死亡した。ホモ欠損マウスでは、体節中胚葉が7~9体節より尾側で完全に欠損しているのに対して、脊索の形成は体節よりやや尾側までみられ、腹側の中胚葉は正常に認められた。これらの結果とWnt-3a遺伝子が予定体節領域に発現していることから、7~9体節より尾側の体節中胚葉の欠損が直接的な異常であるとされ、Wnt-3a遺伝子が体節中胚葉の形成に必須であることが明らかにされた。

そこで今回、Wnt-3a遺伝子が体節中胚葉の形成過程でどのような働きをしているのかを明らかにする目的で、Wnt-3aホモ欠損マウスをより詳細に解析することを試みた。

Wnt-3aホモ欠損マウスは、7体節期頃から野生型との差が認められるようになるため、この時期に着目し解析を行った。まず、この時期のWnt-3a遺伝子の正常発現パターンを*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて調べたところ、主に胚性外胚葉に発現がみられ、原条から陥入した細胞ではごく弱いシグナルしかみられなかった。次に、7体節期前後のWnt-3aホモ欠損マウスのヘマトキシリン-エオジン染色による連続切片像を作製し、組織学的に観察したところ、原条より陥入した体節中胚葉になるべき細胞が、上皮様の形態のまま原条の腹側に集まり管状構造を形成している像が観察された。ここでみられた管状構造がどのような性質のものかを明らかにするために、胎生9.5日目および10.5日目のWnt-3aホモ欠損マウスを用いて、さまざまな分子マーカーによる*in situ*ハイブリダイゼーション法および抗体染色法を行った。この管状構造には中胚葉特異的マーカー(Mox-1, MF-1)の発現はほとんどみられず、かわりに神経管特異的マーカー(Mash-1, HES-5)の発現がみられ、抗ニューロフィラメント抗体でも染色された。さらに、この管状構造が神経管と同様な背腹極性をもつことを確認する目的で、底板のマーカー(Shh)、蓋板のマーカー(Wnt-1)、神経管の背側マーカー(Pax-3)、神経管の腹側マーカー(Pax-6)を用いて*in situ*ハイブリダイゼーション法を行ったところ、神経管と同様、Shhは脊索に近接した部分で、Wnt-1は表皮に近接した部分で発現がみられた。また、Pax-3は表皮に近い部分で強く発現がみられ、Pax-6の発現はその逆のパターンを示した。以上の形態学および分子マーカーを用いた解析より、この管状構造は神経管としての性質をもつことが明らかにされた。

これらの結果から、Wnt-3a遺伝子の欠失により体節中胚葉になる系列の細胞が神経管を構成する細胞へと運命転換した

ことが推測された。Wnt-3a遺伝子が、主に陥入前の胚性外胚葉に発現していることを合わせると、未分化な細胞が体節中胚葉や神経管へと分化する過程で、Wnt-3a遺伝子はその細胞の運命決定に関与していることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、マウスの体節中胚葉形成におけるWntシグナルの意義を、Wnt-3aホモ欠損マウスを用いて組織学的に解析したものである。まず、Wnt-3aホモ欠損マウスで形態の異常がはじめて認められる7体節期前後の連続切片を作製し観察したところ、原条より陥入した体節中胚葉になるべき細胞が上皮細胞様の形態のまま原条の腹側に集まり、管状構造を形成している像が観察された。そこで、さまざまな分子マーカーを用いた*in situ*ハイブリダイゼーション法および抗体染色法による解析を行った結果、この管状構造は神経管と同様な性質であることが明らかとなった。これらの結果とWnt-3aの発現パターンにより、胚性外胚葉を構成する未分化な細胞が、体節中胚葉や神経管へと分化する過程で、Wnt-3aシグナルがその細胞の運命決定に関与していることが考えられた。

以上の研究は、今まで解析の進んでいなかった哺乳類におけるWntシグナルの細胞レベルでの機能を明らかにした点において重要な意義をもつだけでなく、体節中胚葉形成と神経管形成との関連につき新たな知見を加えたものであり、体節中胚葉形成機構の解明にも寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）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10年10月19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。