

氏名	もり 森	わき 脇	かず 一	まさ 将
学位(専攻分野)	博士(医学)			
学位記番号	医博第3163号			
学位授与の日付	平成20年11月26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	医学研究科分子医学系専攻			
学位論文題目	Tight junctions containing of claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. (マウスの初期発生における胚盤胞形成には claudin 4 と claudin 6 から成るタイトジャンクションが必要である)			
論文調査委員	(主査) 教授 影山龍一郎 教授 瀬原淳子 教授 渡邊 大			

論文内容の要旨

上皮細胞間接着構造・タイトジャンクション (tight junction; TJ) は、細胞間隙での物質の透過性を制限するバリアとして上皮細胞シートの生理機能に重要な役割を果たしており、そのはたらきは初期発生における細胞分化や形態形成にも必須であると信じられてきた。哺乳類の初期胚では、コンパクションの頃から上皮細胞への分化が始まり、胚盤胞の最外層に栄養外胚葉と呼ばれる上皮細胞が形成される。栄養外胚葉は、細胞膜上のトランスポーターによる選択的輸送と TJ のバリア機能により胞胚腔に特異的な溶液環境を形成・維持することで、その後の胚発生を可能にしていると考えられている。しかしながら、実際に、哺乳類の初期胚における TJ の役割を実験的に解析した例はなく、初期発生における TJ の重要性もまったく分かっていない。そこで、哺乳類の初期発生、特に胚盤胞形成における TJ の機能を明らかにするために以下の実験を行った。

細菌毒素 *Clostridium perfringens* enterotoxin の細胞毒性を欠失した C 末端側ペプチド (C-CPE) は、TJ の接着分子であるクローディンファミリーの特定のタイプに結合して、その TJ 形成を阻害することが知られている。そこで、試験管内受精法により発生を開始させたマウス初期胚を C-CPE で処理し、C-CPE が初期胚の発生・分化に与える影響を形態観察や免疫染色により解析した。

C-CPE 存在下、胚は正常にコンパクションを起こし、桑実胚にまで分化した。しかし、その後の胚盤胞の形態形成が阻害された。この時、クローディン以外の TJ 局在分子や胚盤胞形成に必要なとされる Na^+/K^+ -ATPase の局在は正常であったが、栄養外胚葉におけるクローディンの局在の乱れと、トレーサー実験による TJ のバリア機能の低下が観察された。さらに、栄養外胚葉分化マーカー Cdx2、および、未分化能保持マーカー Oct3/4 の発現を解析したところ、栄養外胚葉において、正常では Cdx2 の発現に伴い Oct3/4 の発現が減少するが、C-CPE 処理胚では Oct3/4 の発現の減少が遅れることが分かった。一方、クローディンへの結合能力を欠如した C-CPE 変異体の処理では、初期胚の発生・分化にはまったく影響はなかった。以上より、C-CPE 処理によりクローディンの機能が阻害され、栄養外胚葉における TJ のバリア機能が低下して、胞胚腔の正常な溶液環境を形成できなくなった結果、正常な胚盤胞形成・胚分化が阻害されたことが示唆された。つまり、正常な胚盤胞の形成には、栄養外胚葉におけるタイトジャンクションのバリア機能が必須である可能性が示された。本研究は、発生過程におけるタイトジャンクションの重要性をはじめて示すものである。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞間接着構造タイトジャンクション (TJ) は、細胞間隙での物質の透過性を制限するバリアとして上皮細胞シートの生理機能に重要な役割を果たしており、その働きは初期発生における細胞分化や形態形成にも必須であると信じられてきた。しかし、実際に、哺乳類の初期胚における TJ の役割を実験的に解析した例はなく、初期発生における TJ の役割は明らかにされていない。本研究では、哺乳類の初期発生、特に胚盤胞形成における TJ の機能を明らかにするために、TJ 局在接

着分子クローディン (cldn) に対する阻害ペプチド (C-CPE) を用いて、初期発生において最初に発生する上皮細胞である栄養外胚葉 (TE) の TJ のバリアを阻害する実験を試みた。

マウス初期胚は、正常にコンパクションを起こして桑実胚にまで分化したが、その後の胚盤胞の形態形成が阻害された。この時、cldn 以外の TJ 局在分子や胚盤胞形成に必要とされるトランスポーターの局在は正常であったが、TE における cldn の局在の乱れ、トレーサー実験による TJ バリア機能の低下、および、分化マーカーの発現異常が観察された。以上より、正常な胚盤胞の形成・分化には、TE における TJ のバリア機能が必要であることが示された。本研究は、哺乳類初期発生におけるタイトジャンクションのバリア機能としての役割を実験的に検証したものであり、生物の発生機構の解明に多大なる貢献をすと思われる。

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 19 年 10 月 29 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。