

氏名	さとう たかひこ 佐藤 貴彦
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2936号
学位授与の日付	平成18年3月23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	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Neural crest determination by co-activation of <i>Pax3</i> and <i>Zic1</i> genes in <i>Xenopus</i> ectoderm (アフリカツメガエル外胚葉における <i>Pax3</i> と <i>Zic1</i> 遺伝子の共発現による神経堤分化の決定に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 影山龍一郎 教授 中辻憲夫 教授 篠原隆司

論 文 内 容 の 要 旨

神経堤細胞は中枢神経原基の神経板と共に初期胚において外胚葉から発生し、末梢神経系細胞を含む多様な末梢組織の細胞への分化能を有する。神経堤細胞は神経板と表皮組織の境界から発生することから、外胚葉の背腹軸に沿った BMP シグナルの勾配や背側神経板に発現する Wnt シグナルがその発生に関与することが示唆されている。しかし、神経堤細胞が未分化な神経上皮から分化していく初発段階の遺伝子制御機構には不明な点が多い。

アフリカツメガエル初期胚において、神経堤予定領域のマーカーには *Foxd3* や *Slug* が知られている。本研究では、どのようにして *Foxd3* が神経堤の前駆細胞にだけ発現するのかという機序を明らかにするため、上流制御因子候補として *Pax3* と *Zic1* という2つの転写因子の役割に焦点を当てた。

Whole mount *in situ* hybridization の二重染色により、*Pax3* と *Zic1* の発現は原腸胚期において *Foxd3* の発現開始より早い時期から認められること、および *Foxd3* 発現領域は *Pax3* と *Zic1* が共発現している領域に内包されていることが示された。次に神経堤発生に関与している BMP, Wnt シグナルと *Pax3*, *Zic1*, *Foxd3* の関係を調べるため、胚への合成 mRNA の微量注入による強制発現実験を行った。その結果、*Pax3*, *Zic1*, *Foxd3* は BMP シグナルの増強により負に、Wnt シグナルの増強により正に制御されることが判明した。さらに *Pax3* と *Zic1* の強制発現を行うと、*Foxd3* 発現領域の拡大が認められた。*Pax3* と *Zic1* それぞれ単独の強制発現では *Foxd3* の拡大は胚の背側部でのみ確認されたが、*Pax3* と *Zic1* を同時に共発現すると腹側の表皮組織にも異所的な *Foxd3* を認めた。このように胚において *Pax3* と *Zic1* の共発現が神経堤の異所的誘導に十分であることが示された。

次に *Pax3*, *Zic1* の機能喪失実験を行うため、合成 Morpholino アンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を胚に注入した。その結果、*Pax3*-MO, *Zic1*-MO どちらでも神経堤マーカーの発現が減少した。一方 *Foxd3*-MO では *Pax3*, *Zic1* 発現領域の減少が認められなかったことから、*Pax3* と *Zic1* は *Foxd3* の上流で制御を行い、両方ともが神経堤の形成に必須であることが明らかとなった。

さらに中胚葉等からの二次的影響を除外するため、外胚葉外植片実験を行った。この結果、*Pax3* と *Zic1* だけでは *Foxd3* の発現を外胚葉から誘導することが出来ず、Wnt シグナルの共存が必須であることが判明した。さらに *Pax3*, *Zic1*, Wnt3a 三者の共発現下では、BMP4 シグナルの存在いかんに関わらず *Foxd3* の誘導が認められた。一方、*in vivo* における Wnt シグナルを阻害する β -catenin-MO の強制発現実験からも、*Pax3* と *Zic1* に加えて Wnt シグナルが神経堤の異所的誘導に必須であることが示された。

以上のように、アフリカツメガエル外胚葉において *Pax3* と *Zic1* の共存が神経堤分化決定の必須条件であること、また Wnt シグナルの存在下には *Pax3* と *Zic1* の共存が神経堤発生の十分条件であることを明らかにした。本研究は二つの転写因子の発現と分泌因子の組合せにより神経堤発生の位置情報が規定される新規のモデルを提唱するものである。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の発生過程で末梢神経系等の原基となる神経堤は神経上皮・表皮接合部組織から分化するが、その初発段階の制御機構には不明な点が多い。本学位申請者は神経堤特異的に発現する Foxd3 遺伝子上流制御機構を調べるため、アフリカツメガエル初期胚を用いて Pax3 と Zic1 という二つの転写因子の役割を解析した。

mRNA 微量注入による強制発現実験やアンチセンスオリゴヌクレオチド注入による機能喪失実験から、Pax3, Zic1 それぞれが Foxd3 の発現を正に制御し、両方の共存が神経堤分化決定の必須条件であることを示した。また、in vivo および in vitro 解析から、Wnt シグナル存在下には Pax3 と Zic1 の共発現が神経堤分化の十分条件であることを明らかにした。これらの知見から、二つの転写因子の発現と一つの分泌因子の組み合わせにより神経堤発生の位置情報が規定されるモデルが提唱された。

以上の研究は、神経堤における初期分化の制御機構の解明に貢献し、末梢神経系等の末梢組織の発生やその形成異常の原因の解明に寄与するところが多い。

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18年1月5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。