

京都大学	博士（医学）	氏名	趙 蘭 英
論文題目	Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain (Sonic hedgehog は Bmp4 の発現を背側部に限局させることによって腹側眼杯形成に関与する)		
(論文内容の要旨)			
発生において形態形成因子として重要な役割を果たしている Sonic hedgehog (Shh)は、様々な標的遺伝子の発現制御を介して、細胞の増殖、生存、位置情報の伝達やパターン形成を調節している。先行研究により、脊椎動物の眼胞パターン形成においても重要な役割を果たしていることが示唆された。眼の発生に関わる重要な遺伝子の一つとして Pax6 が知られている。Pax6 は眼原基のマーカーでもあり、Shh シグナルによって発現が抑制される。Pax2 は眼柄のマーカーであり、Shh 過剰発現は Pax2 発現を促進する。Pax2 と Pax6 は互いに抑制し合う。Shh シグナルは腹側眼杯における Vax2 の発現と optic stalk における Vax1 の発現に必要であることが分かっている。眼胞パターン形成に関与することが示されている他のシグナル分子として Bmp4 が知られている。Bmp4 の発現は背側眼杯に限局されており、その腹側部の発現は Shh シグナルによって抑制されると考えられる。眼原基のパターン形成は上記等の様々な因子を介して行われているが、その複雑な遺伝子ネットワークには不明な点が多い。 眼形成における Shh シグナルの役割を解明するために、Smoothened (Smo) 遺伝子を眼原基においてコンディショナルにノックアウトすることを試みた。Smo は膜タンパク質であり、Shh シグナル受容細胞において Shh 経路を活性化する。Cre 発現のドライバーとしては、Fgf15 エンハンサーを用いた。 Smo コンディショナルノックアウトマウス(CKO)において、眼原基の形態異常が E10 頃から観察された。E10、E11 に見られる主な異常は腹側の眼杯が欠損していることである。レンズも一時的に形成されているように見えたが、後に消失する。E18 胎児では眼全体が欠損していた。 上記の異常の原因を追及するため、まず BrdU の取り込み実験を行った。30 体節期 (E10) には Smo-CKO 眼杯における細胞増殖が減少していることが明らかになった。さらに、細胞死のマーカーである Caspase-3 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、24 体節期 (E9.5) には細胞死も増加していることがわかった。これらの結果から、Shh シグナルは眼杯細胞の増殖や生存を維持/促進していることが明らかになった。 次に、Bmp4 発現パターンを調べた。眼胞全体における Bmp4 発現量上昇が 21 体節期 (E9.5) までに観察された。Vax1/Vax2 の発現は 20-24 体節期 (E9.5-9.75) の間に背側から減少し始めた。Pax2/Pax6 遺伝子の発現は 27-32 体節期 (E9.75-10.25) の間に変化し始めることが観察された。 Raldh2/Raldh3 は retinoic acid (RA) を合成する因子である。Raldh2^{-/-}/Raldh3^{-/-}では Smo-CKO と同様の眼形成異常がみられる。そこで、Smo-CKO において Raldh2/Raldh3 発現を調べたところ、野生型と同じ発現パターンであった。従って、眼形成における retinoic acid は Shh シグナルの下流ではないことが分かった。 以上の我々の結果とこれまでの報告から、Shh シグナルは Bmp4 の眼杯腹側部における発現を抑制して背側部に限局させていること、Shh シグナルが Bmp4 を介して Vax1/Vax2 発現制御に関与していることが示された。			

(論文審査の結果の要旨)			
Sonic hedgehog (Shh)は発生における重要な分泌因子である。眼発生において Shh mRNA は眼杯近傍に発現がみられず、間脳腹側正中部に検出されるのみであり、その眼球形成における役割は不明であった。一方、眼杯における Bmp4・Pax6 発現は Shh により抑制され、Vax1/2・Pax2 発現は促進されるが、これら因子間の関係は明らかでなかった。この遺伝子カスケードを明らかにするため、Shh シグナル伝達因子 Smo の遺伝子を眼原基においてノックアウトしたマウス(CKO)を作成した。E10 の Smo-CKO では眼杯腹側が欠損していた。眼杯背側もその後消失し、E18 では眼全体が欠損していた。BrdU 取込実験では E10 の Smo-CKO 眼杯における細胞増殖が減少していた。E9.5 眼杯を Caspase-3 で免疫染色すると細胞死が増加していた。従って、Shh は眼杯細胞の増殖や生存を促進していることが示された。正常では眼杯背側部に限局する Bmp4 の発現が Smo-CKO では腹側部へ拡大していた。この異常は 18~21 体節期に観察された。Pax2/6, Vax1/2 についても発現異常が観察されたが、これらはそれぞれ 30 体節期、24 体節期に始まっていた。以上により、Shh は Bmp4 の発現を眼杯背側部に限局させていること、それによって Vax1/2 の眼杯腹側部の発現維持に関与していること、Pax2/6 の発現パターンの確立は Vax1/2 よりも後に起こることが示された。 以上の研究は眼形成機構の解明に大きく貢献するものである。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22年1月12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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			