

氏 名	孫 祥 園
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3189 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 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 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Expression dynamics of LIM-homeobox genes, <i>Lhx1</i> and <i>Lhx9</i> , in the diencephalon during chick development (ニワトリ間脳発生における LIM ホメオボックス遺伝子 <i>Lhx1</i> 及び <i>Lhx9</i> の発現パターンとその制御機構の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 金 子 武 嗣 教 授 鍋 島 陽 一

論 文 内 容 の 要 旨

間脳は、後方から prosomere 1, 2, 3 (p1, p2, p3) という神経分節に別れ、それぞれ pretectum, dorsal thalamus (背側視床; 狭義の視床), ventral thalamus (腹側視床または視床下核) になる。これらの神経節内においては更に様々な神経核 (ニューロンの集塊) が存在し、それぞれが異なる機能を担っている。これら神経核を成すニューロンの identity は、発生中に発現する転写因子、主として LIM-homeodomain 型・その他の homeodomain 型・bHLH 型等の組み合わせによって決まることが示唆されている。今回、ニワトリ間脳のパターン形成における *Lhx1* および *Lhx9* の役割を明らかにするための端緒として、それらの発現がどのようなパターンを示すかを調べた。

Lhx1 は最初 Hamburger Hamilton (HH) stage10 においてヘンゼン結節・脊索・脊索前板で発現が観察された。その後、HH stage11 において間脳原基後部 (p1) 腹側領域 (底板) で強い発現が検出された。HH stage14 以降は p1 背側 (翼板) においても発現がみられたが、境界溝 (底板と翼板の境界) においては発現しておらず、ギャップが存在した。また翼板における発現は腹側 (境界溝付近) において強く、背側へ向かって減少する勾配を成していた。HH stage18 以降は p2 底板にも発現が見られた。一方、*Lhx9* は HH stage11 より前脳と眼胞全体に発現が観察された。その後 *Lhx9* 発現領域は局限してゆき、HH stage18 までに終脳前背側部、眼杯腹側部、背側視床原基 (p2) 最背側部とその周辺部に特異的な発現がみられるようになった。

発生中の間脳は腹側部の床板・底板からの Sonic hedgehog (Shh) シグナル、背側の蓋板からの Wnt シグナル、FGF シグナル等によってパターン形成が制御されると考えられてきた。今回そこで Shh, Wnt, FGF シグナルを異所性に発現させることによって *Lhx1*, *Lhx9* の発現パターンに変化がみられるか調べた。

HH stage10-11 に in ovo electroporation により Shh 発現ベクターを間脳原基に導入し、30 時間後に解析した。*Lhx1* の p1 翼板における発現の上昇とともに、p2 翼板に異所性発現が検出された。Shh シグナル受容細胞中で標的遺伝子の発現を制御する転写因子 Gli2 の発現ベクターを electroporation したところ、*Lhx1* 発現を誘導した。これらの結果から、*Lhx1* は Shh シグナルによって正の制御を受けていると考えられた。

間脳における *Lhx9* 発現は p2 背側部に局限していることから、Shh シグナルによって抑えられ、蓋板からの Wnt, FGF シグナルによって増強されることが予想された。Shh 発現ベクターを導入することで *Lhx9* 発現は消失した。Wnt3a 発現ベクターを導入したところ、Wnt3a によって発現が増強・拡大された。canonical Wnt pathway を媒介する転写因子 TCF4 の dominant negative 型を導入したところ、*Lhx9* 発現は消失した。また p2 蓋板には Fgf19 が発現している。このシグナルによる影響を調べるため、ニワトリ Fgf19 及びそのマウスホモログである Fgf15 発現ベクターを導入したところ、*Lhx9* 発現の増強がみられた。これらの結果から、間脳における *Lhx9* 発現は蓋板からのシグナルによって増強され、Shh シグナルによって抑制されることが分かった。

以上の結果より、転写因子 *Lhx1*, *Lhx9* の発現は発生中間脳における床板・底板・蓋板からのシグナルによって制御を受

け、特徴的なパターンを示すようになることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

間脳において形成される神経核の identity は、発生中に発現する主として LIM-homeodomain 型転写因子の組み合わせによって決まることが示唆されている。本研究では、ニワトリ間脳のパターン形成において重要な役割を果たすと考えられている転写因子 *Lhx1* 及び *Lhx9* の発現パターンとそれらの制御機構を調べた。

Lhx1、*Lhx9* 共に、発生中の間脳において特徴的な発現パターンを示した。それらの発現パターンから、*Lhx1* は腹側部からのシグナルによって、また *Lhx9* は背側部からのシグナルによって発現が正に制御されていることが示唆された。腹側部からのシグナルは *Sonic hedgehog* (*Shh*) によって、背側からのシグナルは *Wnt* および *FGF* によって担われていると予測された。したがって、*in ovo* エレクトロポレーションにより、ニワトリ胚の間脳でこれらのシグナルを異所性に発現させたところ、*Lhx1* は *Shh* シグナルによって異所性発現が誘導された。また *Lhx9* は *Wnt3a*, *FGF15/19* シグナルによって発現領域の拡大と発現レベルの上昇が観察された。

以上の研究は間脳パターン形成の分子機構の解明に貢献し、神経発生学の発展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 20 年 1 月 8 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。