京都大学	博士（医学）	氏　名	檀　上　輝　子
論文題目	Subregional specification of ES cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatory treatment with extrinsic signals (ES 細胞培養系に於ける外因性シグナルの添加時期及び組合わせ作用による腹側終脳組織の領域特異化)		

（論文内容の要旨）

マウス終脳の初期発生において、腹側終脳領域(外套下領域)は主として外側基底核原基(LGE)、内側基底核原基(MGE)、尾側基底核原基(CGE)の３つの部位から形成される。LGE からは線条体が、MGE からは主に淡蒼球が産生されるが、これらの大脳基底核は運動調整に重要な機能を果たす錐体外経路を構成しており、また MGE/CGE からは大脳皮質及び大脳基底核内での情報処理に機能する介在ニューロンが産生される。

この研究では、マウス ES 細胞培養系を用いて、外套下領域の発生を体系的に再構成し、外因性シグナルの組合わせと添加時期の調節によってこの領域内のパターン形成を制御し、マウス ES 細胞から LGE/MGE/CGE それぞれへ選択的に分化誘導することを目的とした。

ES 細胞の無血清浮遊凝集塊培養法で分化誘導された終脳神経上皮は、Shh シグナルの濃度依存的に腹側化されることが報告されている（渡邉ら、2005）。今回、Shh の添加時期を詳細に検討したところ、外套下領域を誘導するには、終脳特異的遺伝子マーカーである Foxg1 が発現するよりも早い時期の Shh シグナル添加が不可欠であった。さらにその後も、培養９日目までの持続的な Shh シグナルが LGE への特異的分化誘導に必要であることも明らかとなった。

Foxg1-GFP ノックイン ES 細胞を用いて、この LGE 分化条件で誘導した終脳神経細胞(GFP 陽性)を FACS で純化し培養を続けると、Nolz1 陽性かつ Ctip2 陽性である LGE 特異的神経細胞へ分化した。さらに継続培養したところ、これらの GFP 陽性終脳神経細胞は線条体の代表的な投射神経である、DARPP32 陽性の中型有棘神経細胞へと成熟した。中型有棘神経細胞への分化は FACS 純化した細胞のマウス線条体内への移植後にも確認された。ES 細胞に由来する細胞の生体内移植では、移植細胞の腫瘍化がしばしば問題となるが、Foxg1-GFP ノックイン ES 細胞を用いて誘導した LGE 特異的神経細胞の移植では、移植前に純化操作を行うことにより、腫瘍化が抑えられることが示された。

次に、LGE よりも腹側に位置する MGE/CGE への分化条件を検討した。Shh シグナル作動薬である SAG の高濃度添加により ES 細胞から誘導した終脳神経細胞は、純化し培養を続けることにより、MGE/CGE 領域の個性づけを有する細胞へ分化することが示された。興味深いことに、MGE へ効率的に分化誘導するには、高濃度の SAG に加えて Fgf8 シグナルが必要であり、Fgf15/19 シグナルの添加は逆にこれを阻害した。対照的に CGE への分化誘導は、Fgf15/19 シグナルによって促進され、Fgf8 シグナルによって抑制された。これらのことから、個々の Fgf シグナルは、ES 細胞由来の腹側終脳神経組織の領域特異化に対して、各々異なった、重要な役割を果たしていることが示唆された。外套下領域において MGE は前方に、CGE は後方に位置している。本研究で Fgf8 は前方(MGE)、Fgf15/19 は後方(CGE) の分化誘導に有効であったことから、Fgf8 シグナルと Fgf15/19 シグナルが外套下領域の前後軸に沿ったパターン形成に対して拮抗的に作用していることが推定される。これらのシグナルが前後軸に沿ったパターン形成に拮抗的に作用することは、大脳皮質（背側終脳神経組織）の発生においても報告されており、Fgf8 と Fgf15/19 の拮抗的作用は、終脳の背側部と腹側部に共通した前後パターン形成機序の一つであることが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

マウス終脳の初期発生において、腹側終脳領域は主に外側基底核原基(LGE)、内側基底核原基(MGE)、尾側基底核原基(CGE)の三部位から形成される。本研究では、マウス ES 細胞からこれら三部位への選択的分化誘導を、外因性シグナルの組合せと添加時期の調節により制御することを目的とした。

ES 細胞の無血清浮遊凝集塊培養法において、LGE への分化誘導には Shh が培養３日目から９日目まで必要であった。この条件で誘導した前駆細胞を FACS で純化し培養すると、LGE 特異的な Nolz1/Ctip2 共陽性細胞へと分化し、さらに DARPP32 陽性線条体中型有棘神経細胞へ成熟し、マウス線条体内への移植による生着も確認された。

MGE と CGE への分化条件の検討では、より前方に位置する MGE への分化には、高濃度の Shh 作動薬（SAG）に加えて Fgf8 が必要であり Fgf15/19 はこれを阻害した。対照的に、より後方の CGE への分化は、Fgf15/19 により促進され Fgf8 により抑制された。Fgf8 と Fgf15/19 の拮抗的作用は、大脳皮質の前後軸形成でも同様の報告があり、今回の結果から、終脳の背側部と腹側部に共通の前後パターン形成機序の一つであることが示唆された。

以上の研究は、ES細胞由来の腹側終脳神経組織の領域特異化に対する外因性シグナルの作用の解明に貢献し、神経変性疾患の研究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23年3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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降