

氏名・(本籍)	お の ひろ たけ 小 野 裕 剛		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	理博第1331号		
学位授与年月日	平成5年3月25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	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻		
学位論文題目	神経冠培養系におけるマウス色素芽細胞分化の研究		
論文審査委員	(主査) 教 授 竹 内 拓 司 教 授 長 内 健 治 助 教 授 井 出 宏 之		

論 文 目 次

第1章 総合序論.....	1
第2章 野生型および <i>Sl</i> 突然変異体の胚における移動中の <i>c-kit</i> 陽性細胞の検出.....	10
第3章 野生型マウスの培養神経冠細胞を用いた実験.....	21
第4章 <i>Sl</i> マウスの培養神経冠細胞を用いた実験	50
第5章 他の白斑遺伝子作用の解析への応用.....	60
第6章 総合論議.....	68
要 約.....	81
謝 辞.....	84
引用文献.....	86

論文内容要旨

第1章 総合序論

マウス色素細胞には細胞分化に影響する突然変異体（白斑突然変異）が多数知られており、細胞の分化を遺伝学的に研究するためのモデル系として優れている。本研究では分子遺伝学的に解析が進んでいる白斑遺伝子の一つに着目して、発生中の生体内および様々な培養条件下の神経冠細胞（色素細胞の前駆細胞）における発現の変化と色素細胞の分化の状況を比較することから、発現現象を分子遺伝学的に理解することを目的とした。

実験を行なうにあたり着目した白斑遺伝子は *W* 遺伝子座のプロトオンコジーン *c-kit* である。*c-kit* は色素芽細胞等の細胞表面に存在する受容体タンパク質をコードしており、そのリガンドである SLF (Steel factor) はもう一つの白斑遺伝子座である *Sl* 遺伝子座の産物であることが知られている。*W*, *Sl* 遺伝子座の突然変異体はヘテロ接合体で腹部に白斑を生じ、ホモ接合体では色素芽細胞が分化の途上で完全に失われるため皮膚に色素細胞が存在しない。このことから SLF/*c-kit* による情報伝達が色素細胞の分化に深く関与することが知られていたが、その作用機序や作用時期に関する知見は殆ど得られていなかった。本研究は分化途上の色素芽細胞において *c-kit* 発現を検出することにより SLF/*c-kit* による情報伝達が色素細胞分化のどの様なステップに、何時ごろ関与するかを解析することを初めとし、*c-kit* の発現をマーカーとし他の白斑遺伝子の相対的な作用時期を推測することも試みた。

第2章 野生型および *Sl* 突然変異体の胚における移動中の *c-kit* 陽性細胞の検出

神経冠細胞から色素細胞に分化中の細胞で *c-kit* がどの様に発現されるか、また *c-kit* 陽性細胞の移動が体内のどの経路を通過して起こるのかを解析するために、神経冠細胞の移動が起こる妊娠10.5日から14.5日の野生型マウス胚の胴部横断切片における *c-kit* 陽性細胞の検出を試みた。*c-kit* の発現の検出は抗 *c-kit* モノクローナル抗体を用いて行なった。

野生型マウスでは妊娠12.5日および14.5日の胚において神経管上部から背側方経路を通過して移動中と思われる *c-kit* 陽性神経冠細胞（色素芽細胞）が多数観察された。

Sl 突然変異体 (129/Sv-*Sl^l*/*Sl^l*) は *c-kit* のリガンドである SLF を作る事が出来ないため、SLF/*c-kit* による情報伝達が移動に関する情報であるならば *c-kit* 陽性細胞の分布に異常が見られると考えられた。

しかし、*Sl* 突然変異体においても *c-kit* 陽性細胞の分布には大きな異常は観察されなかった。皮膚には毛包など特殊な構造が存在するので、移動に関してはさらに詳細な検討が必要である。

第3章 野生型マウスの培養神経冠細胞を用いた実験

野生型マウス培養神経冠細胞は特別に薬剤を加えない培養条件下では色素細胞は殆ど分化しないが、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) とコレラトキシンを加えることにより色素

細胞が多数分化する。この時の *c-kit* 陽性細胞の出現状況から、色素細胞分化と *c-kit* 発現、さらに添加した薬剤と SLF/*c-kit* による情報伝達の関係について考察することを試みた。

実験は薬剤を加えないもの、PMA のみを加えたもの、コレラトキシンのみを加えたもの、両方加えたものの 4 つの条件で行なった。培養初期（培養開始後 3 日、6 日）は全ての条件で少数の *c-kit* 陽性細胞が観察された。同じ時期に色素細胞特異抗原である TRP-2（Tyrosinase Related Protein 2）を発現している神経冠細胞が存在することからこれらの *c-kit* 陽性細胞はすでに分化方向の決定を受けた色素芽細胞であることが推測された。培養後期（培養後 9 日、15 日）では PMA を加えた培養系で *c-kit* 陽性細胞が多数観察された。コレラトキシンのみ加えた培養条件でははっきりした *c-kit* 陽性細胞の増加は見られなかった。しかし双方を加えた条件では PMA のみの条件の数倍の *c-kit* 陽性細胞が観察された。

以上の実験から、培養初期にみられる神経冠細胞の一部はすでに決定を受けて色素芽細胞となっていて *c-kit* はその結果発現されること、PMA とコレラトキシンのによる色素細胞分化の誘導は *c-kit* 陽性細胞の増加を介して行なわれることが明かとなった。

また、培養系に PDGF AA homodimer や IL-3 を添加した場合も PMA とコレラトキシンによる場合より少ないながら *c-kit* 陽性細胞の増加が見られた。これらの結果と、本研究と同様の培養系に分泌型 SLF を加えた Murphy *et al.* (1992) の結果を考えあわせると、*c-kit* 陽性細胞は分泌型 SLF や PDGF AA homodimer などの協調作用により増殖し、この効果は培養系では PMA で代用されていると考えられる。そして、最終的な分化にはさらに別の情報伝達が必要であり、培養条件下ではこの過程も PMA で代用されていると考えられる。

第 4 章 *Sl* マウスの培養神経冠細胞を用いた実験

培養条件下で PMA とコレラトキシンのにより色素細胞が分化する際に、PMA で代用し得ない過程に SLF/*c-kit* による情報伝達に関わっているか否かを解析するために *c-kit* タンパク質のリガンドである SLF を作れない *Sl* 突然変異体 (129/Sv-*Sl^l/Sl^l*) の神経冠細胞を用いて第 3 章と同じ実験を試みた。

培養条件下で野生型の *c-kit* 陽性細胞が神経管に由来する上皮様構造上の全面に分布するのに対し、*Sl* 突然変異体では殆どの *c-kit* 陽性細胞が上皮様構造周縁部に分布した。これは細胞が移動を終了して、分化形質を示し始める過程に SLF/*c-kit* による情報伝達に関与することを示している。そしてこの移動終了の過程には PMA やコレラトキシンでは代用できない、膜結合型 SLF/*c-kit* による情報伝達を介した機構が存在することが示唆された。

第 5 章 他の白斑遺伝子作用の解析への応用

第 5 章においては *c-kit* 遺伝子発現を新たな色素細胞の分化マーカーとして用い、他の白斑遺伝子の変異が起こる時期や機序を推定する試みも行なわれた。具体的には *mi^{bw}* 白斑突然変異体の神経冠細胞を培養し、その細胞の *c-kit* 発現状況を野生型と比較することにより、*mi^{bw}*

マウスの色素細胞分化がどの段階で異常となっているかを推測できると考えた。

mi^{bw} マウスの培養神経冠細胞においても培養初期には野生型と同様に少数の *c-kit* 陽性細胞が観察された。しかし、培養系に PMA とコレラトキシンを添加しているにも拘らず培養後期には *c-kit* 陽性色素芽細胞は観察されなかった。

この結果 *mi^{bw}* マウスの神経冠細胞は色素細胞への決定を受け、*c-kit* を発現し始めるところまでには異常がないことが示された。そして *mi^{bw}* の異常は *c-kit* 陽性細胞が増殖できないことによると考えられる。

今後 *mi^{bw}* マウスに対して行った実験を他の白斑突然変異体で行なうことにより、そこで得られる発現時期や作用機序の情報が白斑遺伝子のクローニング、そして色素細胞分化を分子遺伝学的に理解することに役立つと考えられる。

第 6 章 総合論議

神経冠細胞から色素細胞への分化は以下のステップが相互に関連しながら起こると考えられる。

- ① 分化方向の決定
- ② 細胞の移動
- ③ 細胞の増殖
- ④ 移動の終了
- ⑤ 分化形質の発現

本研究において SLF/*c-kit* による情報伝達はおそらく③細胞の増殖、④移動の終了に深く関与していることが明かとなった。また *mi^{bw}* は SLF/*c-kit* による情報伝達後の③細胞の増殖に関与することが示唆された。

今後 *c-kit* を手がかりとした、他の白斑遺伝子の解析により色素細胞分化の詳細が明らかになると期待される。

論文審査の結果の要旨

マウス（ハツカネズミ）には白斑をあらわす突然変異遺伝子が多数知られているが、これらの白斑部位には色素細胞が見られないために、色素細胞が神経冠細胞から分化してくるまでの決定、増殖、移動などの過程に働く遺伝子に欠損が生じたことによると考えられ、細胞分化の遺伝子支配を研究するための好適なモデルである。

小野裕剛提出の論文は先ず白斑遺伝子のうち、*W* 遺伝子の発現について検討するために、*W* 遺伝子座の産物である *c-kit* タンパク質の抗体を用いてマウス胚における *c-kit* を発現している細胞を探索した。その結果、*c-kit* 発現細胞はいわゆる背側方経路に沿って観察された。また、*c-kit* 受容体のリガンドであると推定される別の白斑遺伝子 *Sl* 突然変異体における *c-kit* 発現細胞の観察を行ったが野生型のそれと差異がなかった。したがって、*Sl* 突然変異体においても *c-kit* 発現細胞は発生し、移動しているものと思われる。

次に、野生型マウスの胚から外植した神経管を培養して、*c-kit* 発現細胞の発生について検討した。この培養系に PMA（フォルボルミリスレートアセテート）を加えることによって *c-kit* 発現細胞が増加することが観察された。この効果はすで報告されている *Sl* 因子の効果と同様であり、*Sl* 因子は PMA と同様の情報伝達を行っているものと考えられる。

一方、*Sl* 突然変異体を用いて同様の培養を行ったが、野生型の *c-kit* 発現細胞が神経管由来の神経上皮細胞に接着して観察されたのに対し、*Sl* 突然変異体においては *c-kit* 発現細胞は主として神経上皮シートの外側に遊走していた。このことは、*Sl* 因子は *c-kit* 発現細胞を活性化するのみでなく、それらを捕捉する作用をもつものと思われる。

また、他の白斑遺伝子である *mi* 突然変異において *c-kit* 発現細胞が存在するかどうか検討したが、そのホモ接合体の胚においても野生型と同様の *c-kit* 陽性細胞が観察された。しかし、この細胞はその後 PMA 処理によっても増殖しなかった。このことから、*mi* 野生型対立遺伝子は *c-kit* 発現細胞（メラノプラスト）に増殖を誘起する作用があるものと考えられる。

これらの成果はマウス神経冠細胞の分化における遺伝子の作用についての新しい知見であり、この論文は博士論文として適当である。したがって、この論文は著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、小野裕剛提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。