

氏 名（本籍）	佐 藤 達 也
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 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 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	視 蓋 お よ び 小 脳 の 分 化 と Fgf8 シ グ ナ ル

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 仲 村 春 和	教 授 田 村 眞 理
	教 授 大 隅 典 子	

論文内容要旨

脊椎動物の脳は発生初期の前脳胞，中脳胞，菱脳胞から分化する。鳥類以下の脊椎動物では中脳胞背側から視覚の中樞である視蓋が分化し，菱脳胞の最も前側の後脳胞背側からは小脳が分化する。ニワトリ胚を用いた移植実験により中脳/後脳境界領域（峽）は視蓋/小脳のオーガナイザーとして働くことが明らかにされている。峽では分泌性因子の Fgf8 が発現しており，Fgf8 タンパクを染み込ませたビーズを前脳胞の予定間脳領域におくとその周囲は異所的な視蓋へと分化することから，Fgf8 は視蓋のオーガナイザー本体でないかと考えられている。本研究では峽部における Fgf8 の役割をさらに詳しく調べ，中脳胞と後脳胞の発生運命の相違はどのようなメカニズムによるのかを *in ovo* electroporation 法を用いて解析した。

始めに，峽で発現する Fgf8 のアイソフォームの種類を調べた。定量的 RT-PCR により Fgf8a と Fgf8b が発現しており，しかも Fgf8b の発現量が多いことがわかった。次に，Fgf8a と Fgf8b の cDNA を発現ベクターに挿入し *in ovo* electroporation 法により孵卵 1.5 日胚の間脳胞，中脳胞および後脳胞全体に強制発現させてその形態/組織学的変化を調べた。Fgf8a を強制発現させると孵卵 7.5 日胚の間脳胞からは異所的な視蓋が分化し結果として視蓋の肥大化が認められた。また孵卵 3.5 日胚において，本来の動眼神経に加えて間脳胞腹側から動眼神経様の神経束が存在し，動眼神経核は間脳領域まで拡大しているのが観察された。これに対して Fgf8b を強制発現させると間脳/中脳胞背側から異所的な小脳が分化した。表層には細胞が密な外顆粒層とその直下に calbindin 陽性の大きなプルキンエ細胞が認められた。さらに本来の位置に動眼/滑車神経核は認められず間脳胞腹側に異所的な神経核が見出された。これは異所的な滑車神経核ではないかと推測された。

Fgf8a と Fgf8b を強制発現させたときの遺伝子マーカーの発現変化は形態/組織的变化を裏付けるものであった。Otx2, Gbx2 はそれぞれ峽より前側，後側で発現し中脳/後脳境界を決定していることが示されている。Fgf8a を強制発現させると Otx2, Gbx2 ならびに後脳胞で特異的に発現する Irx2 の発現は変化しなかったが，Fgf8b を強制発現させると Otx2 の発現は間脳胞後側および中脳胞で抑制され，Gbx2 と Irx2 が誘導された。間脳/中脳境界と視蓋の前後極性を決めていることが示されている En は Fgf8a と Fgf8b のいずれによっても誘導された。

In ovo electroporation 法では発現ベクターの濃度に依存して強制発現させる遺伝子産物の量が増えることが示されている。Fgf8b の発現量を低下させると，Fgf8a を強制発現させたときと同一の表現型を示した。また，Otx2 を後脳胞において強制発現させると小脳は分化せず異所的に視蓋が分化することから，Otx2 は Fgf8 のシグナルに反応して視蓋へと分化させるコン

ピテンスを神経上皮に与えるものであると考え、Fgf8b と Otx2 を共に強制発現させる実験を行った。Fgf8b 単独では発現ベクターの濃度が $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のとき異所的に小脳が分化するが、Otx2 を同時に強制発現させると間脳胞/中脳胞/後脳胞より視蓋が分化した。

以上より、峽部周辺では Fgf8 のシグナルを強く受け取った領域が小脳へと分化し、弱いシグナルを受け取りかつ Otx2 の発現している領域が視蓋へと分化することを示した。さらに以下のような仮説を提唱した。正常胚において Fgf8 mRNA は予定後脳領域で発現がみられ、この領域は Fgf8 タンパクを多く受け取るものと考えられる。したがって、後脳胞ではシグナルが強く中脳胞では拡散する Fgf8 タンパクの量が少ないためシグナルが弱い。定量的 RT-PCR の結果より Fgf8b タンパクが実際のオーガナイザー活性の主たる担い手であると考えられる。中脳胞では、弱い Fgf のシグナルが En の発現を誘導/維持することにより視蓋のコンパートメントおよび前後極性の形成に関与しているものと考えられる。

審査結果の要旨

ニワトリ胚を用いた移植実験により中脳/後脳境界領域（峽）は視蓋/小脳のオーガナイザーとして働くことが示されている。峽では Fgf8 が発現しており、Fgf8 タンパクを染み込ませたビーズを前脳胞の予定間脳領域におくとその周囲は異所的な視蓋へと分化することから、Fgf8 は視蓋のオーガナイザー本体であると考えられている。佐藤達也君は Fgf8 の強制発現実験を行い、中脳胞と後脳胞の発生運命の相違はどのようなメカニズムによるのかを解析した。

始めに、峽では Fgf8 のアイソフォームのうち Fgf8a と Fgf8b が発現し、しかも Fgf8b の発現量が多いことを定量的 RT-PCR により明らかにした。次に、Fgf8a と Fgf8b を *in ovo* electroporation 法により孵卵 1.5 日胚の間脳胞、中脳胞および後脳胞全体に強制発現させた。Fgf8a を強制発現させると間脳胞からは異所的な視蓋が分化した。また本来の動眼神経に加えて間脳部腹側に動眼神経様の神経束が存在し、動眼神経核は間脳領域まで拡大していた。これに対して Fgf8b を強制発現させると間脳/中脳胞背側から異所的な小脳が分化した。組織学的にも外顆粒層と calbindin 陽性の大きなプルキンエ細胞が分化していることが確認された。本来の位置（本来の中脳部）に動眼/滑車神経核は認められなかった。

Fgf8a と Fgf8b を強制発現させたときの遺伝子マーカーの発現変化は形態/組織的变化を裏付けるものであった。Otx2, Gbx2 はそれぞれ峽より前側、後側で発現し中脳/後脳境界を決定している。Fgf8a を強制発現させても Otx2, Gbx2 ならびに後脳胞で特異的に発現する Irx2 の発現は変化しなかった。Fgf8b を強制発現させると Otx2 の発現は間脳胞後側および中脳胞で抑制され、Gbx2 と Irx2 が誘導された。En は Fgf8a と Fgf8b のいずれによっても誘導された。

In ovo electroporation 法では遺伝子産物の量は発現ベクターの濃度に依存することが示されているが、Fgf8b の発現量を低下させると、Fgf8a を強制発現させたときと同一の表現型を示した。このことから Fgf8a と Fgf8b の違いはシグナルの強弱に起因することが示唆された。一方、Fgf8b と Otx2 を共に強制発現させたところ、Fgf8b 単独では発現ベクターの濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のとき異所的に小脳が分化するが、この濃度では間脳胞/中脳胞/後脳胞より視蓋が分化した。

以上より、峽部周辺では Fgf8 のシグナルを強く受け取った領域が小脳へと分化し、弱いシグナルを受け取りかつ Otx2 の発現している領域が視蓋へと分化することが明らかとなった。正常胚では Fgf8 mRNA は予定後脳領域で発現がみられるのでこの領域は Fgf8 シグナルを多く受け取り小脳として分化すると考えられる。中脳胞では、弱い Fgf のシグナルが En の発現を誘導/維持することにより視蓋のコンパートメントおよび前後極性の形成に関与しているものと考えられる。

本論文は視蓋、小脳分化のメカニズムの理解に大きく貢献するものであり、学位論文に値する。