

氏 名 (本籍)	たか 高	はし 橋	まさ 将	のり 文
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 1 9 6 9 号			
学位授与年月日	平 成 1 5 年 3 月 2 4 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	転写因子 Pax 6 が制御する菱脳腹側神経前駆細胞 ドメインの確立とニューロンサブタイプの決定			

(主 査)

論文審査委員	教授 大 隅 典 子	教授 野 田 哲 生
	教授 仲 村 春 和	

論文内容要旨

神経管腹側の神経上皮には、様々なホメオドメイン (HD) タンパク遺伝子の発現により区別される神経前駆細胞ドメインが形成され、各ドメインからは異なるサブタイプのニューロンが産生される。本論文で私は、神経上皮における神経前駆細胞ドメインの確立と各ドメイン特異的なニューロン分化の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、菱脳腹側ニューロンの分化における転写因子 Pax6 の機能解析を行なった。自然発症 Pax6 遺伝子突然変異ラット *rSey*² およびマウス *Sey* ホモ胚菱脳では、体性運動 (SM) ニューロン、V1 介在ニューロンが欠損することが知られているが、これらのニューロンの分化における Pax6 の役割は十分研究されていなかった。そこで、*rSey*² ホモ胚における神経前駆細胞ドメインが正常に確立されているかどうかを調べるため、各種 HD 遺伝子の発現を解析した。その結果、それらの発現領域が拡大または縮小し、互いの発現境界が非常に不明瞭になっていた。また、電気穿孔法により、Pax6 遺伝子を野生型ラット胚菱脳へ導入したところ、HD タンパク遺伝子発現の抑制、異所的誘導が観察された。さらに、Pax6 遺伝子を *rSey*² ホモ胚菱脳へ導入したところ、SM ニューロンおよび V1 介在ニューロンの分化が回復した。HD タンパク遺伝子の発現領域は Sonic hedgehog (Shh) シグナルを介して制限されている。そこで、*rSey*² ホモ胚菱脳において、Shh シグナルの関連分子の発現を調べたが、神経前駆細胞ドメインでの発現変化は SM ニューロンの前駆細胞ドメインのみで観察された。また、*rSey*² ホモ胚菱脳では、やや細胞増殖が亢進していたが、HD タンパク遺伝子の発現変化が見られる領域での特異的な細胞増殖の変化や細胞死の増加は見られなかった。以上の結果より、Pax6 遺伝子は、神経前駆細胞ドメインを正確に規定することでニューロンサブタイプを決定していることが示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、脳幹部に発生するニューロンの分化における転写因子 Pax6 の機能について解析したものである。発生期における脳幹部（以下「菱脳」と称する）腹側には2種の運動ニューロンと3種の介在ニューロンが分化し、それらは特異的な分子マーカーによって区別することができる。転写因子をコードする Pax6 遺伝子に突然変異を有する Pax6 変異マウスおよびラットの表現型の解析から、Pax6 が菱脳腹側ニューロンサブタイプの分化に関わることが知られていたが、その詳細なメカニズムについては不明であった。そこで、本研究では Pax6 変異ラット胚を用いた機能欠失解析と、培養胎児神経管への遺伝子導入系による機能獲得実験を行うことにより、菱脳腹側ニューロンサブタイプ分化における Pax6 の機能を解析した。まず、ニューロン前駆細胞ドメインを区別しうるホメオドメイン (HD) 型転写因子遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した結果、Pax6 変異ラット胚ではこれら遺伝子の発現境界が不明瞭になっていることが分かった。また Pax6 遺伝子を野生型ラット胚へ遺伝子導入すると、HD 型転写因子遺伝子の発現が抑制もしくは異所的に誘導された。さらに Pax6 遺伝子を Pax6 変異ラット胚菱脳へ導入したところ、失われていたニューロンサブタイプの分化が回復した。これによって、Pax6 は HD 型転写因子遺伝子の発現を制御することにより、ニューロン前駆体ドメインを正確に規定することでニューロンサブタイプの分化に関わることが明らかになった。

本研究の大部分はすでに基礎論文1編 (Takahashi & Osumi, Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* 129, 1327-1338, 2002) および参考論文3編 (Takahashi et al., Manipulating gene expressions by electroporation in the developing brain of mammalian embryos. *Differentiation* 70, 155-162, 2002; 高橋および大隅, 哺乳類脳形成における Pax6 遺伝子の役割 実験医学 20 (5) 増刊 676-684, 2002; 高橋ら, 哺乳類胚神経管および胎児脳への遺伝子導入法 遺伝子医学別冊「図・写真で観る発生・再生医学実験マニュアル」pp 22-35, メディカル・ドゥ社 2002年) に発表されている。

以上のことから、本論文は哺乳類神経発生の分子メカニズムの一端を明らかにしたオリジナルの高いものであり、学位授与に十分値する。