

氏 名 (本籍)	すず 鈴 き 木 あ す か 明 日 香
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2 3 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 18 年 3 月 24 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	脳 形 成 に お け る Fgf8 シ グ ナ ル の 調 節 機 構

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 仲 村 春 和	教 授 小 椋 利 彦
	教 授 田 村 眞 理	

論文内容要旨

脊椎動物の中脳/後脳境界部（峽部）は、中脳・小脳分化のオーガナイザーとして働き、その本体は分泌性タンパク質 Fgf8 である。Fgf8 はチロシンキナーゼ型受容体を介して伝達されるが、小脳分化には Fgf8 による Ras-ERK 経路の活性化が必要であることが示されている。

細胞内シグナル因子 Sprouty2 は Fgf-Ras-ERK シグナル経路の抑制分子であるが、Fgf8 と重複して発現し、Ras-ERK シグナル経路の活性化によって誘導されることが報告されている。そこで、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いた遺伝子強制発現実験により、峽部 Fgf8 シグナルの調節が峽部形成にどのように働いているのかを調べた。

まず、峽部 Fgf8 シグナルの調節に Sprouty2 が働いていることを確かめた。Fgf8 を *in ovo* エレクトロポレーション法を用いて強制発現すると、Sprouty2 はわずか3時間で誘導された。また、峽部に Sprouty2 を導入すると、ERK のリン酸化は抑制され、Sprouty2-DN（ドミナントネガティブ型 Sprouty2）を強制発現すると ERK のリン酸化は増強された。

次に、Sprouty2 を強制発現し、峽部 Fgf8 シグナルを抑制してその影響を調べた。孵卵12日の正常胚では、視蓋と小脳は形態的に区別できる。Sprouty2 を導入すると本来の小脳領域に視蓋様の膨らみが形成された。組織学的にはその膨らみには外顆粒層が見られず、視蓋特有の層構造が見られた。このことから、Sprouty2 の強制発現により、後脳胞の発生運命が視蓋へ変わったことが考えられた。

さらに、Sprouty2 の強制発現が峽部マーカー遺伝子に及ぼす影響を調べると、Sprouty2 導入24時間後、後脳領域で、Otx2 の誘導と Gbx2 の抑制が見られた。また、Fgf8 の発現は峽部で抑制され、後脳領域まで移動した。抗ニューロフィラメント抗体による免疫染色により滑車神経の走行を調べると、遺伝子強制発現側では峽部の他に、後脳領域で異所的な滑車神経の走行がみられたことから、異所的に峽部が作られたことが分かった。

一方、Sprouty2-DN を強制発現し峽部 Fgf8 シグナル活性を強めると、中脳後側境界が前方に移動した。このことは、Wnt-1 の中脳後側境界での発現が前側に移動していることにより確認された。また、Sprouty2-DN 強制発現後の峽部マーカー遺伝子の変化を調べると、中脳領域で Otx2 の発現が抑制され、Gbx2 と Fgf8 の発現が誘導された。

以上の結果から、小脳の分化には、Ras-ERK 経路の強い活性化が必要であり、中脳/後脳境界の位置決定には、峽部 Ras-ERK シグナル経路活性の厳密な調節が関わっていることが示された。

審査結果の要旨

脊椎動物の中脳/後脳境界部（峡部）は、中脳・小脳分化のオーガナイザーとして働き、その本体は分泌性タンパク質 Fgf8 である。Fgf8 はチロシンキナーゼ型受容体を介して伝達されるが、小脳分化には Fgf8 による Ras-ERK 経路の活性化が必要であることが示されている。細胞内シグナル因子 Sprouty は Fgf-Ras-ERK シグナル経路の抑制分子であるが、Fgf8 と重複して発現し、Ras-ERK シグナル経路の活性化によって誘導されることが報告されている。そこで、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いた遺伝子強制発現実験により、峡部 Fgf8 シグナルの調節が峡部形成にどのように働いているのかを調べた。

申請者は、まず峡部 Fgf8 シグナルの調節に Sprouty2 が働いていることを確かめた。Fgf8 を *in ovo* エレクトロポレーション法を用いて強制発現すると、Sprouty2 はわずか3時間で誘導された。また、峡部に Sprouty2 を導入すると、ERK のリン酸化は抑制され、Sprouty2-DN を強制発現すると ERK のリン酸化は増強された。

次に、Sprouty2 を強制発現し、峡部 Fgf8 シグナルを抑制してその影響を調べた。孵卵12日の正常胚では、視蓋と小脳は形態的に区別できる。Sprouty2 を導入すると本来の小脳領域に視蓋様の膨らみが形成された。組織学的にはその膨らみには外顆粒層が見られず、視蓋特有の層構造が見られた。このことから、Sprouty2 の強制発現により、後脳胞の発生運命が視蓋へ変わったことが考えられた。

さらに、Sprouty2 の強制発現が峡部マーカー遺伝子に及ぼす影響を調べると、Sprouty2 導入24時間後、後脳領域で、Otx2 の誘導と Gbx2 の抑制が見られた。また、Fgf8 の発現は峡部で抑制され、後脳領域まで移動した。抗ニューロフィラメント抗体による免疫染色により滑車神経の走行を調べると、遺伝子強制発現側では峡部の他に、後脳領域で異所的な滑車神経の走行がみられたことから、異所的に峡部が作られたことが分かった。

一方、Sprouty2-DN を強制発現し峡部 Fgf8 シグナル活性を強めると、中脳後側境界が前方に移動した。このことは、Wnt-1 の中脳後側境界での発現が前側に移動していることにより確認された。また、Sprouty2-DN 強制発現後の峡部マーカー遺伝子の変化を調べると、中脳領域で Otx2 の発現が抑制され、Gbx2 と Fgf8 の発現が誘導された。

以上の結果から、申請者は、小脳の分化には、Ras-ERK 経路の強い活性化が必要であり、中脳/後脳境界の位置決定には、峡部 Ras-ERK シグナル経路活性の厳密な調節が関わっているという結論を得た。これは脳の形態形成において、オーガナイザーシグナル、そのシグナルトランスダクションさらにその調節機構に関する優れた仕事であり、博士の学位に値するものと判断される。