

論文内容の要旨

申請者氏名 下北 英輔

尾は現存する多くの脊椎動物に見られる大きな特徴の一つである。近年、尾の形成機構は元々存在した体幹の形成機構と多くの点で異なるという報告が数多くなされている。しかしながら、これらの知見の多くは尾を構成する神経管（脊髄となる）及び中胚葉（骨や筋肉を作る）といった組織の違いを区別することなく解析が為されており、未だ数多くの問題点が存在している。よって、本研究では尾の形成過程の中でも特に Secondary neurulation (SN) と呼ばれる神経管形成現象を解析することによって、新たな視点から尾の形成機構を解き明かしていくことを目的とし研究を行った。

SN とはヒトを含めた多くの羊膜類の尾部で起こる神経管形成である。SN では、間充織細胞群が集合し、上皮化するという間充織-上皮転換を経て神経管が作られる。現在のところ、SN に関する解剖学的な知見は複数存在するが、分子レベルでの解析は全くと言っていいほど行われていない。

これまでの組織移植による知見から、尾部領域の神経管は後方神経板に由来し、さらにこの領域の細胞は中胚葉にも分化すると考えられてきた。本論文では新たに PKH（膜リン脂質を染色する）を用いて後方神経板の表層の上皮細胞のみをラベルした結果、それらの細胞は中胚葉へは分化せず、SN を起こす間充織細胞を含む神経管のみに分化することを示した。また、尾部を形成する未分化細胞が如何にして神経管又は中胚葉へと運命決定されるのかを調べた。SN が進行している細胞において発現している遺伝子をデータベースなどを用いて探し、中胚葉になる予定の細胞に発現させた。その結果、転写因子 Pax2 を発現させた場合、本来管構造を作らないはずの中胚葉領域に異所的な管構造が誘導された。また、この異所的な管構造は SN と同様に間充織細胞が上皮化するという過程を経て作られること、及びその上皮化のタイミングが本来の SN と同様であることが分かった。さらには、神経管マーカー Sox2 及び NCAM などが発現していたことから、Pax2 は中胚葉になる予定の未分化細胞を神経系 (SN) へと運命転換させることに十分であることが示された。また、Pax2 の下流において転写因子 Tbx6L の発現が抑制される必要があるという結果を示した。さらに、SN 間充織細胞はどのようにして上皮管構造を作るのかを調べた。SN の進行と共に神経管マーカー Sox2 の発現上昇が見られたため、Sox2 は SN の上皮化に関わっているのではないかと考えた。そこで、Sox2 の優勢阻害因子を SN 細胞に導入すると、これらの細胞の上皮化が抑制され、神経管の外側に排除されるという結果となった。その他、SN とアクチン細胞骨格制御因子 Rho ファミリー (Rac1 と Cdc42) との関係性を優勢阻害因子及び恒常活性因子を用いて調べた。その結果、SN の上皮化には Rac1 のある程度の活性が必要であり、Cdc42 に関しては活性が抑制される必要があることが示された。本研究から得られた知見により、これまで多くの謎を残していた尾部の形成機構の理解が進むことが期待できる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 下北 英輔

申請者は、発生過程において尾部がどのように形成されるのかに興味を持ち、尾部の中でもこれまでほとんど注目されていなかった Secondary neurulation (SN) と呼ばれる神経管形成現象に着目するとことでオリジナルな視点から研究を進めた。

これまでのトリの知見では、SN を起こす間充織細胞は後方神経板に由来し、その後方神経板は中胚葉へも分化することが細胞移植による実験によって示されていた。しかしながら、申請者はより精度の高い細胞ラベル法を用いることによって、後方神経板は、中胚葉へは分化せず SN を起こす間充織細胞を含む神経管へと分化することを示した。また、エレクトロポレーション法によって後方神経板をターゲットとした遺伝子導入を行うことにより SN 間充織細胞特異的な遺伝子操作法を確立した。さらに、この方法を用いて、SN 間充織細胞が神経管構造を形成する際の Rho ファミリーの役割を示した。以上の結果は、申請者が筆頭著者である論文 (Shimokita et al., Developmental Growth and Differentiation, in press) で報告されている。

さらに申請者は、尾部を形成する未分化な細胞がどのようにして外胚葉 (SN) 又は中胚葉へと分化するのかについて研究を行い、極めて新規な知見を得ている。その中でも特に注目すべきなのが転写因子 Pax2 には本来中胚葉になる予定の細胞を外胚葉へと運命変化させ、SN を異所的に誘導する働きがあることを示したことである。この結果は、Pax2 が尾部における神経管の形成を誘導するためのマスター遺伝子であることを意味している。このような器官形成において最も根幹に存在する因子を同定したことは非常に高く評価できる。さらに、過去に報告された Tbx6 欠損マウスに関する知見との関連性にまで研究を広げ、Pax2 がニワトリホモログである Tbx6L を抑制することを介して異所的な SN を誘導することを示した。この研究から得られた結果は、外胚葉と中胚葉といった細胞の運命における最も大きな分岐の分子メカニズムを理解する上での重要な知見となると考えられる。さらには、SN は生体内における新たな神経幹細胞の研究舞台となりうることから、今後多くの研究者がこの SN という現象に注目すると予想される。

以上のように本論文は、申請者が独自に構築した実験系を駆使して、SN 間充織細胞の由来や尾部の未分化細胞の分化機構及び SN 間充織細胞が神経管構造をつくる仕組みについて初めて示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。