

氏名(本籍)	た なか やす こ 田 中 靖 子 (東 京 都)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3185 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	頭部神経冠細胞の可視化および培養技術に関する研究
主査	筑波大学教授 理学博士 久野 節 二
副査	筑波大学助教授 医学博士 玉 岡 晃
副査	筑波大学講師 博士(理学) 小 林 麻己人
副査	筑波大学講師 博士(医学) 三 好 浩 稔

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

神経冠 (Neural Crest) は、脊椎動物に特有な胚組織構造で、神経系発生の初期に神経管 (Neural Tube) とその上層の表皮外胚葉との間に胚の吻尾軸に沿って形成される。神経冠を構成する細胞群は発生が進むにつれ、増殖を繰り返しながら胚内の様々な領域に移動して中枢神経系・頭部骨格系・末梢神経系・副腎髄質・平滑筋細胞・色素細胞等、種々の細胞へ分化することが知られている。しかし、神経冠細胞の増殖、移動、分化のメカニズムについては未知な点が多い。特に、これまで体幹部の神経冠細胞についてはある程度検討されてきたものの、頭部の神経冠細胞については研究例が少なかった。そこで、本研究では頭部神経冠細胞の発生・分化の研究に有用なモデルとして、この細胞に特異的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させることでその動態を可視化できるトランスジェニックマウスの作成を目指した。

### (対象と方法)

頭部神経冠細胞で特異的に GFP 遺伝子を発現させるために、ショウジョウバエ *snail* 遺伝子と相同なマウス遺伝子 *mSna* 遺伝子に着目した。*mSna* 遺伝子は頭部においては神経冠細胞に特異的に、体幹部においてはこの細胞以外に中胚葉組織に発現する。そこで、アフリカツメガエル胚を用いた *mSna* 遺伝子発現に必須の転写調節領域 (プロモーター/エンハンサー配列を含む遺伝子領域) を同定には、*mSna* 遺伝子 5' 上流域のみ、あるいはこれに加えて第 1 イントロンか第 2 イントロンのいずれか、あるいは両者を併せもつ 4 種類のルシフェラーゼまたは GFP・レポーター遺伝子コンストラクトを用いた。これらの遺伝子をアフリカツメガエル胚に注入し、神経冠形成時まで発生させ、ルシフェラーゼ遺伝子発現を測定と GFP 遺伝子発現を検討した。この結果に基づいてトランスジェニックマウスを作製し、系統化した。トランスジェニックマウスから得た 8.5 ないし 10.5 日胚を実体蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡で観察した。そして、GFP 発現を指標として頭部神経冠細胞の培養系を検討した。

### (結果)

*mSna* 遺伝子の発現制御領域に関するアフリカツメガエルを用いた実験では、頭部神経冠領域で強いレポーター遺伝子の発現は、5' 上流域と第 2 イントロンを持つコンストラクトを用いた場合に認められた。この結果に基づ

いて *mSna* 遺伝子 5' 上流域と第 2 イントロン配列の制御下に GFP 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。8.5 から 10.5 日胚の観察では、頭部神経冠領域で GFP 発現細胞を確認でき、これまでの報告と一致して *mSna* 遺伝子発現が認められた。一部の (非神経性) 神経冠細胞の特異的マーカーとして知られる血小板由来増殖因子受容体  $\alpha$  サブユニット (PDGFR  $\alpha$ ) の免疫染色の結果、GFP 発現細胞の多くが神経冠細胞であることが示唆された。GFP 発現が弱く、多くの PDGFR  $\alpha$  陽性細胞が存在する部位と、GFP 発現が強く、PDGFR  $\alpha$  陽性細胞があまり存在しない部位の 2 つの発現部位が確認された。培養系で解離させた GFP 発現を示す頭部神経冠細胞から幹細胞特有の浮遊細胞塊まで増殖させることができた。PDGFR  $\alpha$  免疫染色でこの細胞塊に GFP 発現細胞と PDGFR  $\alpha$  陽性細胞の両者の存在が示された。GFP 発現が弱く、PDGFR  $\alpha$  陽性細胞を多く含む細胞塊と GFP 発現が強く、少数の PDGFR  $\alpha$  陽性細胞しか含まない細胞塊が形成された。

#### (考察)

マウス *mSna* 遺伝子 5' 上流プロモーター配列に加え、第 2 イントロン中の配列がエンハンサーであることをアフリカツメガエル胚で明らかにした。GFP レポーター遺伝子はアフリカツメガエル胚でマウス胚同様、頭部神経冠領域に発現したことは、*mSna* 遺伝子のプロモーター/エンハンサーの DNA 配列をツメガエルの転写因子群が認識したと考えられる。

作成したトランスジェニックマウス胚において、GFP 発現パターンは報告にある *mSna* 遺伝子 mRNA 発現のパターンと類似したが、異なる部位もあった。*mSna* 遺伝子周辺に存在するさらに 5' 上流域、第 1 イントロンおよび 3' 下流域などを用いれば、*mSna* mRNA の発現パターンと一致すると考えられる。しかし、頭部神経冠細胞の特異的標識という目的には、5' 上流域と第 2 イントロンの組み合わせで十分と思われる。今後は多様な分化能を証明するために培養条件を検討する必要がある。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、遺伝子工学により神経冠細胞の発生学的研究に有用なトランスジェニックマウスを作成し、脳形成期における頭部神経冠細胞の動態の *in vivo* および *in vitro* 解析を可能とする技術を確立している。また、培養系で分離した遺伝子導入細胞の増殖に必要な条件検討を行い、貴重な知見を提示している。今後、種々の細胞への分化を人工的に誘導する研究へ発展する可能性を秘めた優れた研究であり、学位論文として高く評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。