

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on the regional specification in the developing brain
脳神経系における領域特異化の機構に関する研究

指導教官 中福 雅人 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士過程

脳神経医学専攻

氏名 小林 大介

【研究目的】

脊椎動物の中樞神経系は、各領域ごとに形態的、機能的に特異化した極めて多様なニューロン、グリアなどの細胞によって構成されている。記憶や学習といった高次機能は、この多様な細胞が厳密な遺伝プログラムに基づいて発生することをその基盤としている。こうした多様な細胞は、発生の早い時期に形成される神経板から発生する。神経板上には領域特異的に多くの転写制御因子と細胞外シグナル分子が発現している。この領域性に基づいて下流の遺伝プログラムが働くことで、さまざまな細胞が特定の位置に形成されると考えられている。こうした神経板の領域特異化に、シグナル分子を介したいわゆる誘導現象が関与していることが知られている。様々なシグナル分子が神経板上に局在して発現しており、その近傍に特定の形質を誘導することで神経板の領域化は進行する。また、神経板はシグナル分子に対して領域特異的な応答をする。例えばシグナル分子 Shh は神経板の腹側から作用し、前脳では視床下部の内分泌性の神経核を、中脳では動眼神経核とドーパミン作動性ニューロンを誘導する。このように神経板上の位置による応答性の違いは、細胞の多様な個性の規定に重要な意味をもっている。従って、神経板のシグナル分子に対する領域特異的な応答性を規定する機構を明らかにすることは、完成された中樞神経系を構成する多様な細胞の形成

過程を理解する上で極めて大切であり、神経科学における重要な課題の一つである。

将来の終脳原基である頭部神経板前方領域ではシグナル分子 Shh に応答して視床下部形成に必須の転写制御因子 Nkx2.1 の発現が、またシグナル分子 FGF8 に応答して終脳形成に必須の転写制御因子 Bf1 の発現が誘導される(前方型の応答性)。一方、頭部神経板のより後方の領域では、Shh に応答して運動神経形成に必要な転写制御因子 Nkx6.1 の発現が、FGF8 に応答して中脳形成に必要な転写制御因子 En2 の発現が誘導されることが知られている(後方型の応答性)。これら異なる応答性を示す境界は、将来の腹側視床と背側視床の境界である Zona limitans intrathalamica (ZLI)であると推定されている。しかしながら、このような領域特異的な応答性を規定するメカニズムの分子的な基盤は明らかにされていない。

本研究では、高次機能を担う大脳皮質、基底核、視床などの発生原基である前脳に注目し、神経板の領域特異的な応答性を規定する分子機構を明らかにすることを目的とした。

【研究結果と考察】

発生期における神経板の領域特異化の過程を個体レベルで明らかにするため、胚操作に種々の利点を有するニワトリ胚を実験材料にし、エレクトロポレーション法を用いた強制発現系を主たる実験手法として解析を行った。

はじめに前脳中脳領域の神経板において、それぞれ異なる応答を引き起こすとされる FGF8 について解析した。FGF8 に対する異なる応答性を規定する機構の一つに、異なる FGF 受容体(FGFR)の関与が考えられる。FGF 受容体には4種類が知られており、それぞれ領域特異的に発現している。このうち FGFR3 は ZLI の後方領域、すなわち FGF8 が En2 の発現を誘導できる領域で発現し、FGFR1 は神経板全域で発現している。そこで、恒常活性化型の FGFR1 と FGFR3 をコードする発現ベクターを作成し、ステージ HH8-10 のニワトリ胚にこれらの変異受容体を強制発現させた。その結果、どちらの恒常活性化型受容体の強制発現でも En2 の異所発現が観察されたが、この異所発現が観察される領域は ZLI の後方領域のみに限られることが明らかとなった。このことから、FGF 受容体の違いでは領域特異的な応答性を説明できないと考えられた。

FGF8 が En2 の発現を誘導できる領域は ZLI の後方に限られる。ホメオドメイン型転写制御因子であるシヨウジョウバエ Iroquois のマウス相同分子 Irx3 は ZLI の後方で発現している。そこで、Irx3 のニワトリ相同分子をクローニングし、その発現領域を詳細に検討した。Irx3 は、HH6 から頭部神経板後方領域に局限して発現を開始した。HH17 で ZLI の分子マーカーである Shh との二重染色を行ったところ、その発現の前端は ZLI に一致していた。そこで、Irx3 が FGF8 に対する後方型の応答性を規定する

可能性を検討した。Irx3 を強制発現させたところ En2 が前方で異所性に発現することが明かとなった。しかも Irx3 遺伝子は広範囲に導入されているにも関わらず、En2 の異所発現は FGF8 発現部位の近傍に限られていた。つぎに、恒常活性化型 FGF 受容体と Irx3 を共発現させると、内在性の FGF8 発現部位から離れた領域でも En2 の発現が誘導された。さらに、ドミナントネガティブ型 FGF 受容体によって FGF シグナルを遮断した場合には、Irx3 による En2 の異所発現は観察されなかった。これらの結果から、Irx3 は後方領域における FGF8 依存的な En2 の発現を制御していることが強く示唆された。

次に、前方領域での FGF8 に対する応答性を解析した。FGF8 を神経板全領域で強制発現させると、視床下部、眼柄などの前方領域では転写制御因子 Bf1 の発現が誘導されるが、後方領域では Bf1 の発現は誘導されないことが明かとなった。Bf1 の誘導が起こる領域と一致して、ホメオドメイン型転写制御因子 Six3 が発現している。そこで、Six3 を中脳後脳を含む後方領域で強制発現させた。Six3 の強制発現によって、中脳後脳境界部でのみ Bf1 の異所発現が観察された。中脳後脳境界部は FGF8 が発現している領域である。さらに、恒常活性化型 FGF 受容体と Six3 を共発現させると内在性の FGF8 発現部位から離れた領域でも Bf1 が誘導されることが観察された。これらの結果は、Six3 が FGF8 に対する前方型の応答性を与えていることを示唆している。また、同様の条件で終脳の分子マーカーである転写制御因子 Emx2 の発現が誘導されることから、誘導された組織は終脳である可能性が高いと考えられた。

領域特異的な応答性は、中枢神経系全域において腹側の形質を与えるシグナル分子 Shh に関しても知られている。前述のように、Shh は転写制御因子 Nkx2.1 を頭部神経板前方領域で誘導し、その後方では転写制御因子 Nkx6.1 を誘導する。この応答性の境界は FGF8 の場合と同様に ZLI と推定されている。このことから Six3 と Irx3 が Shh に対する応答性を制御している可能性を検討した。Six3 と Irx3 の強制発現により、それぞれ Nkx2.1 と Nkx6.1 が異所性に発現した。しかも、この異所発現は Shh の作用する神経板腹側に限られて観察された。これらの結果から、Six3 と Irx3 は標的遺伝子の発現を直接制御しているわけではなく、Shh に対する細胞の応答性を制御していると考えられた。

以上の解析から、発生初期の神経板においては、Six3 と Irx3 という 2 つの転写制御因子が、シグナル分子である FGF8 と Shh に対する領域特異的な応答性を規定している事が示された。そこでこのような初期の応答性の違いが後の神経系の組織構築にどのような関連を持つかを解析した。Irx3 を前方領域で強制発現させた胚を HH38-40 まで孵卵させたところ、正常胚の間脳に相当する部位に異常な腫瘍が観察された。この腫瘍は、中脳に特徴的な層状の組織構築を呈し、また中脳特異的な転写制御因子

Pax7 が発現していた。組織学的に内側手綱核が欠損していること、脈絡膜がこの腫瘤に取り込まれていることを考えると、Irx3 が FGF8 に対する応答性を変化させた結果、予定終脳視床領域が形質転換して中脳の形質を獲得したと考えられた。

【結語】

以上の解析から、神経板で領域特異的に発現している転写制御因子 Six3 と Irx3 が、FGF8 や Shh といった分泌性シグナル分子に対する領域特異的な応答性を規定し、その結果として領域ごとに異なる組織形成と細胞分化が生じることが明らかとなった。今回の結果から、領域特異的な応答性を制御する分子機構についての具体的な実験が可能となった。また、形態学的知見から、従来前脳は前から終脳、間脳とわかれ、間脳から視床下部と視床が形成されると考えられてきた。しかしながら、発生のプログラム上では、間脳中程の境界である ZLI で前方型後方型の応答性を示す領域にわかれ、Six3 発現で規定される前方型の応答性を示す領域に Fgf8 が作用すると終脳が発生し、Shh が作用すると視床下部が発生すると考えられた。前後軸に沿った応答性の違いや、転写制御因子群の発現領域をふまえて考えると、前脳においてはこれまで軸索の通り道として認識されていた ZLI の前後で神経板に決定的な性質の違いがあると考えられる。多様な中枢神経系の細胞が形成される過程に関与する多数の遺伝子が同定されつつあるが、その作用機序の詳細は未だ不明のものが多い。こうした遺伝子の作用機序の解析から発生のプログラムを明らかにしていくことは、高次機能を担う中枢神経系を構成する多種多様な細胞の特性を理解するために有効であろう。