

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 長瀬 敬

本研究は顔面発生・奇形の理解の上で重要と考えられる、頭部神経堤細胞(NCCs)の遊走制御機構の一端を明らかにするため、正常および顔面裂モデルラット (*Pax6* 変異ラット) 初期胚において HNK-1 糖鎖とその合成酵素遺伝子 *GlcAT-P*, *GlcAT-D* の発現および機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 正常ラット胚 NCCs における HNK-1 糖鎖の局在を免疫染色にて、また *GlcAT-P* および *GlcAT-D* 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析した。頭部 NCCs では遊走を終えた脳神経節に HNK-1 糖鎖は局在し、その部位で *GlcAT-D* 遺伝子の発現を認めた。これに対し体幹 NCCs では、遊走開始直後の NCCs に HNK-1 糖鎖は局在し、*GlcAT-P* 遺伝子の発現を認めた。これらの発現パターンの相違は NCCs の頭部・体幹間の差異を反映する可能性が示唆された。

2. 機能的解析として正常ラット胚の全胚培養系において頭部 NCCs に *GlcAT* 遺伝子を導入し、NCCs の遊走の変化の有無を調べた。*GlcAT-P* を導入した NCCs では遊走距離が延長する傾向が、*GlcAT-D* を導入した NCCs では遊走が終止する傾向がそれぞれ観察され、遺伝子サブタイプが NCCs 遊走に異なった様式で影響するものと考えられた。

3. 正常ラット胚において NCCs 以外に、肢芽付近筋芽細胞や中枢神経系にも HNK-1 糖鎖は局在することが判明した。ここでも *GlcAT-P* および *GlcAT-D* 遺伝子の発現パターンは相違を呈し、生体内における両サブタイプの何らかの機能的分担の存在が示唆された。

4. *Pax6* 変異ラットの顔面裂は外側鼻隆起を構成する中脳由来の NCCs の遊走の

阻害により生じるが、その分子機構は不明であった。そこで変異ラット胚での HNK-1 糖鎖および GlcAT 遺伝子の発現を調べたところ、*Pax6* 変異ラット胚の NCCs 遊走阻害部位で、HNK-1 糖鎖および GlcAT-P 遺伝子の異所的な発現を認めた。

5. 正常胚の中脳 NCCs 初代培養系を用いて、NCCs 遊走に対する HNK-1 糖鎖の阻害効果の有無を検討した。その結果、中脳 NCCs の遊走は HNK-1 糖鎖に濃度依存的に阻害される傾向が示された。これらの結果により、*Pax6* 変異ラットの顔面裂は、異所的に局在する HNK-1 糖鎖によって NCCs 遊走が阻害されるために生じる可能性が示唆された。

以上、本論文は頭部 NCCs の遊走制御における細胞表面および細胞外基質の HNK-1 糖鎖修飾の重要性を明らかにした。本研究は顔面形態形成および顔面先天奇形のメカニズムの分子レベルでの解明の上で大きな貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。