

## 論文内容の要旨

### 研究 1

Endothelin-1 (ET-1) はその遺伝子欠損マウスが頭部/心臓神経堤細胞に由来する組織に異常を起こすことから、顎顔面および心大血管の形態形成に重要な因子であることが明らかになっている。しかし、その分子メカニズムは十分明らかにされていない。今回その解明に向けて、遺伝子欠損ホモ接合体 ( $ET-1^{-/-}$ ) の構造を詳細に検討した。

$ET-1^{-/-}$ マウス胎生 18.5 日胚の顎顔面外観を観察すると、下顎の形態は上顎の鏡像形態をとっており、本来上顎のみに存在する洞毛が下顎にも存在した。また骨軟骨染色によると、胎生 13.5 日胚の  $ET-1^{-/-}$ マウスではメッケル軟骨は下顎弓に形成されず、18.5 日胚では下顎骨とは全く形態の異なる骨格が形成された。その要素を形態学的に解析すると、上顎骨・頬骨・口蓋骨・蝶形骨翼部などの上顎骨に由来する骨が重複して下顎側にも形成され、全体として下顎の上顎化が起こっていると考えられた。

さらに、9.5 日胚の *whole-mount in situ hybridization* では、正常下顎弓に認められるホメオボックス型核転写因子 *Dlx5* および *Dlx6* の発現が、 $ET-1^{-/-}$ マウスの下顎弓では検出されなかった。また、 $ET-1^{-/-}$ マウスにおいて、上顎マーカー遺伝子である *Prx2* の発現が正常マウスに比較して増加しているのに対し、下顎マーカー遺伝子である *Pitx1* の発現が消失していた。

以上の結果より神経堤細胞は元来上顎弓としての形質を基底状態としているが、ET-1/ETAR シグナル経路を介した上皮-間葉相互作用が、下顎弓としての形質を誘導すると考えられた。すなわち、ETAR を発現する頭部/神経堤細胞が鰓弓の ET-1 発現領域に遊走し、ここで ET-1/ETAR シグナルによって *Dlx5* および *Dlx6* の発現誘導を受け、第 1、2 鰓弓における腹側領域の特異性を獲得することが示唆された。

## 研究 2

Endothelin-1 の受容体である ETAR 遺伝子プロモーター領域に緑色蛍光蛋白 (Green Fluorescent Protein、以下 GFP) を連結させた ETAR::GFP トランスジェニックマウスの系統を樹立したところ、このうち一系統で内耳形成初期より耳胞腹内側部における GFP の異所性発現が認められた。この部位は蝸牛有毛細胞の予定領域とされており、GFP が内耳幹細胞を含む細胞系譜をコードしている可能性が考えられたため、GFP 発現細胞の分化過程を解析すると共に、GFP 発現に関与していると考えられる遺伝子の同定を試みた。

GFP の発現は、内耳初期発生の開始する胎生 8.5 日胚より、耳胞腹内側部に認められた。その後、出生後期までの GFP 陽性細胞を追跡したところ、出生後 9 日において外有毛細胞および支持細胞を含む蝸牛感覚上皮に分化し、出生後 14 日まで GFP の発現が持続した。即ち、マウス有毛細胞および一部の支持細胞の分化過程を GFP によって可視化できた。胎生 10.5 日胚の組織培養においても、蝸牛の形態形成に対応した GFP の発現が可視化できた。内耳発生において、このような発現動態を示す遺伝子はこれまで報告されていない。

そこで、マウス内耳発生初期段階より有毛細胞および支持細胞に至る分化過程に寄与する新たな遺伝子の同定を目的に、GFP を含む導入遺伝子が挿入された染色体部位を解析した。ゲノム DNA 断片クローニングの結果、マウス第 13 染色体上の MCTP1 遺伝子内部における挿入部位を同定することができた。現段階では、GFP の内耳細胞群での発現をコードする遺伝子の特定は完成していないが、今後の検索によりマウスにおける内耳形成に寄与する原因遺伝子の解明に役立つ事が期待される。