

## 別紙 2

### 論文審査の結果の要旨

論文提出者 相原 祐子

本研究では、研究神経堤細胞の分化制御因子の解析を可能とする ES 細胞から神経堤細胞への分化誘導法を確立し、この方法を応用して新規の神経堤細胞分化制御因子の解析を行っている。

神経堤細胞は脊椎動物に特異的に存在する細胞で、個体を構成する多くの細胞種へ分化することが知られている。このため、神経堤の形成不全に起因する疾患が報告されている。こうした疾患の発症メカニズムの解明や治療法の開発のためには神経堤細胞の分化制御機構の解明が重要であるが、神経堤細胞は一過的に出現する細胞であることからその研究は難しく詳細な分化制御機構については十分に解明されていない。近年、分化制御機構を知るためのモデルとして ES 細胞を用いた分化誘導法が報告されており、論文提出者は、本研究の 1 章で神経堤細胞の分化制御機構の解明を目指して神経堤細胞の分化誘導法の確立を行っている。さらに、2 章では本研究で確立した方法を用いて、神経堤由来組織の疾患と関連する新規の早期神経堤分化制御因子を見出している。

第一章では神経堤細胞の分化制御機構の解析を可能とする神経堤細胞の分化誘導法の確立を目指して、ES 細胞から神経堤細胞の分化誘導条件の検討を行っている。始めに、ES 細胞を用いた分化制御機構の解析を阻害する要因として血清の添加や他の細胞との共培養、細胞塊の形成を想定し、これらを用いない条件で ES 細胞を神経堤細胞へ分化誘導する方法を検討している。化学的既知因子のみで構成される無血清培地中で、培養容器に ES 細胞を単層に接着させて培養する条件として、足場となる接着因子の検討を行った。その結果、ラミニンが無血清单層培養条件下で最も高効率に生存し神経方向への分化に適していることを見出した。次に、この条件下で神経堤細胞への分化誘導因子の検討を行った結果、ES 細胞は FGF2 により神経堤細胞の前段階である原始外胚葉、神経外

胚葉への分化誘導され、この細胞に BMP4 を添加することで神経堤細胞へ分化誘導されることを見出した。これらの結果は、ES 細胞を用いた分化制御機構の解析を阻害する要因を排除し、生体の発生過程に基いた神経堤細胞の分化誘導を可能としており、神経堤細胞の分化制御機構を明確に解析する方法を確立したという点において意義がある。

第二章では、本研究で確立した分化誘導法を応用して、神経堤分化制御因子の解析を試みている。神経堤細胞は、発生中の胚において神経外胚葉と表皮外胚葉の境界領域に形成されるが、そこでどのような因子が神経堤細胞への分化の開始を制御しているのか十分にわかっていない。このような早期の神経堤分化制御因子を解析するため、本研究で確立した分化誘導法を用いて発現量が増加する遺伝子の網羅的解析を行っている。その結果、早期から発現する新規の神経堤分化制御因子を見出した。この神経堤分化制御因子のノックダウン ES 細胞を樹立し、神経堤細胞への分化への影響を解析しており、神経堤細胞への分化に必要なことを明らかにした。また、早期の神経堤領域の観察が容易なアフリカツメガエル胚を用いた時空間的な遺伝子発現解析を行った結果、神経堤形成の早期から神経堤領域で発現していることを見出した。また、博士論文提出者は、文献調査により同定した遺伝子の変異マウスの表現型と神経堤症の症状との類似性を見出している。これらの結果は、1 章で確立した *in vitro* の分化誘導法を用いた網羅的発現解析と *in vivo* の時空間的発現解析を組み合わせることにより、新規の早期神経堤分化制御因子を見出すことを可能としており、これまで解析の進んでいなかった早期の神経堤細胞分化制御機構の解析と神経堤症関連因子の研究への応用の可能性を示した点において意義がある。

本研究は、神経堤細胞の分化制御機構を明確に解析可能な ES 細胞から神経堤細胞への分化誘導法を確立し、神経堤細胞の早期分化制御と神経堤症に関わる新規因子を見出したことから、神経堤細胞の分化制御機構の解明と神経堤形成不全に起因する神経症の研究への応用を可能としたという点で評価できる。従って、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいと認定する。