

## 論文の内容の要旨

論文題目 The role of the homeobox gene *Dlx5* in craniofacial development

(頭蓋顔面形成における*Dlx5*の役割)

氏名 清水 美希

神経堤細胞は神経管と外胚葉の境界領域から出てくる幹細胞集団で、骨や軟骨、平滑筋や色素細胞、神経細胞などの体中の様々な細胞に分化し体を形成する。したがって、神経堤細胞の異常は頭蓋顔面や腸管神経系、心臓の異常をもたらす。

頭蓋顔面の発生において、咽頭弓領域に遊走してくる神経堤細胞で *Dlx* 転写因子が発現し、それによって背腹軸に沿った領域性が決定され神経堤細胞は正しく分化することができる。

*Dlx5* は腹側を特徴付ける因子であり、第一鰓弓の *Dlx5* が発現しない領域は上顎に、発現する領域は下顎になることが知られている。*Dlx5* はエンドセリンシグナリングの下流に位置し、エンドセリン A 型受容体 (*Ednra*) を発現する神経堤細胞がエンドセリン 1 (*Edn1*) を発現している下顎領域に遊走することによりエンドセリンシグナルが ON になり、*Dlx5* が発現する。所属研究室において、*Edn1* をノックアウトしたマウス(*Edn1*<sup>-/-</sup>マウス)では下顎が上顎に、*Edn1* を全ての神経堤細胞で発現させたマウス(*Ednra*<sup>Edn1/+</sup>マウス)では上顎が下顎になることを報告している。

*Dlx5* による背腹軸の形成メカニズムを分子レベルで明らかにするために、全ての神経堤細胞で *Dlx5* が過剰発現するマウスを樹立した。まず、変異を入れても生存や生殖に影響せず、全身で発現する *Rosa26* 領域に CAG プロモーター、LoxP 配列に挟まれた STOP 配列と FLAG タグ付きの *Dlx5* の配列を挿入することにより *ROSA*<sup>CAG-flox-Dlx5/+</sup>マウスを得た。次に *ROSA*<sup>CAG-flox-Dlx5/+</sup>マウスと神経堤細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Wnt1::Cre* マウスをかけ合わせることによって神経堤細胞特異的 *Dlx5* 過剰発現マウス(NCC-*Dlx5* マウス)を得、これを解析に使用した。

NCC-*Dlx5* マウスでは、本来 *Dlx5* が発現しない上顎領域に *Dlx5* が発現するため、上顎の一部が下顎様の構造(歯骨、メッケル軟骨)に変化していた。上顎領域において、*in situ*

hybridization により *Dlx5* の下流とされる下顎特異的な遺伝子(*Dlx2*, *Dlx3*, *Gooseoid*, *Hand2*, *Pitx1*)の発現が上昇していることを示し、遺伝子発現パターンが下顎のようになっていることを確認した。

一方で、*NCC-Dlx5* マウスにおいて上顎領域において下顎遺伝子が発現しているにもかかわらず構造変化が部分的であり(上顎要素である頬骨や鼻毛(vibrissae) が残存)、また、*Ednra*<sup>Ednl/+</sup>マウスと比較して *NCC-Dlx5* マウスの上顎領域における下顎遺伝子の発現は高いにもかかわらず、構造変化は小さかった。これを説明するためにマイクロアレイ解析を行い、遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。その結果、*NCC-Dlx5* マウスの上顎領域において下顎特異的な遺伝子(*Dlx5*, *Dlx6*, *Hand2*, *Gbx2*, *Gsc*, *Alx3*, *Cited1*, *Pitx1*, *Dlx6as1*, *Dlx1as*)の発現が上昇している一方で、上顎特異的な遺伝子(*Pou3f3*, *Foxl2*, *Cyp26a1*, *Irx5*, *Tmem30b*, *2610017109Rik*)の発現が野生型のマウスの発現量と変化がないことが明らかとなった。

以上のことから、形態的なトランスフォーメーションが部分的であることの理由として、いくつかの可能性が考えられた。まず一つには、下顎特異的遺伝子プログラムは動いているものの、上顎特異的遺伝子プログラムも動いていることにより一部しか構造変化しないというものである。ゼブラフィッシュにおける先行研究では、**Jagged-Notch** シグナルが上顎への分化を促進し、下顎への分化を抑えること、**Jagged-Notch** シグナルとエンドセリンシグナルは拮抗していることが知られている。このことから、上顎プログラムを抑制するには異所性に発現させている *Dlx5* の発現だけではなく、他の因子が関与していることが予想される。二つめは、*Dlx6* の発現が上顎プログラムを抑制するのに必要という可能性である。*Dlx5* と *Dlx6* は非常に類似した転写活性を持っていて鰓弓の形態形成において高いリダンダンシーを示す。一方で *Dlx5* と *Dlx6* の違いは明らかにされていない。さらに三つめの可能性は、エンドセリンシグナルの下流に *Dlx5* ではない他の経路が存在し、それにより上顎プログラムが抑制されるというものである。これは、*Ednra*<sup>Ednl/+</sup>マウスでは上顎が下顎様の構造に大きく変化したが、*NCC-Dlx5* マウスではトランスフォーメーションが一部にとどまったことから示唆される。

本研究によって、確かに *Dlx5* が背腹軸に沿った領域形成に寄与していることを明らかにし、さらに上顎のプログラムの抑制には *Dlx5* ではない他の分子が関与することが示された。