

審査の結果の要旨

氏名 清水 美希

本研究は、頭蓋顔面の背腹軸に沿った領域性の決定において中心的な役割を果たしている *Dlx* 転写因子の1つである *Dlx5* の必要十分性を明らかにするために、*Dlx5* を神経堤細胞特異的に異所性発現させたマウスを作成し、その形態や遺伝子の発現変動を見ることにより、下記の結果を得ている。

1. *Rosa* 領域に *CAG-flox-Dlx5* 配列を相同組換えで挿入することにより *Rosa*<sup>*CAG-flox-Dlx5/+*</sup>マウスを作成し、*Wnt1::Cre* マウスと交配して得た *NCC-Dlx5* マウス(*Dlx5* を神経堤細胞特異的に異所性に発現するマウス)の形態を観察した。外見は口蓋裂や洞毛の列の乱れが観察され、骨軟骨染色からは上顎要素の骨格が下顎様に変形していることから、上顎が下顎化していることが考えられた。一方で、骨軟骨染色の観察から上顎要素の骨格も一部残存していることが確認された。以上のことから、上顎の下顎化は部分的であることが示された。
2. さらに骨軟骨染色の観察から、頭蓋冠の大泉門において骨の過形成や軟骨の過形成を認めた。*Dlx5* は、骨や軟骨の形成促進因子としての機能があることが現在までに *in vitro* の実験から示されている。*NCC-Dlx5* マウスにおいて、*in vivo* で *Dlx5* の骨・軟骨の形成促進因子としての機能することを示した。
3. *Dlx5* の下流遺伝子の発現を Whole-mount *in situ* hybridization によって検討した。上顎弓・下顎弓・第2鰓弓の全てで発現する *Dlx2* の発現は変化しないが、下顎弓マーカーである *Gooseoid* や *Hand2* などの遺伝子は *NCC-Dlx5* マウスの上顎弓でも発現がみられた。このことから *NCC-Dlx5* マウスの上顎弓において、異所性の *Dlx5* の発現により下顎の遺伝子プログラムが誘導されたことが示された。
4. Microarray によって遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。コントロールの上顎弓と *NCC-Dlx5* マウスの上顎弓の遺伝子発現を比較すると、*NCC-Dlx5* マウスの上顎弓において下顎のマーカー遺伝子の発現が上昇し、また上顎のマーカー遺伝子の発現は多少の減少は見られるがコントロールと変わらない程度の発現が見られた。このことから、*NCC-Dlx5* マウスの上顎弓において上顎プログラムが変わらず動き続け、さらに下顎プログラムも動いているという状況ができていたことが明らかとなった。以上のことから、*NCC-Dlx5* マウスの上顎の下顎化が部分的であるのは、上顎プログラムも下顎プログラムも機能していることによると考えた。また、*Ednra*<sup>*Edn1/+*</sup>マウスとの比較により、エンドセリンシグナルの下流に上顎

プログラムを抑制する経路が別に存在することを強く示唆した。

5. 本研究でおこなった microarray の結果と所属研究室で以前行われた *Dlx5/6* KO マウスの microarray の結果を比較すると、予想通り NCC-*Dlx5* マウスの上顎弓で発現上昇する遺伝子は *Dlx5/6* KO マウスの下顎で発現低下する遺伝子とほぼ一致する一方で、NCC-*Dlx5* マウスの上顎級で発現低下する遺伝子は *Dlx5/6* KO マウスの下顎で発現上昇する遺伝子はほぼ一致しなかった。このことから、領域によって *Dlx5* による遺伝子の発現制御は変化することが示唆された。
6. さらに、以前所属研究室で示されていた、頭尾軸に沿った領域性を決定する *Hox* と背腹軸に沿った領域性を決定する *Dlx* のクロストークについても検討した。NCC-*Hoxa2* マウスの microarray の結果を用いて NCC-*Dlx5* マウスと *Dlx5/6* KO マウスの結果と比較することにより、*Dlx5* と *Hoxa2* がクロストークし、共通する下流遺伝子の発現を制御することを示した。

以上、本論文は背腹軸に沿った領域性の決定において *Dlx5* が背側(上顎)を腹側(下顎)化するためには上顎プログラムを抑制するシグナルが必要であることを示し、さらに *Ednra*<sup>Edn1/+</sup> マウスとの比較からエンドセリンシグナルの下流に *Dlx5/6* のシグナル以外の上顎プログラムを抑制するシグナルが存在する可能性を示した。また、所属研究室において示されていた *Dlx* と *Hox* のクロストークについてもそれを支持する知見を得た。したがって、学位の授与に値するものと考えられる。