

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	范海明
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
<p>論文題目</p> <p>From the primitive streak to the somitic mesoderm: labeling the early stages of chick embryos using <i>EGFP</i> transfection          (原条から体節中胚葉へ：初期発生段階のニワトリ胚の <i>EGFP</i> 遺伝子導入による標識)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主査 教授 相澤 秀紀 印</p> <p>審査委員 教授 工藤 美樹</p> <p>審査委員 教授 田代 聡</p>			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>中胚葉は原条から陥入する細胞によって形成される。骨や筋の原基である体節中胚葉の発生由来について、時空間的な解析がなされてきた。Sawada &amp; Aoyama (1999) は、ニワトリおよびウズラ胚で、原条の各領域を DiI で標識し、その発生運命を追跡した。その結果、発生段階が進むにつれ原条はより尾方の体節を産み出すことが分かった。しかし、DiI による標識は、その頭側の境界は明瞭であったが、尾側に向かうにつれ徐々に消失した。これは二通りに説明できる。一つはある時期の原条は特定の限られた領域の体節を産み出す。もう一つは、その時期の原条は、実際にはもっと尾方の体節まで産み出しているのだが、胚の細胞分裂により最初に標識された DiI がだんだん希釈されてしまうために尾方のものは検出不可能になってしまった、というものである。今回、この二つの可能性のいずれが正しいかを調べるために、導入遺伝子が導入細胞内でゲノムに組み込まれ永続的に発現し続けるシステムを用いて、<i>EGFP</i> 遺伝子を原条の細胞に導入し、その発生を追跡した。</p> <p>ニワトリ胚に卵殻内で遺伝子を導入した。<i>EGFP</i> 遺伝子 (pT2K-CAGGS-EGFP) をトランスポゼース遺伝子 (pCAGGS-T2TP9) と共に、エレクトロポレーション法により導入した。これにより、<i>EGFP</i> 遺伝子はトランスポゾンとしてゲノムに組み込まれ、導入細胞が永続的に標識できるようになった。</p> <p>先端をとがらせたタングステン電極を用いることにより、原条の予定体節領域である頭側原条に局限して遺伝子を導入することができた。このことを確認するため、エレクトロポレーション後、8時間、24時間で胚を観察し、その結果、頭側原条、体節中胚葉にのみ <i>EGFP</i> の発現が見られた胚のみを細胞追跡に用いた。</p> <p>エレクトロポレーションによる傷害の有無を調べるため、導入後、すぐに固定し組織検査した。遺伝子導入領域を切片で見ると、上皮の欠損は見られなかった。この結果から、遺伝子導入された細胞</p>			

は胚盤葉上層の上皮のみと考えられた。また、遺伝子導入8時間後 *EGFP* 陽性細胞は原条内部の間充織中に見られ、上胚盤葉上皮には認められなかった。以上のことは、*EGFP* で標識された胚盤葉上層細胞は、その後8時間以内に陥入したことを示している。

HH 発生段階6から8体節期(HH 発生段階9)までの各発生段階で頭側原条に *EGFP* 遺伝子を導入した。2.5日胚に達したところで *EGFP* の発現を蛍光実体顕微鏡で観察し、標識された最も頭側の体節番号を記録した。*EGFP* 遺伝子導入する胚の発生段階がより後期になるにつれ、標識体節の頭側の境界はより尾方のものとなった。この結果は以前に行ったDiIの標識実験と一致している。すなわち、発生段階が進むにつれ、原条はより尾方の体節を形成することが再確認できた。

*EGFP* による標識がDiI標識と異なる点は、*EGFP* の発現が、どの発生段階で標識しても常に尾芽の先端まで見られ、さらに二次神経管も標識されたことである。4.5日胚になるまで孵卵を続けたところ、導入遺伝子は最も頭側の境界から最尾部までほぼ同程度に発現しており、すべて尾芽まで達していた。このことは、以前のDiI標識実験ではDiIが細胞分裂により希釈されたため、最後まで追跡できなかったことを示している。

尾芽領域の横断切片では、体節中胚葉細胞と共に神経管にも *EGFP* 陽性細胞が認められた。この尾芽から形成される神経管は二次神経管と考えられるので、それを明らかにするために、ヘンゼン結節に *DsRed* を、頭側原条に *EGFP* を導入した。形成された神経管において、*EGFP* の発現細胞の頭側境界は第27体節位であった。横断切片で観察すると背腹にふたつの管腔が見られる部位があり、そこでは、*DsRed* の発現は腹側神経管で見られ、*EGFP* の発現は背側神経管で見られた。これらのことから、頭側原条から形成された神経管は二次神経管と認められる。以上のように、今回の原条標識では、体節中胚葉のみならず二次神経管も標識されたが、これは、体節中胚葉と神経管との共通幹細胞である体軸幹細胞 (Takemoto et al., 2011) が原条にあり、それも標識されたためであると考えられる。

以上の結果から、本論文は、ニワトリ胚原条の細胞系譜を発生より後期の段階まで追跡することにより、原条頭側部が体節中胚葉の全て、および二次神経管の原基であることを明らかにした。これは、軸骨格および中枢神経系という、脊椎動物の基本体制の形成に関わる研究の基礎となるものであり、解剖学および発生生物学に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	范海明
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 From the primitive streak to the somitic mesoderm: labeling the early stages of chick embryos using <i>EGFP</i> transfection (原条から体節中胚葉へ：初期発生段階のニワトリ胚の <i>EGFP</i> 遺伝子導入による標識)			
最終試験担当者			
主査	教授	相澤 秀紀	印
審査委員	教授	工藤 美樹	
審査委員	教授	田代 聡	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年2月1日の第73回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年2月2日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1 ニワトリ胚を用いたこの実験系の、ほ乳類胚への適用の可否			
2 原条から体節中胚葉に至る発生過程の異常が引き起こす表現型			
3 DiI 標識法, EGFP 標識法, それぞれの長所, 短所			
4 トランスポゼースの導入法			
5 遺伝子導入を頭側原条に限局する方法			
6 標識細胞の同定法			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			