OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Nodal antagonists regulate migration of the visceral endoderm along the future anteroposterior axis of the mouse embryo
Author(s)	山本, 正道
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/45368
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	山本正道（やまもとまさみち）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 18556 号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Nodal antagonists regulate migration of the visceral endoderm along the future anteroposterior axis of the mouse embryo （Nodal 阻害因子がマウス胚の前後軸に沿って visceral endoderm の移動を制御している）
論文審査委員	（主査） 教授 濱田 博司 （副査） 教授 近藤 寿人　教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

【目的】マウス発生段階において前後（頭尾）軸形成は重要なボディープラン現象の一つである。形態的に前後の区別が確認できるようになるのは受精後 6.5 日（6.5 日胚）である。遠近軸に沿って放射相称性を示す胚の将来後（尾）部側になる部分に原条が形成されるのである。しかし、これに先立ち分子レベルでは遠位臓側内胚葉（DVE）/前側臓側内胚葉（AVE）が前後軸形成に必須の役割を果たすことが明らかになっている。ホメオボックス遺伝子 ***Hex*** を発現する DVE は 5.5 日胚において胚遠位端に位置し、原条形成が開始される 6.5 日胚にかけて将来の胚前方に移動し AVE となる。Lefty1、Cerberus-related といった Nodal シグナルを抑制する分泌因子（Nodal 阻害因子）が AVE で発現している。これらの阻害因子はエピブラストに作用し、それまで胚体全体で発現していた Nodal を後側へ限局させる。このことにより前側エピブラストは将来の頭部を形成し、後側エピブラストは原条を形成する。

このように AVE がエピブラストに作用していることはわかってきたが、DVE がどのようにして将来の前側を決定して移動していくのかは未だに解明されていない。本研究ではこの疑問を解明する。

【方法ならびに成績】前後軸形成が行われる間（5.5 から 6.5 日胚）での Nodal 阻害因子の発現パターンを whole mount *in situ* hybridization 法を用いて詳細に調べた。すると ***Hex*** を発現する DVE がまだ遠位端に存在する時点で既に Nodal 阻害因子の ***Lefty1*** と ***Creberus-related*** の発現は臓側内胚葉の遠位で一方向に偏いていた。

まず、この一方向に偏いている Nodal 阻害因子が DVE の移動方向を決定しているのかを調べた。DVE が移動し始める以前の 5.2 日胚を用いて遠位端近傍の臓側内胚葉側面に様々な遺伝子を異所発現させ、DVE が移動し終わる 6.5 日胚まで *in vitro* で培養を行い異所発現させた部位と DVE が移動した部位（前側）の関係を調べた。コントロールの GFP のみを発現させても発現部位と前側との関係はランダムであった。しかし、***Lefty1*** と ***Creberus-related*** を共発現させると発現させた部位はほとんど前側と一致した。また、***Nodal*** を発現させると発現させた部位はほとんど前側以外となった。これより Nodal 阻害因子の一方向への傾きが DVE の移動方向を決定していることが明らかとなった。

次に前側を決定した後にどのように DVE は移動していくのかを調べた。まず細胞増殖を BrdU 取り込み実験法を

用いて詳細に調べた。DVE が移動を行う直前の 5.5 日胚では細胞増殖は対称であったが、DVE の移動が始まる 5.7 日胚以降になると細胞増殖は DVE の位置で抑制され、胚の前後軸に沿って前側では抑制され、後方では促進させていると言った非対称であった。一方、DVE 移動がおこらない Nodal シグナルの変異マウス胚ではこの細胞増殖の非対称性は観察されなかった。これより細胞増殖の前後軸に沿った非対称性が DVE を一方向に移動させる原動力になっていると示唆された。

そこで、この細胞増殖の非対称性を形成しているものが Nodal とその阻害因子である事を確かめるため、これら遺伝子を異所発現させた臓側内胚葉の増殖率を調べた。予想通り Nodal は細胞増殖を促進させ、その阻害因子は細胞増殖を抑制した。

細胞増殖と DVE の前側への移動を更に裏付けるため、細胞増殖促進因子 Cdk2 と細胞増殖を抑制するドミナントネガティブ型 Cdk2 を用いて同様の異所発現実験を行った。すると Nodal やその阻害因子より効力は弱いが Cdk2 を異所発現させた臓側内胚葉は前側以外、ドミナントネガティブ側 Cdk2 を異所発現させた臓側内胚葉は前側になる傾向が得られた。

最後に前後軸形成期における *Lefty1* と *Creberus-related* の二重変異マウスを調べた。このマウス胚では Nodal 阻害因子が欠損しているため *Nodal* の発現が亢進しており、そのため細胞増殖も亢進し、DVE の移動時期が遅れていた。時期が遅れながらも移動した理由としては DVE で野生型では発現しない Nodal 阻害因子の *Lefty2* が異所発現し、細胞増殖を DVE で抑制したためと考えられた。

【総括】Nodal 阻害因子が遠位端から一方向へ傾いている事により DVE の移動方向を決定している。また Nodal 阻害因子が Nodal シグナルを抑制する事によって、前後軸に沿った非対称な細胞増殖を引き起こし DVE を移動させていることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

マウス発生段階において前後（頭尾）軸形成は重要なボディープラン現象の一つである。分子レベルでは遠位臓側内胚葉（DVE）/前側臓側内胚葉（AVE）が前後軸形成に必須の役割を果たすことが明らかになっている。DVE は受精後 5.5 日胚において胚遠位端に位置し、原条形成が開始される 6.5 日胚にかけて将来の胚前方に移動し AVE となる。しかし、DVE がどのようにして将来の前側を決定して移動していくのかは未だに解明されていなかった。

今回の研究によって、Nodal 阻害因子が遠位端から一方向へ傾いている事により DVE の移動方向を決定しているが明らかとなった。また Nodal 阻害因子が Nodal シグナルを抑制する事によって、前後軸に沿った非対称な細胞増殖を引き起こし DVE を移動させていることが明らかになった。

この研究はマウスの前後軸形成メカニズム解明に大きく貢献し、生物学に大きなインパクトを与え、Nature 誌に掲載されることに至ったため、この研究は学位の授与に値するものと認める。