

# 学位論文抄録

脊椎発生における脊索と神経管底板の役割に関する解析

(Examination of the role of the notochord and floor plate during the spinal  
development)

安藤 卓

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

指導教員

水田 博志 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻運動骨格病態学

## 学位論文抄録

【目的】脊索は脊椎発生の中心的役割を担当する。特に脊索は神経管より底板を発生させるだけでなく、底板とともに脊椎形成の母床となる体節を分化させ椎板(中軸骨格の直接的な原基)に誘導させることが知られている。しかし、「脊椎発生にいつまで脊索が関与しているのか?」、「椎板発生に脊索と底板のどちらが主に作用しているのか?」という疑問に対して、これまで明確に説明している文献は認めない。我々研究グループの先行実験で得られた、一度発生した脊索が早期に消失するものの、上位底板は発生し、下位脊椎の欠損を示す *Danforth's short-tail (Sd)* 変異マウス胚の表現型に注目した。本研究の目的は、*Sd* 変異ホモ接合体が示す「脊索は一度発生した後消失するが上位底板は誘導される」という表現型を利用する事で、脊椎発生における脊索と神経管底板の役割を明らかにすることである。

【方法】*Sd* 変異のヘテロ接合体胚、ホモ接合体胚を見分けるため、*Sd* ゲノム変異領域に隣接(0.95cM 下流)している *Skt<sup>Gt</sup>*(我々の研究室でジーントラップ法により得られた変異)をサテライトマーカーとして PCR 法による *Sd* 変異胚の genotyping に使用した。また、*Skt<sup>Gt</sup>* は脊索のレポーター遺伝子としても利用可能であるため、X-gal 染色によって *Sd* 変異胚の脊索細胞の検出に使用した。解析に使用する wild type, *+/+/-Skt<sup>Gt</sup>*, *Sd-/+/-*, *Sd-Skt<sup>Gt</sup>/+/-*, *Sd-Skt<sup>Gt</sup>/+/-Skt<sup>Gt</sup>*, *Sd-+/Sd+*, *Sd-Skt<sup>Gt</sup>/Sd-Skt<sup>Gt</sup>* 胚を交配で作出した。骨格標本は胚生 18.5 日胚を用いて作製した。胚生 9.0, 10.0, 10.5 日胚の脊索、体節、神経管底板、椎板発生を、各種分子マーカーを使用した *in situ* hybridization (ISH)法により検討した。

【結果】*Sd* ホモ接合体は第 6 胸椎以下、*Sd* ヘテロ接合体は第 6 尾椎以下の中軸骨格が欠失していた。*Sd* ホモ接合体胚は E9.5 までに脊索が消失することがわかった。体節マーカー: *Uncx*、*Paraxis*、脊索、神経管底板マーカー: *Shh*、椎板マーカー *Pax1* を使用した ISH 法によって、ホモ接合体胚の底板における *Shh* 発現は、第 17 体節レベル以下で消失し、椎板における *Pax1* の発現は第 17 体節レベル以下で消失していた。体節における *Uncx* 発現には明らかな異常を認めなかった。このことは、*Sd* 変異胚の体節発生は正常であることを示している。また、いったん誘導された底板は脊索消失後も *Shh* を分泌し続けることがわかった。加えて、底板発生領域(ホモ接合体: 第 6 胸椎レベルまで、*Sd* ヘテロ接合体: 第 6 尾椎レベルまで)で椎板の誘導が起こっていることも明らかになった。その底板、椎板発生領域は、脊索が消失する時期に発生した体節の領域と一致していた。

【考察】*Sd* ホモ接合体胚でみられた下位脊椎欠損の原因は、体節から椎板への分化異常に先行した脊索消失を起因とした底板の誘導不全にあることがわかった。また、*Sd* 変異胚で誘導された底板の領域・椎板の領域は、形成された中軸骨格の椎体領域と一致していた。このことは、一度誘導された底板は単独で脊椎発生が可能であることを強く示唆している。

【結論】本研究結果は、脊椎発生において脊索は、底板誘導時期まで関与しており、底板を誘導した後は主に脊椎発生の中心組織は底板になる事を示している。