

FGFR2 を一例として挙げると、発生ステージ9の胚において、FGFR2b リボプローブは中脳-後脳予定領域にのみ限局した発現を認め、FGFR2c リボプローブでは中脳-後脳予定領域のみならず、神経管全体、頭部中胚葉そして前腸領域にシグナルを検出した。さらに FGFR1c と FGFR2c との塩基配列の相同性は 82% と非常に高いにもかかわらず、間脳や眼胞におけるこれら遺伝子の発現パターンは明確に異なっている。これらの結果から、本研究で開発されたりボプローブがそれぞれの FGFR アイソフォームの発現を特異的に認識でき得るものと考察される。

#### 〔結論〕

本研究では、6種類すべての FGFR アイソフォーム群の選択的スプライシング領域の DNA 断片を単離した。この領域の塩基配列を基に開発されたりボプローブは WISH 法での FGFR アイソフォームの発現部位の検出に有効である。

### 論文審査の要旨

本研究では、初期ニワトリ胚を用いて6種類にも及ぶ FGFR アイソフォームの網羅的遺伝子発現パターンが報告されている。この研究を進める上で、著者は6種の FGFR アイソフォームそれぞれに対して、特異的に認識するリボプローブを独自の系を用いて開発しており、実際に本論文中で、これらのリボプローブが WISH 法にて、極めて効果的に機能することを示している。本研究は世界で最も注目される細胞内シグナル伝達因子の一つである FGF シグナルに対する詳細な基礎研究であると位置づけられる。また得られた研究成果は、国内外の類似の研究と比較しても、技術的レベル・知見の重要度は高く、今後の一層の研究の展開が期待される。さらに、本研究で得られた基礎的知見と FGFR ノックアウトマウスの機能的解析から得られる研究成果をまとめることで、胚発生における FGF シグナルの役割の全体像が明らかになると期待される。

これらの点で本論文は価値がある。

15

氏名	廣井敦子
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第2692号
学位授与の日付	平成23年9月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	<b>Roles of fukutin, the gene responsible for Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, in neurons: possible involvement in synaptic function and neuronal migration</b> (福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子 fukutin の神経細胞における役割: シナプス機能と遊走への関与)
主論文公表誌	Acta Histochem Cytochem 第44巻 第2号 91-101頁 2011年
論文審査委員	(主査) 教授 柴田 亮行 (副査) 教授 江崎 太一, 石郷岡 純

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: FCMD) は、中枢神経や眼の形成異常を伴う遺伝性疾患で、原因遺伝子はフクチンである。FCMDの病態には、細胞外蛋白質である $\alpha$ -ジストログリカン (dystroglycan: DG) の糖鎖修飾低下による基底膜の脆弱性が深く関与し、フクチンは $\alpha$ -DGの糖

鎖修飾に関与していることが指摘されている。中枢神経では、フクチンおよび $\alpha$ -DGは星状膠細胞と神経細胞に発現している。FCMDの中枢神経主病変である数石状滑脳症は、星状膠細胞におけるフクチンの発現低下および $\alpha$ -DGの糖鎖修飾低下により中枢神経表面の基底膜が脆弱化し、グリア境界膜が破綻することにより生じる。一方、神経細胞においてフクチンは、遊走やシナプス機能に関与する可能性が示唆されているが、詳細は未解明である。本研究では、ヒト脳灰白質の部位によるフクチン発現レベルの違いや、神経細胞の成熟に伴う発現の変化を検討し、神経細胞におけるフクチンの機能を考察した。

#### 〔対象および方法〕

病理解剖で得られたFCMD症例、非神経疾患胎児例および成人例の脳組織を用いて、リアルタイムPCRによりフクチンとDGのmRNA発現量を定量し、免疫組織化学によりフクチンと $\alpha$ -DGの発現様式の違いを検討した。また、培養神経細胞を分化誘導し、リアルタイムPCRによりフクチンとDGのmRNAの発現量の変化を検討し、培養神経芽細胞腫細胞に対して、RNAiによりフクチンをノックダウンして、形態学的変化を観察した。

#### 〔結果〕

成人脳灰白質では、各部位でのフクチンとDGのmRNA発現傾向は類似し、小脳におけるフクチン発現量が有意に多く、免疫組織化学的に、大脳皮質と比較して小脳、視床および延髄で、フクチンと糖鎖修飾 $\alpha$ -DG陽性神経細胞が多かった。糖鎖修飾 $\alpha$ -DGは、プルキンエ細胞の細胞体を縁取る点状の陽性像を示した。FCMD大脳では、DG mRNA発現量は増加傾向を示した。胎児大脳では成人大脳と比較してフクチン mRNAの発現量が多く、免疫組織化学的に、糖鎖修飾 $\alpha$ -DG陽性像は遊走前と遊走中の神経細胞に明らかであったが、遊走後の神経細胞では減弱していた。培養神経細胞を成熟させると、フクチン mRNA発現レベルは有意に低下した。フクチンノックダウンにより、培養神経芽細胞腫細胞の神経突起の延長が観察された。

#### 〔考察〕

神経細胞がフクチンと糖鎖修飾 $\alpha$ -DGを共に発現し、その発現傾向が類似していたことは、神経細胞におけるフクチンと $\alpha$ -DGの密接な関連性を示す。これらの物質の発現様式は神経細胞の種類により異なっており、とくにプルキンエ細胞における糖鎖修飾 $\alpha$ -DGの点状陽性像はシナプス局在を想起させることから、フクチンが $\alpha$ -DGを介してシナプス機能に関与している可能性が指摘される。胎児大脳神経細胞における糖鎖修飾 $\alpha$ -DGの局在様式は、フクチンが $\alpha$ -DGを介して神経細胞の遊走に促進的に作用することをうかがわせる。フクチンが未熟な神経細胞により多く発現していた事実は、遊走中の神経細胞の分化抑制における本物質の関与を示唆する。

#### 〔結論〕

フクチンと $\alpha$ -DGは、筋組織のみならず神経細胞においても密接に関連し、成熟神経細胞においてはシナプス機能に、未熟神経細胞においては遊走促進や分化抑制に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

本論文は、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の原因遺伝子で $\alpha$ -Dystroglycan ( $\alpha$ -DG) の糖鎖修飾に関わる *Fukutin* に注目し、神経細胞における遺伝子産物の局在と機能を明らかにするため、剖検脳と培養細胞を用いて形態学および定量的手法により解析したものである。*Fukutin* 遺伝子産物の発現は、胎児脳の遊走期神経細胞で上昇していたのに対し、成人脳の神経細胞では低下していた。FCMD脳では *Fukutin* 蛋白の低発現とこれに対する代償性の総 $\alpha$ -DG蛋白の強発現が観察された。培養神経芽細胞を分化誘導すると *Fukutin* mRNA の発現量が低下し、培養神経芽細胞を *Fukutin* RNAi で処理すると神経細胞への分化の指標である神経突起の伸長が生じた。以上から、本研究は発生段階の神経細胞の遊走と分化における *Fukutin* の関与を明らかにした点で、学位論文に値すると評価される。