

〔図1〕ES細胞相同組み換えによる $msi1$ 遺伝子破壊

野生型 $msi1$ 遺伝子アレル(上段)、ターゲティングベクター(中段)、変異型野生型 $msi1$ 遺伝子アレル(下段)。野生型 $msi1$ 遺伝子の開始コドンを含む4つのエクソン(黒いボックスで表示)をネオマイシン耐性遺伝子で置換し、5'相同領域として1.5kb、3'相同領域として9.4kbの $msi1$ ゲノムDNAを両端に有する置換型ターゲティングベクターを構築した。positive selection マーカー遺伝子として $pgk-1$ promoter 制御下のネオマイシン耐性遺伝子(Neo)、negative selection用に MCI promoter 制御下でDT-A(diphtheria toxin A-fragment)を付加した。XbaIおよびEcoRV消化した組み換えES細胞ゲノムに対して、5'プローブおよびneoプローブを用いてSouthern解析を行い、図に示した各断片のサイズ変化を基に、 $msi1$ 遺伝子に相同組み換えを起こしたES細胞を同定した。X, XbaI; E, EcoRV; Xh, XhoI; N, NotI; S, Sall; H, HindIII. BSK; plasmid vector Bluescript.

ついて、部位別に採取した組織片を2.0%グルタルアルデヒド、2%パラホルムアルデヒドで固定、2%オスミウム酸、酢酸ウラン処理後、脱水、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製し、透過電子顕微鏡により観察した。 $msi2$ 遺伝子の単離、抗体作製

$msi1$ cDNA⁷⁾ およびRT-PCRにより得た $Xenopus$ $xrp-1$ cDNAをプローブとしてマウス小脳およびE12.5マウス胎児のcDNAライブラリーをスクリーニングし、 $msi2$ 遺伝子cDNAを単離した。得られた断片の塩基配列に基づき、RT-PCRを行い $msi2$ 遺伝子の翻訳領域を単離同定した。 $msi2$ mRNAの発現パターンを解析するためにin situ hybridizationおよびNorthern blotを行った。胎生期および生後の全脳あるいは、成体各組織からtotal RNAを調製し各25mgをホルムアルデヒド含有1%アガロースゲルに泳動し定法⁷⁾に従ってNorthern blotを行った。一方、 $msi2$ cDNAから予想されるN末端側の14アミノ酸配列に相当するペプチドを合成しKLH-conjugateとしてウサギに免疫し抗血清を得た後、抗原ペプチドによるアフィニティー精製を行い抗Msi2抗体とした。本抗体の特異性は大腸菌内で発現させたMsi1 およびMsi2蛋白質に対するWestern blotにより確認した。

免疫組織化学的解析

一次抗体として、抗Msi2抗体、抗Msi1抗体(clone14H1, Rat IgG2b)、抗GFAP抗体(mouse IgG1、200倍希釈、

clone G-A-5, Sigma), Hu(mouse IgG2b, 100倍希釈、clone 16A11, University of Oregon), MAP2(mouse IgG1、200倍希釈、clone G-A-5, Sigma), CNPase(mouse IgG1、200倍希釈、clone 11-5B, Sigma), MBP(rabbit IgG、500倍希釈), Calbindin(rabbit IgG、500倍希釈), PCNA(mouse IgG1、200倍希釈、Novocastra Laboratories), BrdU(mouse IgG1、1000倍希釈、clone BU-33, Sigma)を用いた。組織染色の場合、4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋切片を一次抗体と4℃一夜で反応させたのち、ビオチン標識二次抗体(750倍希釈、Vector laboratories)室温1時間、HRP標識avidin(1000倍希釈、Vector laboratories)室温1時間反応後、DAB/H₂O₂により発色させた。蛍光二重染色の場合、4%パラホルムアルデヒド固定、凍結切片(12mm)を用い一次抗体と4℃一夜反応後、FITCおよびRhodamine標識二次抗体(250倍希釈、Chemicon)を室温1時間反応させて染色した。遺伝子マッピング(FISH)

$msi1$ および $msi2$ 遺伝子と遺伝性疾患の関連を検索するために、そのマウスおよびヒト染色体上の遺伝子座をFISH(Fluorescence In Situ Hybridization)法により決定した。マウス $msi1$ ゲノムDNA 11kb断片、ヒト $msi1$ ゲノムDNA 10kb断片、マウス $msi2$ ゲノムDNA 8.1kb断片をプローブとして用い、定法³⁾によりマウス $msi1$ 、マウス $msi2$ 、ヒト $msi1$ のマウスあるいはヒト染色体における遺

伝子座を、FISHシグナルの位置の写真判定により細胞遺伝学的に決定した。

Neurosphere assay

胎生14.5日終脳細胞を用い定法²⁾に従ってneurosphere formation assayを行った。培養液はDMEM/F-12 (1:1) (GibcoBRL)に増殖因子としてbFGF 10 ng/ml、EGF 20ng/ml、補助因子としてheparin 2 μ g/mlを添加したものを、 1×10^5 cells/mlの細胞密度で一週間浮遊培養したのち形成されたneurosphere数を計測した。またこのようなneurosphereを集めて0.25% trypsin EDTA処理により単一細胞に分散し、 2.5×10^3 cells/ml (500 cells/0.2 ml/well, 96 well plate)で再び浮遊培養することを繰り返し継代培養を行った。分化アッセイにおいては、疎水性コーティング付きスライドガラス (Weaton) 上の半径4 mmの培養スペースを接着基質 (polyethylenimine) でコーティングし、各スペースにneurosphereをひとつずつ移植し、増殖因子を含まず1%のウシ胎児血清を含む分化誘導培地で培養した。一週間の培養後、4%パラホルムアルデヒド/PBSで10分間固定し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてそれぞれanti TuJ1 (Berkley antibody company, 1:200希釈)、anti GFAP (DAKO, 1:10希釈)、anti O4 (Boehringer, 1:10希釈)を用いて定法²⁾に従い三重染色を行った。

アンチセンスPNAによる*msi2*遺伝子機能阻害

in vitroで*msi2*遺伝子の発現を阻害するために開始コドン近傍の17あるいは16塩基に対応する*msi2* mRNAのアンチセンス鎖をPNA (asPNA) により合成した (PE biosystems)。末端に細胞の透過性を高めるためのLys残基を付加した。胎生14.5日終脳細胞を用いて一週間の浮遊培養によってprimary neurosphereを形成し、前述の方法で一回継代し、同時にasPNAを添加し、4日後に形成されたsecondary neurosphereの数を計測した。

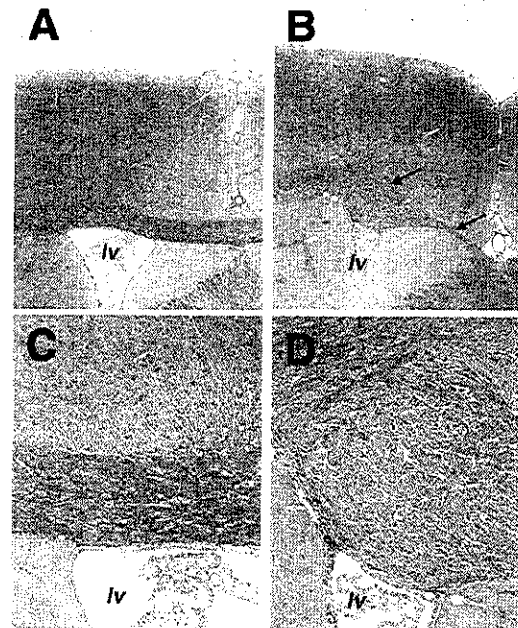
結 果

*msi1*遺伝子欠損マウス

ヘテロ接合体マウスの交配により得られたホモ接合体におけるMsi1蛋白質の欠損をMsi1特異的抗体 (mAb14H1)¹⁾によるウェスタンブロットおよび免疫組織化学によって検討した。その結果胎生期から成体にいたるまで、野生型に対して、ホモ接合体においては全く14H1抗体の反応性が消失することから、得られたホモ接合体は*msi1*遺伝子産物を全く産生しないnull変異体であることが確

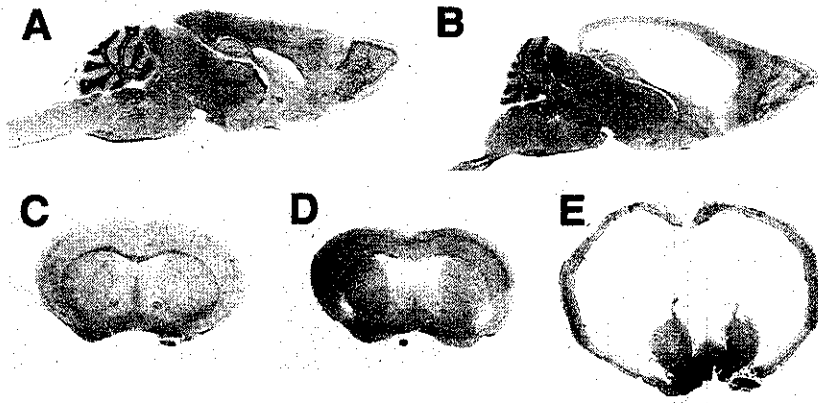
認された。

ホモ接合体はメンデル則に従って出生し、また出生前の胎児の剖検、組織学的観察からは*msi1*遺伝子欠損マウスにおける顕著な異常は観察されなかった (成長の遅延を含めて)。神経幹細胞の増殖や分化が活発で、Msi1の発現が最も高い胎生期の脳室周囲部のventricular zone (VZ)や脳室下帯のsubventricular zone (SVZ)においても組織構築の異常を認めることはできなかった。しかし出生後約一週齢でホモ接合体では頭部の膨大が始まり2-3週齢までにドーム型の頭部を特徴とする水頭症を高頻度で (ホモ接合体の約70-80%の個体) 発症した (図3)。一方、水頭症非発症ホモ接合体のなかには頻度は低いながら (ホモ接合体の約5-10%の個体)、脳梁形成不全が認められた。このような個体では脳梁の交差が形成されず特に前脳正中部の両側で軸索の滞留を示すProbst bundleが観察された (図2)。脳梁をつくる交連繊維の対側半球への進展、交差は胎生16-17日に起こるが、ホモ接合体のProbst bundleの形成は胎生17日において既に認められた。



【図-2】 *msi1*遺伝子欠損マウスにおける脳梁形成不全 (Probst bundle)

成体脳前交連付近の冠状断切片のHE染色像。A,C; 対照野生型 B,D; *msi1*遺伝子欠損マウス。C,Dは脳梁部分の拡大。*msi1*遺伝子欠損マウスには脳梁の交差が形成されず (矢印)、特に前脳正中部の両側で軸索の滞留を示すProbst bundleが形成される。iv; 側脳室



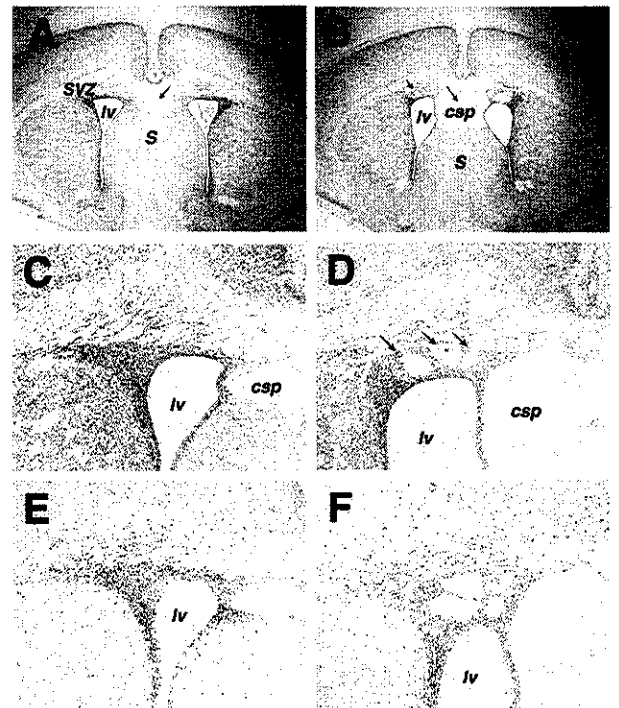
【図-3】 *msi1* 遺伝子欠損マウスにおける水頭症

成体脳矢状断 (A,B) および前交連付近の冠状断切片 (C,D,E) の HE 染色像。A,C; 対照野生型 B,D,E; *msi1* 遺伝子欠損マウス。*msi1* 遺伝子欠損マウスには側脳室の対称性の拡大、大脳皮質の薄化、浮腫を伴う実質の欠損、中隔の低形成がみられる (B)。嗅球、小脳、海馬は吻側あるいは尾側方向へ圧迫変性している。激しく拡大した側脳室上衣は破綻しており (E)、上衣細胞の消失、上衣下の欠損がみられる。より症状が軽度の個体では透明中隔腔の拡大を伴う側脳室の拡大が観察された (D)。

msi1 遺伝子欠損マウスにおける水頭症および発症機序

msi1 遺伝子欠損マウスは高頻度で出生後水頭症を発症し、重篤な個体は約 1-2 ヶ月で死亡した。水頭症を発症した成体個体を組織学的に解析した結果、図 3 に示すように、側脳室の対称性の激しい拡大、大脳皮質の薄化、白質、灰白質の浮腫を伴う実質の欠損、中隔の低形成が観察された。また頭蓋内圧の亢進によると考えられる嗅球、小脳、海馬の吻側、尾側方向への圧迫変性も観察された。拡大した側脳室上衣は一部破綻しており、上衣細胞の消失、上衣下の海綿状変化が顕著であった。より症状が軽度の個体でも透明中隔腔の拡大を伴う側脳室の拡大が観察された (図 3)。しかし脈絡叢には著変を認めなかった。このような側脳室拡大と上衣の破綻、上衣下の海綿状変化を伴う実質欠損は生後 3 日目の側脳室前角部周囲 (特に SVZ 領域) で開始される (図 4)。一方、生後水頭症を発症した *msi1* 遺伝子欠損マウスにおいてニューロン、グリア細胞が正常に分化しているか、あるいは神経系前駆細胞を多く含む SVZ での分裂細胞数が変化しているかを調べるために、各種細胞分化マーカー抗体による免疫染色、分裂細胞の核を特異的に染色する PCNA 抗体染色、BrdU 投与による分裂細胞の標識を行った。しかしながら対照の野生型に比べて *msi1* 遺伝子欠損マウスにおける MAP2、Hu⁵⁷ 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイト、MBP、CNPase 陽性のオリゴデンドロサイトの数に顕著な変化は観察できなかった。また側脳室前角の SVZ における PCNA 陽性 (図 4)、BrdU 陽性細胞数にも著明な変化は観察されなかった。

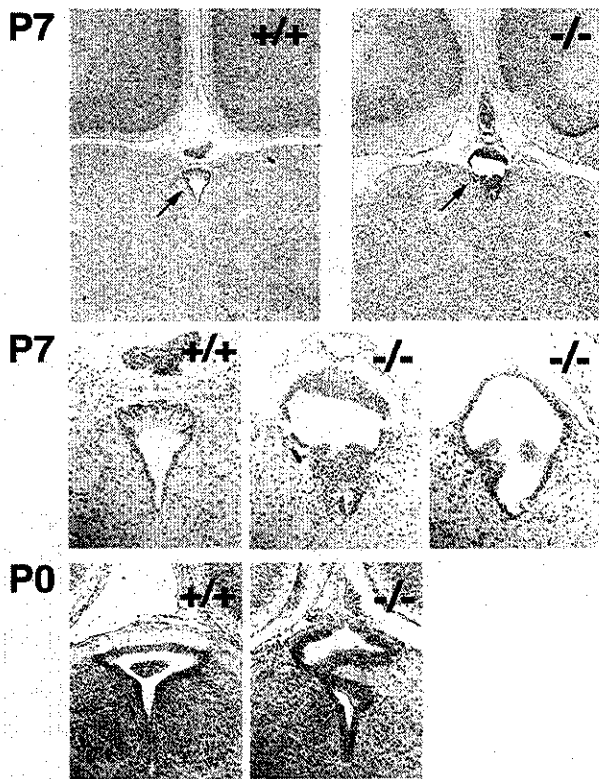
次に、本水頭症の発症機序をより詳細に調べるためにより早期の日齢で組織学的検索を行った。その結果生後 0 日目で第三脳室から中脳水道への入り口の領域に、中脳水道上衣細胞の異常増殖とポリープ形成、中脳水道内



【図-4】 *msi1* 遺伝子欠損マウスにおける水頭症発症と進行

生後 3 日脳前交連付近の冠状断切片 (A,B) および SVZ を含む側脳室周辺部の拡大 (C,D,E,F) の Nissl 染色像 (A,B,C,D)、および PCNA 抗体染色 (E,F)。*msi1* 遺伝子欠損マウスにおいては、生後 3 日で既に前脳部、特に側脳室前角部周囲の SVZ および皮質下白質の部分的な欠損 (D 矢印)、側脳室、透明中隔腔の拡大、中隔の低形成が観察される。一方、SVZ における PCNA 陽性分裂細胞数は対照の野生型に比べて欠損部はあるものの顕著な変化を示さなかった (F)。SVZ; subventricular zone, csp; 透明中隔腔, iv; 側脳室

腔の狭窄が認められた (図 5)。このような上衣細胞の異常分裂による中脳水道狭窄は生後 7 日目の中脳水道上衣細胞および subcommissural organ の上衣細胞でも認められた (図 5)。さらに *msi1* 遺伝子欠損による中脳水道上

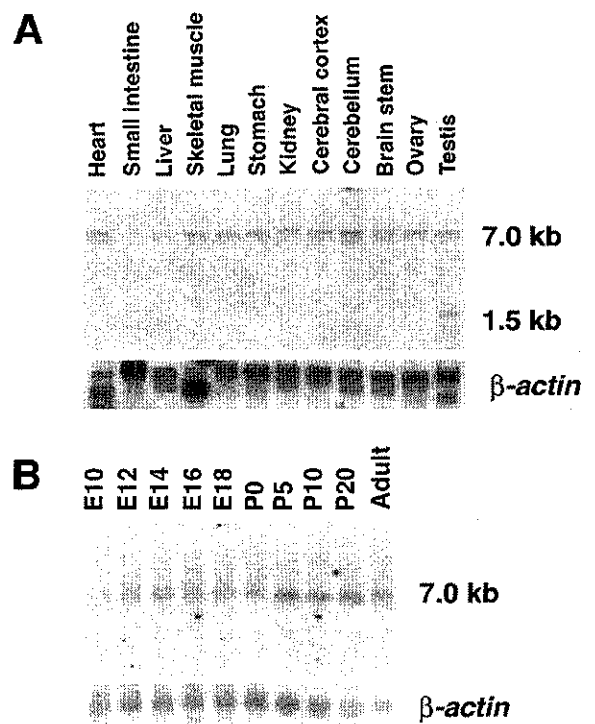


〔図-5〕 *msi1*遺伝子欠損マウスにおける水頭症の発症機序。生後7日目、および出生直後0日目の第三脳室から中脳水道への導入領域の冠状断HE染色像。*msi1*遺伝子欠損マウスにおいて、中脳水道およびsubcommissural organの上皮細胞(矢印)に異常増殖とポリープ形成、中脳水道内腔の狭窄が認められる。+/+; 野生型、-/-; *msi1*遺伝子欠損マウス。下段5枚は中脳水道部の拡大。

上皮細胞の変化を詳細に検討するために生後14日目の中脳水道の電子顕微鏡的観察を行った。その結果、野生型マウスの中脳水道上皮は一層の規則正しい上皮構造をとり分裂は停止しているのに対して、*msi1*遺伝子欠損マウスでは上皮細胞が2-3層に多層化していた。これらの上皮細胞の核に異形性は認められないものの異所的な細胞分裂像を示し、また微絨毛は不規則な配列を示し、その内腔の中脳水道はグリコーゲン顆粒に富む構造物で閉塞されていた(図6)。以上の組織学的解析により*msi1*遺伝子欠損マウスの水頭症は、出生後の中脳水道上皮細胞の異常な増殖、分化に伴う中脳水道の狭窄、閉鎖による脳脊髄液の循環傷害に起因する可能性が示唆された。この脳脊髄液の貯留が次に側脳室拡大、および前角部での上皮の破綻と、浮腫による上皮下実質の欠損を引き起こし、巨頭症を伴う水頭症が発症すると考えられる。

*msi2*遺伝子の同定と発現パターン

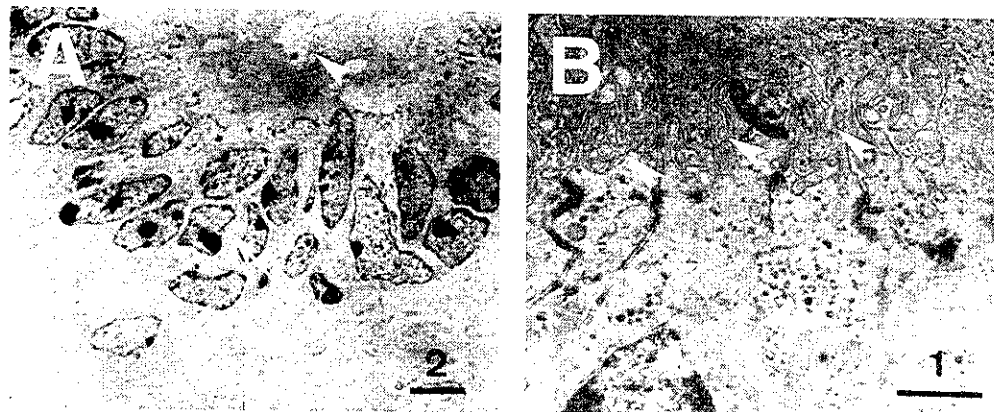
*msi1*遺伝子欠損マウスの表現型として中脳水道上皮細



〔図-7〕 Northern blotによる*msi2* mRNAの発現パターン解析。成体各組織(A) および中枢神経系発生過程(B)における*msi2* mRNA変化。*msi2* mRNAは神経系を含めてほぼすべての臓器において発現しており、またそのレベルは、胎生10日から成体に至るまで、中枢神経系発生過程を通してほぼ一定に保たれている。*msi2* mRNAサイズは7.0kb、精巣では加えて1.5kbの転写産物が発現している。

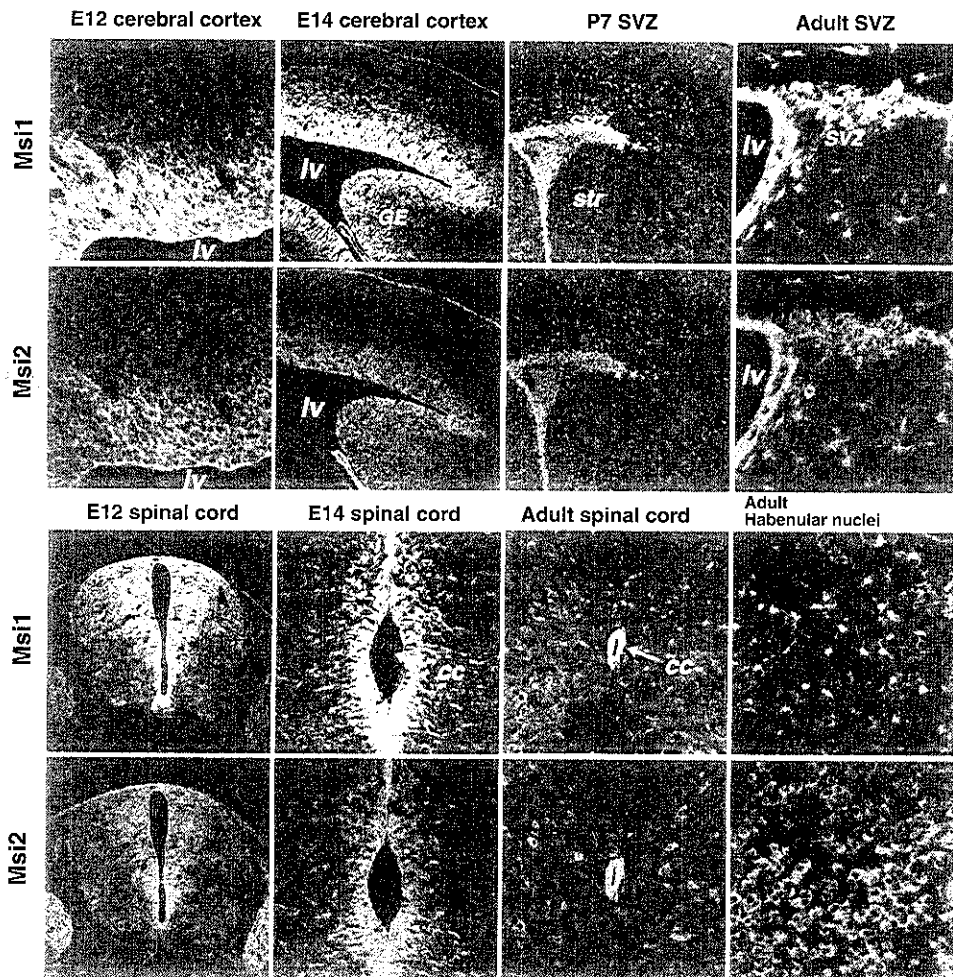
胞の異常とそれに伴うと考えられる水頭症発症が観察された。*msi1*は中脳水道部を含む上皮細胞で生後も持続的に強く発現していることから考えても⁷⁾(図11)、*msi1*遺伝子がこれらの上皮細胞の正常な分裂、分化、維持に必須の機能を有していることが推定できる。しかし、本来*msi1*遺伝子が最も強く発現している胎生期のVZ(神経系幹細胞を含む)やSVZに形態的、組織学的異常が認められなかった点から、我々は*msi1*遺伝子によく似た別のRNA結合蛋白質が存在し、神経発生過程において*msi1*遺伝子と機能を共有している可能性を考えた。そこで*msi1*cDNAおよび*Xenopus*における*msi1*遺伝子類似遺伝子*xrpl* cDNAをプローブとしてマウスcDNAライブラリーをスクリーニングし、新規に*msi1*遺伝子に類似したRNA結合蛋白質である*msi2*遺伝子を単離同定した。

cDNA塩基配列解析により*msi2*と*msi1*は蛋白質レベルで約75%のホモロジーを示し、特に下流標的RNAとの結合に必要と考えられるRNA結合モチーフドメインにお



〔図-6〕 *msi1* 遺伝子欠損マウスにおける中脳水道上皮細胞変化の電子顕微鏡観察

生後14日目の *msi1* 遺伝子欠損マウス中脳水道の電子顕微鏡写真 (A,B)。Bは水道内腔に面する上皮細胞の微絨毛部の拡大。通常、野生型マウスでは中脳水道上皮は一層の規則正しい上皮構造をとるのに対して、*msi1* 遺伝子欠損マウスでは上皮細胞が2-3層に多層化していた (矢印は多層化した上皮細胞の核を示す)。中脳水道内腔はグリコーゲン顆粒に富む構造物で閉塞され (A矢頭)、水道内腔に面する上皮細胞の微絨毛は圧迫され、不規則な配列を示している (B矢頭)。



〔図-8〕 中枢神経系の発生過程におけるMsi2とMsi1の発現比較

Msi1 (緑、FITC標識) および Msi2 (赤、Rhodamine標識) 抗体による二重免疫染色。胎生期 (胎生12日、14日) および生後 (7日、成体) の脳、脊髄において、Msi2はMsi1とほぼ同様に、VZやSVZなど未分化な前駆細胞に強く発現している。神経発生の進行とともに分化してくるほとんどのニューロンにおいてはMsi1、Msi2ともに発現が急速に低下する。Msi2はMsi1同様、上皮細胞 (脊髄上皮細胞を含めて)、アストロサイトにも発現していた。しかしながらMsi1と異なり、Msi2は手綱核などの特定の神経核ニューロンや脊髄の一部ニューロンにおいて持続的な発現を示す。lv;側脳室、GE; ganglionic eminence、SVZ; subventricular zone、str; 線状体、cc; 中心管

いては約90%相同と非常に高い類似性を示した。Northern blotの結果からは、*msi1* mRNAが神経系にはほぼ特異的に発現するのに対して、*msi2* mRNAは神経系を含めてすべての臓器において発現しており (図7)、また *msi1* mRNA

が中枢神経系発生過程で発現量が急速に抑制されるのに対して、*msi2* mRNAレベルは発生過程を通してほぼ一定に保たれていることが明らかとなった (図7)。さらに *msi2* の詳細な発現パターンを解析するために、*msi2* 蛋白

質(Msi2)を特異的に認識する抗ペプチド抗体を作製し、中枢神経系の発生過程における発現をMsi1抗体との二重染色により検討した。その結果胎生期および生後の脳、脊髄において、一部の例外はあるものの、Msi2はMsi1とほぼ同様の発現パターンを示すことが明らかとなった。即ちMsi1、Msi2ともに中枢神経系発生過程ではVZおよびSVZの神経系前駆細胞に強く発現しており、神経発生との進行とともに分化してくるほとんどのニューロンにおいてはその発現が急速に低下することが示された(図8)。またMsi2はMsi1同様、上皮細胞、アストロサイトにも発現していた。しかしながら一部の神経核ニューロンにおいてはMsi2はMsi1と異なる発現様式を示した。Msi1ほとんどのニューロンでの発現を消失させるのに対して、Msi2は小脳核、手綱核、橋核などの一部の神経核ニューロンやプルキンエ細胞などで持続的な発現を示した(図8)(他の大脳皮質各層、小脳や嗅球の顆粒細胞などでは発現は消失する)。このような一部の分化したニューロンでのMsi2の持続的発現により、*msi2* mRNA量が中枢神経系において、発生過程を通して見かけ上ほぼ一定に保たれていることが推定された。また非神経系組織では、筋肉の筋原細胞、精巣、卵巣などの間質細胞や多臓器の上皮細胞においてMsi2の発現が認められた。

以上の蛋白質構造としてのMsi2とMsi1の相同性、および中枢神経系の発生過程における発現の類似性から考えて、Msi2とMsi1は相互に類似あるいは同一のRNA分子をその下流標的として認識、制御するファミリー遺伝子として、神経発生過程においても同様の機能を有している可能性が高いと考えられた。実際、出生直後の*msi1*遺伝子欠損マウスの脳においては対照野生型マウスに比べて、*msi2* mRNAは1.4-2.0倍に発現が上昇していることから、*msi2*がredundantな遺伝子として働くことで、神経発生における*msi1*欠損マウスの表現型をマスクしている可能性が示唆された。

msi1 および *msi2* 遺伝子マッピング

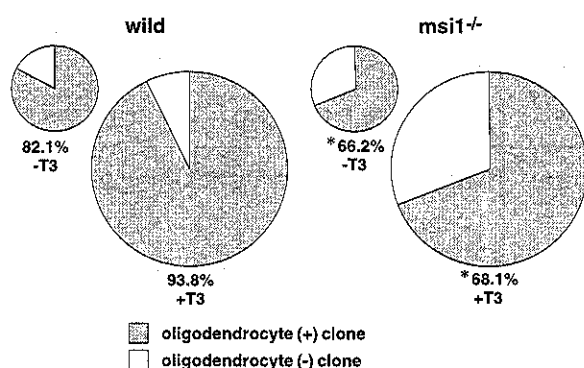
msi1 および *msi2* 遺伝子と遺伝性疾患の関連を検索するために、そのマウスおよびヒト染色体上の遺伝子座をFISH(Fluorescence In Situ Hybridization)法により細胞遺伝学的に決定した。その結果、*msi1* 遺伝子はマウス第5番染色体qE4-Fに、ヒト染色体では12番染色体q24.1-24.31にマップされた³⁾。また*msi2* 遺伝子はマウス第11番染色体qB5-Cにマップされ、これはcomparative mapによりヒト

染色体では第7番染色体に相当していた。しかしながら現在までのところ、ヒトおよびマウスの遺伝性疾患のデータベース検索からは、*msi1* 近傍にはscapulo-peroneal spinal muscular atrophy (SPSMA)、spinal muscular atrophy of lower extremities (SMAL)、hereditary motor neuropathy type II (HMN2)などの神経変性疾患遺伝子座が存在していた³⁾。しかしながら、*msi1* および *msi2* 遺伝子近傍にマップされる水頭症を伴う遺伝性疾患は報告されていない。

msi1 遺伝子欠損マウスの神経幹細胞機能の検討

組織学的解析から*msi1* 遺伝子欠損マウスの神経幹細胞を含む神経系前駆細胞の異常は検出できなかった。そこで初代培養系を用いることにより神経幹細胞の性質を詳細に検討した。まずneurosphere法を用いて神経幹細胞の数および自己複製能を検討した。神経系の幹細胞は増殖因子存在下で浮遊培養することにより、neurosphereと呼ばれる球状の細胞塊を形成することが知られている。一定数(1×10^5 細胞)の胎生14.5日終脳細胞に由来するneurosphereの数は野生型および*msi1* 遺伝子欠損マウスで差はみられず約10回の継代によっても再びneurosphereを形成することから、*msi1* 遺伝子単独欠損によって神経幹細胞の数と自己複製能は変化しないことが明らかとなった。次に神経幹細胞の多分化能を検討するためneurosphereを接着培養系に移し増殖因子非存在下で一週間分化させ、細胞種マーカーによる三重染色を行った。neurosphereは単一の神経幹細胞(neurosphere-producing cell)に由来するクローナルな細胞集団と考えられるためひとつのneurosphereに含まれる細胞種はneurosphere-producing cellの多分化能を反映する。表1および図9に示すように*msi1* 遺伝子欠損マウス由来のneurosphereではオリゴデンドロサイトに分化したものが野生型に比べ有意に減少していた。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞から成熟オリゴデンドロサイト分化を促進するとされるT3の有無に関わらず(図9)、このオリゴデンドロサイト分化率低下がみられることから、*msi1* 遺伝子欠損マウスではT3以外のオリゴデンドロサイト分化促進因子が欠乏しているか、あるいはまた、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの運命決定が抑制されている可能性が考えられた。

msi1 および *msi2* 遺伝子は重複した発現パターンを示しており、これらふたつの遺伝子が協同して神経幹細胞の性質を維持している可能性も考えられたため、*msi1* 遺伝



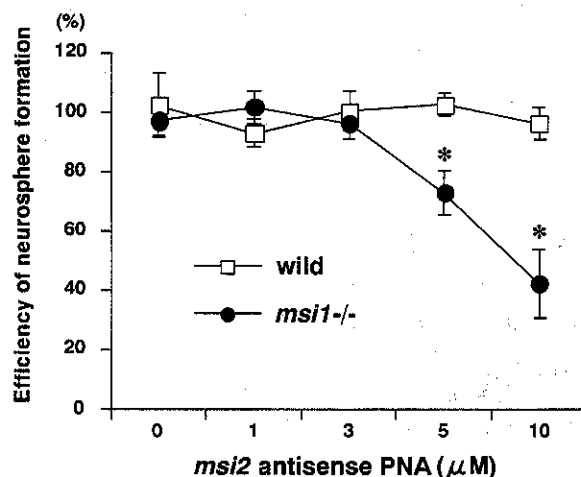
〔図-9〕 *ms1*遺伝子欠損マウスにおける神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化抑制

表1の結果から、野生型および*ms1*遺伝子欠損マウスの全クローン (N +NAO+ NA +NO+ AO+ A) に対してオリゴデンドロサイトを含むクローン (NAO+ NO+ AO) の占める割合数字は全クローンに対する%で表示した。オリゴデンドロサイトの前駆細胞からの分化を促進するT3の添加に関わらず、野生型に比べて、*ms1*遺伝子欠損マウスにおいてオリゴデンドロサイトを含まないクローンが有意に増加している。*; $p < 0.01$ in comparison to wild type (welch's *t* test)

子欠損マウスのneurosphere assayにおいて*msi2*遺伝子の機能をアンチセンス (antisense peptide nucleic acids ; asPNA) で抑制することにより、*msi1*、*msi2*両遺伝子を抑制した場合の神経幹細胞の性質を検討した。図10に示すように*msi1*遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞は添加した*msi2*のasPNAの濃度に依存してneurosphereの形成能を低下させることが明らかとなった。これに対して同腹の野生型由来の神経幹細胞は*msi2*のasPNAの濃度には関わらず一定のneurosphereを形成していた。よって*msi1*と*msi2*は協調して神経幹細胞の増殖あるいは生存維持に必須な役割を担っていると考えられた。

考察および結語

遺伝子発現の転写後調節は、複雑な神経系の発生過程と可塑性等において重要な役割を果していることが予想される。ショウジョウバエのMusashi遺伝子産物は、RNA結合蛋白質として転写後レベルにおいて下流遺伝子群の発現を調節することにより、神経発生過程における細胞の運命決定、特に細胞系譜の形成過程に必要と考えられている⁶⁾⁸⁾。ショウジョウバエのMusashiのマウス相同分子Musashi1 (Msi1)は哺乳類胎生期の脳室周辺部VZに豊富に存在し、ニューロンおよびグリア細胞を産生する



〔図-10〕 *msi1*、*msi2*両遺伝子のアンチセンスによるneurosphere形成能の低下

*msi2*遺伝子の発現を阻害するアンチセンス (antisense peptide nucleic acids ; asPNA) 存在下で、野生型および*msi1*遺伝子欠損マウスのneurosphere assayを行った。*msi1*遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞の場合、アンチセンス濃度依存的なneurosphere形成率の低下がみられる。これに対して同腹の野生型由来の神経幹細胞は*msi2*のasPNAの濃度に関わらず一定のneurosphereを形成率を示す。*; $p < 0.01$ in comparison to wild type (unpaired *t* test)

能力を有する中枢神経系未分化幹細胞において強く発現している事を明らかとなっている¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。Msi1は生後から成体に至るまで、側脳室周辺のSVZに存在する未分化幹細胞やグリア前駆細胞と考えられる細胞、および上衣細胞を含むアストロサイトにおいて強く発現が持続する一方、PDGFRあるいはNG2陽性のO-2Aやオリゴデンドロサイトの細胞系譜においては極めて早期からMsi1発現が消失する⁷⁾(図11)。以上のような発現パターンやショウジョウバエ相同分子(d-Msi)との類似性から、Msi1蛋白質は胎生期のみならず成体においても神経発生過程における細胞の運命決定、細胞系譜の形成あるいは、神経系幹細胞の維持に転写後レベルで関与している可能性が考えられた。

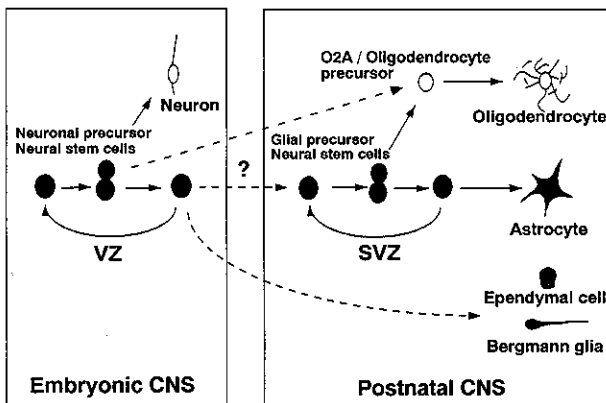
我々は、今回*msi1*遺伝子産物の生体内での役割を明らかにするために、相同組み換え法を用いて*msi1*遺伝子欠損マウスの作製を行った。その結果、*msi1*欠損ホモ接合体は出生直後より高頻度に水頭症を発症し、重篤な個体は生後1-2ヶ月で死亡することを明らかとした。過去、一般的に水頭症の成因としては、脈絡叢構成細胞による脳脊髄液の過剰産生、炎症、腫瘍、嚢胞形成等をも含めた中脳水道狭窄閉塞による脳脊髄液の循環傷害、軟膜く

	N	NAO	NA	NO	AO	A
msil +/+ or +/-	1.5±1.5	68.2±4.8	9.4±2.6	2.3±1.6	11.6±1.7	6.9±2.7
msil -/-	0.5±0.5	62.0±5.5	* 22.3±2.6	0.5±0.5	* 3.7±1.0	11.1±4.2

N: neuron, A: astrocyte, O: oligodendrocyte

〔表-1〕 msil遺伝子欠損マウスにおける神経幹細胞の多分化能

胎生14.5日終脳細胞由来の野生型 (n=5, 98 neurospheres) およびmsil遺伝子欠損マウス (n=10, 234 neurospheres) の各 neurosphere を接着培養下で分化させて、ニューロンのみを含むクローン (N)、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを含むクローン (NAO)、ニューロン、アストロサイトを含むクローン (NA)、ニューロン、オリゴデンドロサイトを含むクローン (NO)、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを含むクローン (AO)、アストロサイトのみを含むクローン (A) に分類した。数字は全クローンに対する%で表示した。 *; p < 0.01 in comparison to wild type (student's t test)



〔図11〕 哺乳類中枢神経発生過程におけるMsi1の発現パターン

胎生期、Msi1は神経管のVZあるいはSVZにある未分化神経系前駆細胞（ニューロン前駆細胞や神経系幹細胞）に強く発現し、分裂を停止し分化してくるニューロンでの発現は急速に低下する。VZは胎生末期以降、生後は上衣層になるが、これら上衣細胞を含めたアストロサイトの系譜や、SVZの未分化神経系前駆細胞（グリア前駆細胞や神経系幹細胞）においてMsi1は持続的に発現する。一方、オリゴデンドロサイトの系譜（前駆細胞を含めて）においてはMsi1は極めて早期からその発現を示さない。

も膜下腔の発育不全による脳脊髄液の吸収低下、等による脳脊髄液の貯留、脳室内圧の上昇が考えられてきた。水頭症のモデル動物としても胎生末期の上衣細胞配列、変性等の形態変化によるHTXラットやhyhマウス¹²⁾等が存在する他、TGF-β1などの液生因子のトランスジェニックマウス⁹⁾が知られている。さらに最近の遺伝子ノックアウトマウスにより、L1遺伝子ノックアウトマウス¹¹⁾や、白質のミエリン化の異常を示すGFAP遺伝子ノックアウトマウス¹⁰⁾、くも膜下顆粒の発育形成不全によるforkhead/winged helix遺伝子Mflノックアウトマウス¹³⁾、脈絡叢細胞の脳脊髄液過剰産生を示す基本転写因子E2F-5遺伝子ノックアウトマウス¹⁴⁾などが水頭症を発症することが報告されている。今回我々は哺乳類初期発生

において中枢神経系未分化幹細胞において強く発現しているRNA結合蛋白質であるMusashil (Msi1) の遺伝子欠損マウスが生後型の水頭症を発症することを明らかとした。msil遺伝子欠損マウスの脈絡叢細胞には電顕レベルでの形態異常は認められなかったが、中脳水道上衣細胞には異常な増殖による多層化がみられ、これに伴う中脳水道の狭窄、閉鎖による脳脊髄液の貯留、脳室内圧の上昇、側脳室拡大が考えられた。上衣は通常の上皮細胞と異なり基底膜を有していないため、脳脊髄液が容易に上衣下に拡散するため、水頭症の進行に伴って、側脳室前角部から開始される上衣の破綻と上衣下実質の細胞間浮腫の増強、実質欠損が進行し、巨頭症を示す水頭症に至ると考えられる。msilは中脳水道部を含む上衣細胞で生後も持続的に強く発現していることから考えても(図11参照)、msil遺伝子がこれらの上衣細胞の正常な分裂、分化、維持に必須の機能を有していることが推定できる。今回の研究により、msilが難治性遺伝的水頭症発症の候補遺伝子となる可能性の考えられるが、現在まで、msil遺伝子座(ヒトにおいては12番染色体q24.1-24.31)の異常を伴うヒト遺伝的水頭症は報告がない。しかしながら、上述したような中脳水道上衣細胞の多層化による水頭症モデルマウスも例がなく、msil遺伝子欠損マウスは新たな水頭症発症の機序の解明のモデル動物として有用と考えられる。

一方、本来msil遺伝子が最も強く発現している胎生期のVZやSVZに形態的、組織学的異常が認められなかったことから、msil遺伝子の機能を相補するようなmsil類似遺伝子の存在が考えられた。そこで我々はmsil相同性を示す新規RNA結合蛋白質msi2遺伝子を単離し、その発現パターンを比較解析した。その結果、興味深いことに胎生期においてmsi2遺伝子発現はmsil遺伝子のそれと非

常に類似していることが明らかとなった。*msi1*、*msi2* 遺伝子の神経幹細胞における役割を検討するために、*msi1* 遺伝子欠損マウスの初代培養神経幹細胞において、*msi2* 遺伝子のアンチセンスによる機能阻害を行った。その結果 *msi1*、*msi2* 両遺伝子の発現抑制により neurosphere の形成能が低下する事から、*msi1* と *msi2* は協調して神経幹細胞の増殖あるいは生存維持に必須な役割を担っていることが示唆された。初代培養系による分化能の解析から、*msi1* 遺伝子欠損により神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの運命決定が抑制されていると考えられた。*msi1* は本来オリゴデンドロサイトの系譜においては極めて早期からその発現がないことから、この抑制は、*msi1* 欠損により、神経系前駆細胞あるいはアストロサイトからのオリゴデンドロサイト分化促進因子の分泌が低下する等の non-cell autonomous な効果である可能性も考えられる。今後、これらの *msi1* 下流の標的 mRNA の同定・解明により、神経幹細胞あるいは上皮細胞における *msi1* の機能や水頭症発症との関連を分子生物学的にも明らかにできると考える。

以上、*msi* 遺伝子ファミリー (*msi1*、*msi2*) が神経初期発生の過程で神経幹細胞の増殖、維持からその後の上皮細胞の分化に至るまで、神経系細胞の正常な増殖、系譜形成に重要な機能を果たしていることが予想されることから、さらに現在、生体内での役割を明らかにするために、*msi2* 遺伝子欠損マウスの作製を行っている。*msi1*、*msi2* 両遺伝子は異なる染色体上に位置する (マウスにおいて *msi1* は第 5 染色体、*msi2* は第 11 番染色体) ことから交配による二重変異マウスの作製と解析が可能であり、これにより *msi* ファミリーが神経系発生、分化において果たす役割がさらに明らかにできるものと期待される。

文 献

- 1) Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H: Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.* 22:138-152, 2000
- 2) Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H: The bHLH gene *Hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci.* 20:283-293, 2000
- 3) Good P, Yoda A, Sakakibara S, Yamamoto A, Imai T, Sawa H, Ikeuchi T, Tsuji S, Satoh H, Okano H: The human Musashi homolog 1 (*MSI1*) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. *Genomics* 52:382-384, 1998
- 4) Pincus DW, Keyoung HM, Harrison-Restelli C, Goodman RR, Fraser RA, Edgar M, Sakakibara S, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA: Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells. *Ann Neurol.* 43:576-585, 1998
- 5) Sakakibara S, Okano H: Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development. *J Neurosci.* 17:8300-8312, 1997
- 6) Nakamura M, Okano H, Blendy J, Montell C: Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. *Neuron* 13:67-81, 1994
- 7) Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H: Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol.* 176:230-242, 1996
- 8) Okabe M, Sawamoto K, Imai T, Sakakibara S, Yoshikawa S, Okano H: Intrinsic and extrinsic determinants regulating cell fate decision in developing nervous system. *Dev Neurosci.* 19:9-16, 1997
- 9) Galbreath E, Kim SJ, Park K, Brenner M, Messing A: Overexpression of TGF-beta 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54:339-49, 1995
- 10) Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS: GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-15, 1996
- 11) Fransén E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SK, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ: L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet.* 7:999-1009, 1998
- 12) Perez-Figares JM, Jimenez AJ, Perez-Martin M, Fernandez-Llebrez P, Cifuentes M, Riera P, Rodriguez S, Rodriguez EM: Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57:188-202, 1998
- 13) Kume T, Deng KY, Winfrey V, Gould DB, Walter MA, Hogan BL: The forkhead/winged helix gene *Mf1* is disrupted in the pleiotropic mouse mutation congenital hydrocephalus. *Cell.* 93:985-96, 1998
- 14) Lindeman GJ, Dagnino L, Gaubatz S, Xu Y, Bronson RT, Warren HB, Livingston DM: A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev.* 12:1092-8, 1998
- 15) Nojima Y, Enzan H, Hayashi Y, Nakayama H, Kiyoku H, Hiroi M, Mori K: Neuroepithelial and ependymal changes in HTX rats with congenital hydrocephalus: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Pathol Int.* 48:115-25, 1998

NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの水頭症発生機序

東京医科歯科大学 疾患遺伝子実験センター 分子神経変性研究部門

原 嘉 信 原 由 紀 子

はじめに

ミオシン遺伝子ファミリーは、15のサブファミリーから構成され、近年続々と新しい分子が発見されておりその多様性の全貌はまだ明らかとなっていない。各ミオシン分子は、固有の分子構造をもち、組織・細胞内での発現様式が異なることからそれぞれ特異的な機能を持つことが推定されている。このうち骨格筋ミオシンに関しては、生物物理学的構造解析が進み、アクチンに結合する分子モーターとしてその動きを単一分子のレベルでとらえることが可能となり、近年飛躍的に研究が進んでいる。しかしながらその他のミオシン分子に関しては、その構造・機能ともまだ推測の域をはずほとんど明らかになっていない。これまで我々は、Nonmuscle Myosin Heavy Chain II-A (NMHC-A)とNonmuscle Myosin Heavy Chain II-B (NMHC-B)の二つの遺伝子をマウスとヒトから単離し、これらが骨格筋ミオシンを含む第2サブファミリーに属し、それぞれマウスでは第15染色体と第11染色体に位置し、ヒトでは第22染色体と第17染色体に位置することを明らかにしてきた。しかしながら組織・細胞内には、複数のミオシン分子が同時に発現しているため、各ミオシン分子の特異的機能を同定することは困難である。そこで本研究では、NMHC-B遺伝子欠損マウスを樹立し、正常マウスと比較しながら、その構造・機能異常の解析を進めている。その結果NMHC-Bミオシンが神経系の発生過程で神経上皮細胞の脳室壁膜に強く発現し、その細胞間接着に重要な役割を果たしていること、またNMHC-B遺伝子異常により神経上皮細胞の増殖、分化、細胞移動に異常を来し、脳室壁の破壊、閉塞か

ら脳奇形をおこし水頭症を発症する事を明らかにしたので報告する。

材料と方法

NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスは、エクソン2のATGコドンの下流にネオマイシン耐性遺伝子を相同置換により挿入し作成した。正常マウスC57BR/6とNMHC-B欠損マウス(B⁻/B⁻)とそのヘテロマウス(B⁺/B⁻)の胎児及び新生児マウス(P0)を95%エタノール・5%酢酸液で固定し、パラフィン切片(5μm)を作成しHE染色により組織学的に解析した。また発生過程におけるNMHC-A及びNMHC-Bの発現様式を特異抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。

結 果

NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスは、神経系と心臓に顕著な発生異常を示す。これらのマウスの頭部は、胎生12.5日(E12.5)から拡大し始め(Fig.1)、胎生15.5日以後次第に脳室拡大による水頭症の進行が肉眼的にも識別可能となり、すべてのマウスが胎生15.5日から出生直後(P0)にかけて死に至る。それに比較して頭部以外の体幹部位では、心肥大と心奇形が組織学的に認められるものの、それ以外の組織の発生は正常マウスと同様に進行し顕著な差が認められない。

NMHC-B及びNMHC-Aの発現様式

まず発生過程におけるNMHC-A及びNMHC-B機能を明らかにするために、特異抗体をもちいてこれらの分子の発現様式を免疫組織化学的に解析した。NMHC-Bは、

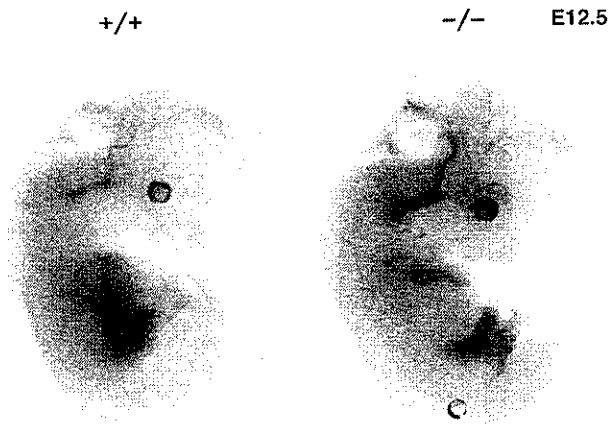


Figure 1. Abnormal enlargement of the head of a B⁻/B⁻ embryo at E12.5.

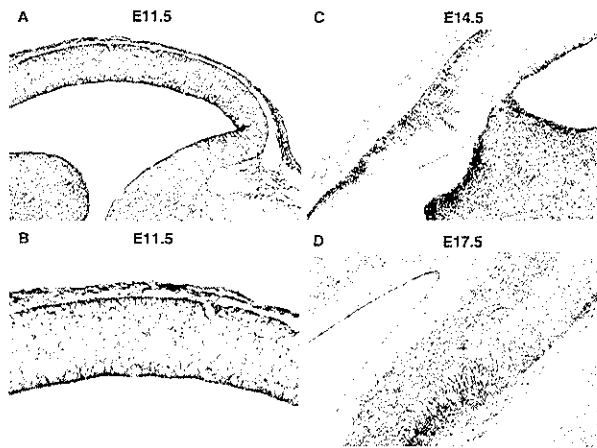


Figure 2. Immunohistochemical staining of NMHC-B of the embryonic brain (A) Sagittal section of the midbrain at a low magnification at E11.5. (B) Sagittal section of the midbrain at a high magnification. (C) Sagittal section of the posterior dorsal diencephalon and the anterior midbrain at E14.5. (D) Sagittal section of the hippocampus and subiculum at E17.5.

胎生11.5日から14.5日では全ての組織の全細胞に発現するが、胎生15.5日から21日にかけて神経系により限局して発現するようになる。神経系の初期発生の過程、胎生11.5日及び12.5日では、神経上皮細胞の脳室壁膜面と軟膜壁膜面すなわち脳の最内層と最外層の膜面に強く発現している (Fig.2A,B)。神経発生が進行し、神経細胞の分化、細胞移動、軸索伸展が活発な時期には、神経細胞の樹状突起、軸索に発現が一過性に増大する (Fig.2C,D)。一方相同遺伝子のNMHC-Aは、胎生12.5日、14.5日において脳毛細血管内皮細胞に顕著に発現し、神経系細胞で発現量がすくなく、NMHC-Bとは大きく異なる発現様式を示す。これらの二つのミオシン分子は、胎生17.5日

以後脳内発現量が次第に減弱し、成体型の発現様式に変化していく。成体で両分子は神経系の全細胞及び脳毛細血管内皮細胞に発現量が低いそれぞれ特異的な発現様式を示す。

NMHC-B欠損マウスの神経発生異常と水頭症

次に、NMHC-B欠損マウスの水頭症の原因と発生機序を探るために、胎生12.5日、13.5日、15日、16.5日、17.5日、18.5日、出生直後の脳を組織学的に解析した。これらのマウスは、発生の進行とともに脳室壁の局所破壊から始まり次第に重度の脳奇形を示すようになり、水頭症を発症し死に至るが、以下にその要点をまとめる。

1. 神経上皮細胞の細胞分裂異常

発生初期の神経上皮細胞は、脳の最内層と最外層の膜面の間で細胞周期に同期して特異的な細胞移動を示す。胎生12.5日の正常マウスでは、神経上皮細胞の分裂像が脳室壁に面する最内層で認められるが、NMHC-B欠損マウスでは、異常な分裂像が外層部においても異所性に観察される。

2. 脳室壁の破壊

神経発生初期では、マウスの脳室壁面は未分化な神経上皮細胞の細胞膜から構成されており、胎生後期に分化する上皮細胞の脳室壁面とは性質を異にする。胎生12.5日の正常およびヘテロマウス (B⁺/B⁻) では、最内層の神

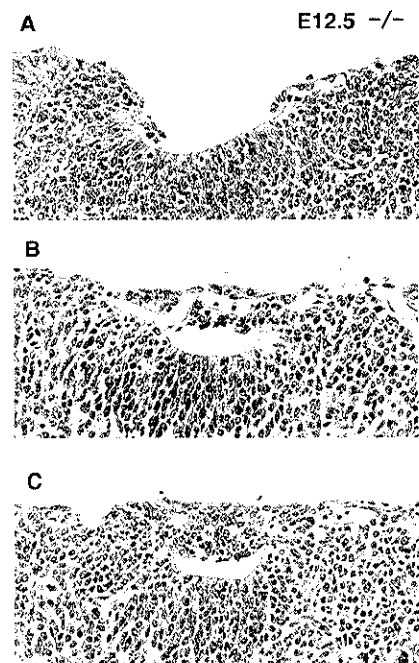


Figure 3. Disruption of the ventricular surface and the abnormal cell migration at the level of the fourth ventricle in a brain of a B⁻/B⁻ mouse at E12.5.

経上皮細胞は平滑な脳室壁面を形成し、その細胞突起は脳室壁面に伸展し強く接着している。それに対しNMHC-B欠損マウスでは脳室壁面が局所的に破壊され、神経上皮細胞の細胞突起が縮退し、細胞間接着が阻害されている像が脳室壁の各部位で認められる。

3. 神経系細胞の異常細胞移動

正常マウスでは脳室壁側の最内層で最終分裂を終えた細胞が、外層の最終分化部位へと規則的な細胞移動を示す。NMHC-B欠損マウスの脳室壁が破壊された部位では、細胞移動に規則的な方向性が認められず、細胞が脳室内に突出したり、脳深部に塊状に移動する像が認められる。神経上皮細胞が脳深部に一塊となって移動した部位では、中心が管状のロゼット形成が認められる (Fig. 3)。胎生13.5日以後細胞移動の異常がさらに進行すると、第3及び第4脳室に巨大な細胞塊が突出するようになる (Fig. 4)。これらの細胞塊は、未分化な神経上皮細胞のみならず種々の分化段階の神経細胞とグリア細胞を含み、脳室破壊によるアストロサイトの反応性増殖と性質を異にする。

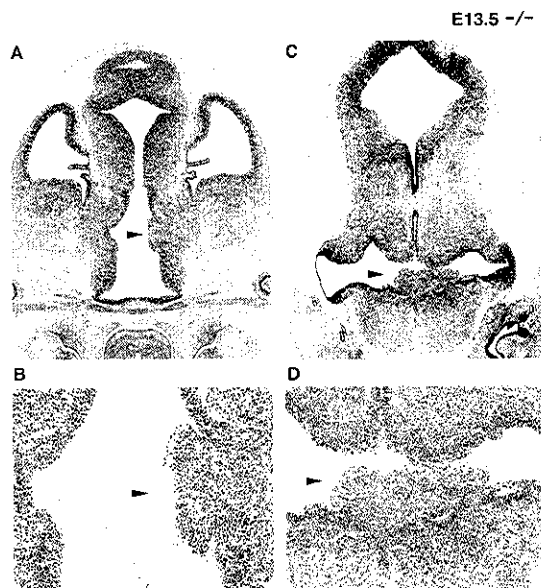


Figure 4. Disruption of the ventricular surface and protrusions of neural cells into the ventricles of a B⁻/B⁻ brain at E13.5. (A) Coronal section of a B⁻/B⁻ brain at the level of the third ventricle. (B) Large magnification view of the sulcus limitans of the third ventricle indicated by an arrowhead at (A). (C) Coronal section of a B⁻/B⁻ brain at the level of the fourth ventricle. (D) Large magnification view of the fourth ventricle indicated by an arrowhead at (C).

4. 異常脳室形成

発生がさらに進むとNMHC-B欠損マウスに異常脳室

形成が認められる。胎生15日の一例では、中脳水道の背側部に異所性に奇形脳室が形成された。このような大規模な脳室形成の異常は、発生初期の脳室壁の局所破壊と性質が異となる。発生初期において、脳室の形態形成はその後の神経発生の方向性を決めるうえで重要な役割を果たしており、このような例は、数は少ないものの貴重な一例である。

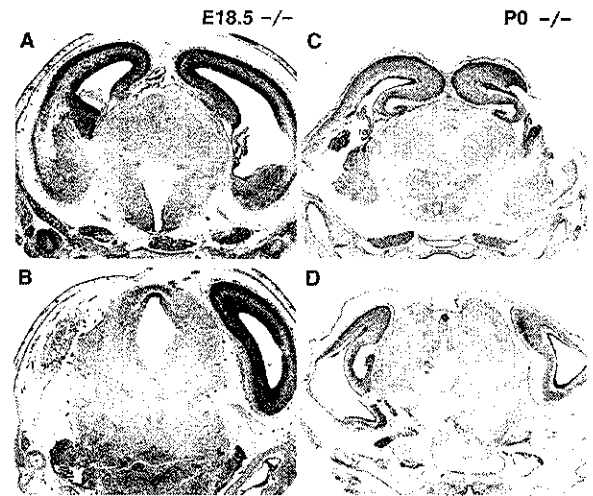


Figure 5. Destruction of the cerebral architecture due to hydrocephalus in a late-term (E18.5) and newborn (P0) B⁻/B⁻ mouse brain. Two levels of coronal sections of B⁻/B⁻ mouse brains are shown at E18.5 (A and B) and at P0 (C and D).

5. 脳室閉塞および脳室拡大と水頭症

すべてのNMHC-B欠損マウスは、胎生15日から出生直後にかけて側脳室と第3脳室が異常に拡大し、重度の水頭症を発症し死に至る (Fig. 5)。これらのマウスでは、第3脳室後背側部と中脳水道前部で、脳室狭窄、閉塞、融合等の異常が高頻度に認められる。中脳水道の後部と第4脳室、脊髓中心管は、種々の異常を示すものの完全に閉塞された例は無い。したがって胎生後期に急速に進行する水頭症の原因としては、第3脳室後背側部と中脳水道前部の脳室閉塞により脳脊髄液の循環障害が起きたものと推察される。またこの時期には、上衣細胞の脱落、脳浮腫、脳血管障害による2次的神経変性が認められる。

考 察

正常マウスの神経発生におけるNMHC-Bの発現様式とNMHC-B欠損マウスの神経発生異常を比較検討すると以下の水頭症の発生機序が示唆される。NMHC-Bは、神経の発生過程で、神経上皮細胞の脳室壁細胞膜に強く

発現しその細胞間接着に重要な役割を果たしている。NMHC-Bが欠損すると脳室壁面の破壊を始め脳室の異常形成・閉塞等の種々の脳奇形が発生する。第3脳室後背側部から中脳水道前部は、脳室系の狭い部位の一つであるが、この部位で脳室形成に異常を来すと脳室閉塞へと進行し、脳脊髄液の循環障害をおこし水頭症を発生するものと考えられる。

以上の仮説は、一つの可能性であるが、その他の可能性を否定するものではない。水頭症は脳脊髄液の産生、循環、吸収いずれの異常でも起こりうる。脳脊髄液の産生におけるNMHC-Bの役割はまだ明らかではない。興味深いことに既に胎生12.5日のNMHC-B欠損マウスで軽度の脳室拡大が認められる。この時期には脈絡叢の発生がまだ始まったばかりであり、脈絡叢による脳脊髄液の産生量はきわめて少ない。発生初期における脳脊髄液の産生に関しては、これまで研究がほとんどない。脳毛細血管を含む他の脳組織から脳脊髄液が産生されている可能性もあり、この点は今後の課題として残されている。脳脊髄液の循環に関しては、脳室壁の絨毛と微絨毛の運動にNMHC-Bがモーター分子として直接もしくは間接的に関与している可能性もあり現在その解析を進めている。また脳脊髄液の吸収に関しては、NMHC-Bがすべ

での髄膜に強く発現していることから、くも膜絨毛による脳脊髄液の吸収に関与している可能性がある。しかしながら髄膜にはNMHC-Aがさらに強く発現しており、NMHC-B欠損マウスで組織学的に顕著な異常は認められない。

これまでの解析結果からNMHC-B欠損マウスの水頭症の起因は、神経発生初期の脳室形成異常が第一原因ではないかと考えている。近年神経系発生に関与する遺伝子の欠損・異常マウスで水頭症をおこす例が報告されているが、基本的に同じメカニズムで説明できる可能性があり、これらマウスの詳細な比較検討が今後の重要な課題として残されている。またヒト胎児性水頭症のなかで脳奇形及び心奇形を伴う例では、NMHC-Bとその関連分子に異常が認められる可能性があり、今後これらの遺伝子解析を進めていく予定である。

謝 辞

本研究は、米国NIH Robert S. Adelstein博士と進めてきた長期共同研究の成果である。

胎生期正常脳発育におけるRadial fiberの免疫組織化学的検討

聖マリア病院病理部¹ 久留米大学化学²

中村 康寛¹ 山本 統彦² 熊丸 えり子²

諸 言

先天性水頭症は単独の奇形としてみられる事もあるが、種々の症候群に伴ってもみられる。またその原因としても髄液の産生、吸収の異常が示唆されるもの、髄液の循環路の異常、特に中脳水道の狭窄または閉鎖が証明されるものもあるが、これらの異常が指摘できない症例も多い。我々は、水頭症を髄液循環側、脳室側から見るのではなく、脳実質の発育の側から見ようと考えた。

藤田によると、胎生期の脳実質の発育は3つの時期に分けられる¹⁾。すなわち、マトリックス細胞のみよりなる第Ⅰ期（ヒト胎齢6週まで）、神経細胞に分化する第Ⅱ期（胎齢7～18-20週まで）、さらにグリア産生の第Ⅲ期（胎齢18-20週以後）で、これらはいずれもマトリックス細胞から分化するとされる。

脳発育の指標としては、この第Ⅰ～第Ⅲ期まですべてに存在するものが望ましい。そこで我々は Radial fiber に着目した。この Radial fiber は欧米では Radial glial fiber と呼ばれており、胎生早期より脳全長に存在しており、第Ⅱ期で neuroblast が脳室壁から皮質または深部灰白質に移動する際のガイドになる重要な構造物である²⁾。Radial fiber の免疫組織化学的マーカーとしては、nestin, GFAP, vimentin などいくつかのものが報告されている^{3,4)}、マウスでは RC1, RC2 抗体も radial fiber をよく認識するとされる^{5,6)}。

今回、我々はヒト正常発育脳での vimentin, GFAP と radial fiber との関係を検討し、さらに新しいモノクローナル抗体を作製し、正常発育脳での免疫組織化学的発現を検討した。

対象及び方法

奇形等の重症の合併症のない胎齢6週から40週のヒト胎児及び新生児14例、生後1ヶ月、6ヶ月の乳幼児、5才、14才の小児例、36-82歳の成人例5例の計23例の脳パラフィン包埋切片を検索材料とした。胎児、新生児例は脳室側から脳表にいたる全体を含む複数の切片を作製し、乳幼児、小児、成人例では大脳の各部位の切片を作製し検討した。発育期脳では、脳室側より Ventricular (V) zone, Subventricular (S) zone, Intermediate (I) zone, Cortical plate (CP), Marginal (M) zone に分けて検討した。

用いた抗体は市販品では、抗 vimentin 抗体（DAKO社製）、抗 GFAP 抗体（日本ターナー社製）で、我々が作製したモノクローナル抗体は KNY-379 と命名した。KNY-379 の作製は、抗原として胎齢14日の胎仔ラット大脳の homogenates と Ribi アジュバントとのエマルジョンを、メスの BALB/c マウスの足底皮下に3回注射した。腫大した鼠径部リンパ節から得られたリンパ球とマウス形質細胞腫株 FO1 細胞とを細胞融合して得られたハイブリドーマ細胞の培養上清を用い、胎齢12週のヒト胎児脳のパラフィン包埋切片で、組織的スクリーニングを行った。12週胎児脳で、radial fiber を認識していると思われるクローンを3回サブクローニングし、マウス腹腔に植え、腹水を得た。

Vimentin, GFAP, KNY-379 の3種のモノクローナル抗体を用いて、2段階 avidin-biotin 法（ニッスイ社製）により免疫組織化学的染色を行った。なお核染は原則として行っていない。また抗 vimentin 抗体検索切片は、あらかじめマイクロウエーブ処理を行った。

結 果

Radial fiberのvimentin, GFAP, KNY-379抗体による染色性

ヒト第Ⅰ期脳（胎齢6週）においては、vimentin, NY-379抗体では脳室壁から脳表まで（Vzone-Mzone）全長に渡ってRadial fiberをよく認識している（図1）。しかしながらGFAP抗体では全く陰性であった。

第Ⅱ期脳においては、胎齢8週では、Vimentinは全長に渡ってRadial fiberに発現しているが、特にVzone, Szoneで強く、Izone, CP, Mzoneになるにつれてやや弱くなっていく。一方、KNY-379はRadial fiberの全長を認識するが、CPでやや強く、Mzoneではびまん性に強く染まる。このMzoneの陽性像はRadial fiberとの直接の関連はないようである。

胎齢12週では（図2）、vimentinはradial fiberに陽性であるが、Vzone, Szoneに比して、Izone, CPではやや弱く、MzoneではCP側に短いが強く染まる部がある。KNY-379ではVzone, Szone, CPでは線維状に、Izoneでは脳室側とCP側ではややパターンが異なり、このzoneではRadial fiberのみを認識しているのではないように思われる。Mzoneはびまん性に染まるが、8週例ほど強くない。図では示さないが、胎齢15週脳でもVimentin, KNY-379はほぼ同じ染色所見を示す。GFAPに関しては第Ⅱ期の胎齢15週までは、全く陰性であった。胎齢16週-19週の脳標本はないので、第Ⅱ期から第Ⅲ期に移行する時期のデータはない。今後この時期の検索が必要と考えられる。

第Ⅲ期脳においては、胎齢22週では（図3）VimentinはRadial fiberに陽性であるが、この時期に分化するアストログリア細胞及びその突起にも陽性になる。また

第Ⅰ期（胎齢6週）

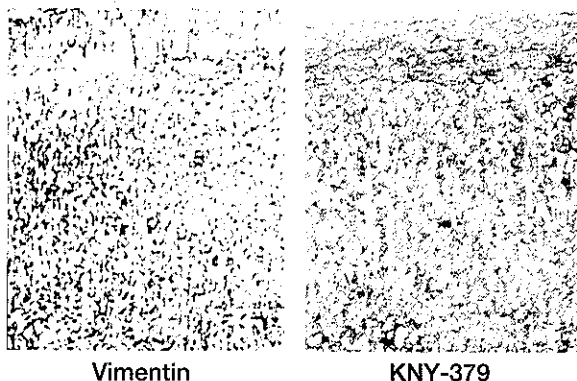


図1：胎齢6週脳。Vimentin, KNY-379共に全長に渡ってRadial fiberに陽性。

Vzone, Szone, Izoneには陽性であるが、CP内では殆ど陰性となる。同じような陽性所見はGFAPに関しても見られ、この時期のRadial fiberは始めてRadial glial fiberと呼ばれるようにグリアに分化している事が示唆される。一方、KNY-379ではVzone, S-zone, Izoneでは、びまん性に陽性に染まり、もはやRadial fiberにはassociateしていないように見える。しかしCPではfiber状に陽性であり、Mzoneにはびまん性に最も強く染まる。

Vimentinに関しては胎齢40週でも同様の所見を呈し、生後6ヶ月の脳でも部分的にはあるが、Radial fiberとして認識される陽性所見を見る。しかし5才脳では、Radial fiberは完全に消失している（図4）。GFAPは胎齢40週、生後6ヶ月脳では、グリア細胞とその突起に強くそまり、Radial fiberのマーカーとしては不相当である。KNY-379は40週脳ではVzone, Szoneにやや強くそまり、その他の部ではびまん性に染まるが、徐々に弱くなっていき、5才脳では殆ど染まらなくなる。しかし成人脳では、皮質の神経細胞の先端樹状突起に部分的に陽性になる。

KNY-379抗体での他の臓器での免疫組織化学的分布

KNY-379はもともとヒト胎児脳のパラフィン切片での免疫組織染色によりスクリーニングして得られた抗体であるので、種々の組織のパラフィン切片で免疫組織化学的検索を行い、その組織分布を検討した（図5）。脊髄では、神経路に沿って陽性で、大脳と異なり成人でもかなり強く陽性のままである。また胎児期から成人まで末梢神経に強陽性。心筋では胎生期には強陽性。生後次第に存在範囲が内膜側に限局してきて、成人心臓では殆ど陰性になる。横紋筋も心筋とほぼ同じ傾向をとる。気管支上皮や、脳室上衣の絨毛に限局して強陽性で、これは胎生期から成人まで同じである。胸腺の皮質細胞に陽性。また腎の遠位尿細管、集合管に陽性。更に興味ある事に妊娠時子宮内膜腺、間質のdecidua細胞に強陽性である。

考察及び結語

今回の正常ヒト脳発育における、Vimentin, GFAP, KNY-379の免疫組織化学的検索結果より、Vimentinは、脳発育の第Ⅰ期から第Ⅲ期までRadial fiberに存在していることが解った。Yachnisらは小脳においてVimentinは胎齢8週から生後8ヶ月までRadial fiberを認識するとしているが³⁾、今回の検索では、大脳では胎齢6週から生後6ヶ月までVimentinがRadial fiberを認識している事を

第Ⅱ期 (胎齡12週)

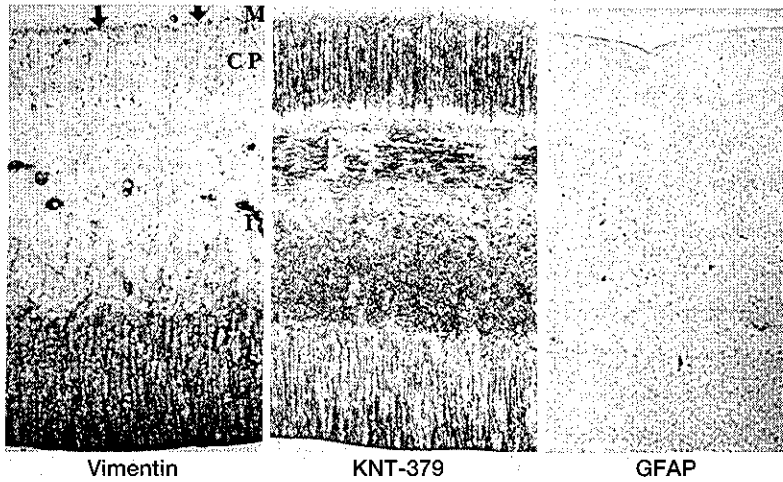


図2：胎齡12週の大脳。VimentinではVzone(V), Szone(S)に強く染まり、Izone(I), CPではやや弱い。CPとMzone(M)の移行部で、短いが強く染まる部を見る(矢印)。KNY-379ではCPで特に強くそまり、Izoneでは染色パターンに部分的な差があり、Radial fiberのみを認識しているのではないように思われる。GFAPは完全に陰性。

第Ⅲ期 (胎齡22週)

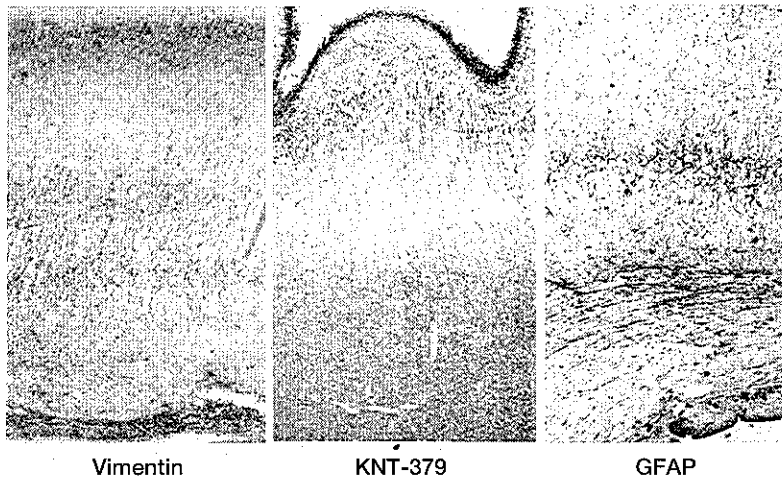


図3：胎齡22週の大脳。Vimentinは特にIzoneでRadial fiberをよく認識する。KNY-379はIzoneではびまん性に陽性で、CPでfiber状に陽性。Mzoneに強く染まる。GFAPはVimentinと同じように染まるが、astrocyteの胞体、突起の陽性所見もかなり見られる。

Vimentin

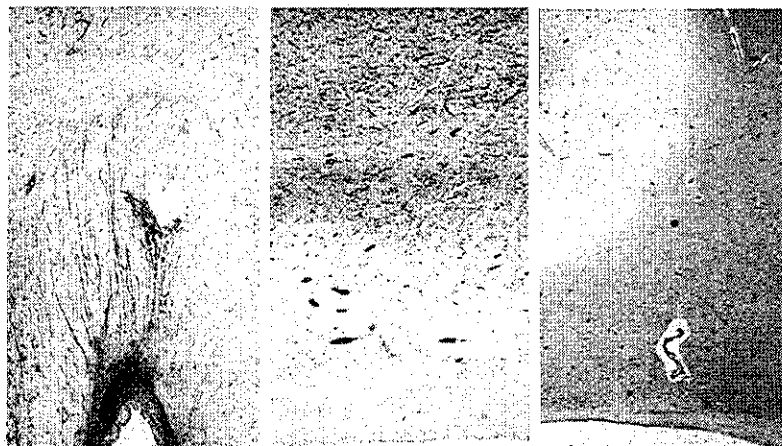


図4：Vimentinは生後6ヶ月の脳でも部分的にRadial fiberに陽性に染まっているが、5才脳では完全に陰性化している。

確認できた。ただしその存在様式は時期により、やや異なっている。すなわち胎児期早期ではVzoneからMzoneまでRadial fiberの全長に存在しているのに対し、徐々にVzone, Szone, Izoneまでで、CP内のRadial fiberには陰性になる傾向がある。これは単に染色性の問題であるのか、

あるいはVimentin自体の変化であるのか検討を要する。また第Ⅱ期脳においてはMzoneに部分的に陽性所見があることも注目し値する。これは発育脳におけるMzoneの特異性を示唆しているのかも知れない。

GFAPに関しては、今回の検索では、第Ⅰ期、第Ⅱ期

KNY-379の免疫組織化学的分布

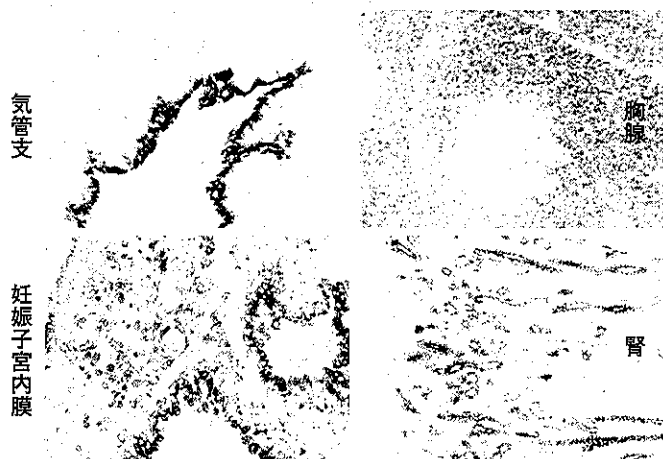


図5：KNY-379は気管支の繊毛に一致して強陽性。妊娠子宮の腺管上皮、間質の脱落膜細胞に部分的に強陽性。胸腺の皮質リンパ球に陽性。腎の遠位尿細管、集合管上皮に陽性所見を示す。

の少なくとも胎齢15週までは、大脳実質には全く発現してなく、胎齢8週から小脳では発現しているとする報告³⁾とは異なる。第Ⅲ期脳ではRadial fiberに発現しており、第Ⅲ期でのみRadial glial fiberと言う事が出来る。しかしGFAPは第Ⅲ期で盛んに分化してくるAstrogliaの胞体、その突起にも豊富に存在し、時間が経つにつれ反応性に増生したAstrogliaなどの陽性所見も混在し、Radial fiberのマーカーとしては不適當になってくる。

このように发育脳におけるRadial fiberのマーカーとしてはVimentinが優れている事を見いだしたが、他のマーカーを模索して、我々が独自にモノクローナル抗体KNY-379を作製した。免疫源として胎齢14日のラット大脳を選んだのは、この時期がヒト脳の第Ⅱ期に一致し、Radial fiberがneuroblastsのmigrationにおいて最も重要な役割を果たす時期に当たるからである。また抗体スクリーニングを胎齢12週のヒト胎児脳のパラフィン切片で行ったのは、パラフィン切片で、主としてRadial fiberの検索ができるような抗体を得るためであった。KNY-379は第Ⅰ、Ⅱ期では、確かにRadial fiberにassociateしているが、第Ⅲ期では、CPにはfiber状に存在するも、その他の部では、かなりびまん性に分布し、徐々に発現が弱くなっていく。またMzoneで強く発現するという特徴を有する。また成人では一部の皮質神経細胞の先端樹状突起に発現する。また脳幹部では、神経路に沿って陽性、末梢神経ではいずれの時期にも陽性であるので、发育期脳で重要な機能をもち、かつ成人では神経細胞の樹状突起、軸索に存在する蛋白であると考えられる。他の臓器の分布、たとえば、肺の繊毛などにも強く陽性所見を示す事より、あるいはチロシンリン酸化と関連した蛋白かもしれない。ヒト脳发育の第Ⅲ期において、役目を終え

たRadial fiberが消腿していくのにMzoneのチロシンリン酸化が関与している可能性が示唆されているが⁷⁾、このMzoneに強く陽性を示すKNY-379もこのような過程に関与しているのかも知れない。

今回の正常发育脳でのRadial fiberの検索は、今後の種々の水頭症におけるRadial fiberの異常の有無を調べる為の基礎的なデータを得る為に行った。水頭症例で、脳室上衣細胞がNestin, Vimentinを過剰発現する現象等が報告されている⁸⁾が、Radial fiberの发育、消腿にも何らかの異常がある事が十分に考えられる。またKNY-379の認識する抗原蛋白の解析も今後の課題である。

文 献

- 1) Fujita S: Transitional differentiation of matrix cells and its functional role in the morphogenesis of the developing vertebrate central nervous system. In: Current Topics of Developmental Biology (ed. TS Okada), Academic Press, N.Y., 1986, pp223-242
- 2) Rakic P: Radial glial cells: scaffolding for brain construction; in: Neuroglia (eds. H Kettenmann, BR Ransom), Oxford University Press, N.Y., 1995, pp746-762
- 3) Yachnis AT, Rorke LB, Lee VMY, Trojanowsky JQ: Expression of neuronal and glial polypeptides during histogenesis of the human cerebellar cortex including observations on the dentate nucleus. J Comp Neurol 334: 356-369, 1993
- 4) Colombo JA, Lipina S, Y-Oez A, Puissant V: Postnatal development of intermediate astroglial processes in the cerebral cortex of primates. Int J Dev Neurosci 15: 823-833, 1997
- 5) Culican SM, Baumrind NL, Yamamoto M, Pearlman AL: Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. J Neurosci 10: 684-692, 1990

- 6) Misson J-P, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness Jr VS: Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res* 44: 95-108, 1988
- 7) 藤田哲也、内藤岳史、梅園ルース、安田ゐう子：神経系
- 細胞移動の分子メカニズムと脳の形態発生. 小児の脳神経 24: 411-428, 1999
- 8) Takano T, Rutka JT, Becker LE: Overexpression of nestin and vimentin in ependymal cells in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 92: 90-97, 1996

Abstract

Immunohistochemical study of radial fiber in normal developing human brains

Yasuhiro Nakamura¹, Munehiko Yamamoto², Eriko Kumamaru²

Department of Pathology¹, St. Mary's Hospital and Department of Chemistry², Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

Radial fibers (RF) are present transiently in the developing mammalian brain and important for guiding the neuronal migration. Several immunohistochemical markers such as nestin, vimentin, GFAP and RC 1 or 2 have been reported to be associated with RF. We have selected vimentin and GFAP for the histochemical markers of RF in human developing brains. We also raised a monoclonal antibody against homogenates from brains of 14 embryonal day's rat fetuses and designated it as KNY-379. Vimentin was associated RF in all development stages from 6 weeks through 40 weeks of gestation and up to 6 postnatal months. GFAP was positive in RF of developing brain only the period after 20 weeks of gestation. KNY-379 was associated to RF during the period of 6-15 weeks of gestation, however, the distribution of it became more diffusely in the intermediate zone and disappeared in postnatally. The abnormality of RF should be determined in the brains with hydrocephalus.

厚生省特定疾患 難治性水頭症調査研究班 (主任研究者 山崎麻美)
平成11年度研究報告書 平成12年3月

正常胎児、新生児脳におけるL1、MSI1発現様式の免疫組織学的検討

大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科¹ 国立大阪病院臨床研究部² 国立大阪病脳神経外科³
聖マリア病院病理部⁴ 大阪大学大学院医学系研究科神経機能解剖学⁵

金村米博^{1,2} 山崎麻美³ 中村康寛⁴ 榊原伸一⁵ 岡野栄之⁵

目 的

先天性水頭症の発症に関与する遺伝子は現在までに幾つか報告されている。その1つは、L1CAM遺伝子 (L1) である^{1,7,13})。L1は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子量約200 kDaの膜貫通高分子糖蛋白質で、ヒトL1遺伝子はX染色体 q28に存在する。現在までに101家系、93種類のL1遺伝子異常が報告されている^{2,5,6})。一方、L1以外の遺伝子として近年、神経幹細胞に発現するMusashi遺伝子のmouse-Musashi-1 (m-Msi1) のknock-out miceが先天性水頭症を発症することが報告された。Musashi遺伝子は2個のRNA認識モチーフ (RNA recognition motif: RRM) を有するRNA binding proteinでその構造はDrosophilaからヒト (human Musashi homolog-1: MSI1) に至るまで生物種の違いを超えて広く保存されている⁴)。Mouse-Msi1 knock-out miceでは生後早期に高頻度 (70-80%) に水頭症が発症し、中脳水道における脳室上皮細胞の異常増殖の組織学的特徴を有する。しかしMSI1はもちろん、L1においても実際のヒト先天性水頭症患者剖検脳においてL1およびMSI1蛋白の発現の状態を病理学的に検討した報告は今だほとんど存在しない¹¹)。

先天性水頭症発症に関与すると考えられるL1およびMSI1の水頭症発症のメカニズムを明らかにするために、今回私たちは正常胎児脳における発現様式を免疫組織学的に分析した。

対象と方法

対象は母胎疾患のため人工中絶したヒト正常胎児 (12週齢) 及びIRDSで死亡した未熟児新生児脳 (24週齢、32週齢) である。10%ホルマリン固定し、その後パラフィン包埋して永久標本を作製、切片は5 μmに薄切した標本をAPSコートスライドガラス上にのせ作成した。正常胎児脳標本を水頭症研究目的に使用することは国立大阪病院医学倫理委員会に申請し、承認されている。L1およびMSI1の解析は1次抗体としてL1 (rabbit anti-L1 polyclonal antibody、Case Western Reserve大学 V. Lemmon 教授より贈与)、MSI1 (rat anti-mouse-Musashi monoclonal antibody: clone 14 H 1) を用いて行った。それ以外の抗体としては、神経前駆細胞のマーカーとしてHu (mouse anti-Hu monoclonal antibody、clone 16 A 11、Oregon 大学 Marusich博士より贈与)、分裂細胞のマーカーとしてKi-67抗原に対するモノクローナル抗体 (mouse anti-Ki-67 monoclonal antibody: clone MIB-1、Immunotech社、フランス) を用いた。それぞれのモノクローナル抗体を1種類のみ、単独で用いた免疫組織染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法 (ABC-ペルオキシダーゼ法) にて行った。要約すると組織切片をキシレンで脱パラフィン化した後、アルコール濃度を段階的に下げて中和する。クエン酸バッファー (0.01 M、pH 6) で切片のマイクロウエイブ処理を行った後、0.3%過酸化水素水/メタノールで内因性ペルオキシダーゼを不活化した。5%正常血清 (ヤギ、もしくはウサギ) でブロッキング後 (室温20分)、1次抗体を室温で1時

間反応させた。PBSでの洗浄後ビオチン化2次抗体（ヤギ、もしくはウサギ製）を室温で1時間反応させた。PBSでの洗浄後、ABC試薬（VECTASTAIN Elite ABC kit、フナコシ）を室温で30分間反応させ、0.05%DAB / 0.01%過酸化水素水にて発色させた。MSI1とHu抗体を同時に用いた二重染色はMSI1をABC-ペルオキシダーゼ法、DAB発色、Hu抗体をABC-アルカリフォスファターゼ法（VECTASTAIN, ABC- APキット、フナコシ）、BCIP/NBT発色を用いて行った。

結 果

1. L1

L1は24週齢では、大脳皮質分子層（molecular layer）および上衣下層（subventricular zone）直下の深部白質において、脳室壁に平行に走行する形で層状に強く発現していた（図1）。

32週齢になるとこれら領域での発現に加え、大脳皮質直下の白質での発現量が増加する傾向があった。また大脳皮質Ⅲ-Ⅵ層では分子層および上衣下層で見られる神経線維の走行に直交する方向の線維での発現が顕著になる傾向があった。小脳においては、32週齢で外顆粒層（external granular layer）の内側から小脳分子層にかけて層状の強いL1の発現を見た（図2）。

2. MSI1

MSI1は12週齢では上衣層（ventricular zone）から上衣下層にかけて存在する円形状細胞の多くに強く発現していた。この領域は分裂細胞のマーカであるMIB-1抗体陽性である細胞が多く存在していた。神経前駆細胞のマーカであるHuはMSI1陽性細胞のほとんど存在しない中間層（intermediate zone）から皮質板（cortical plate）部分に位置する細胞に発現しており、MSI1陽性細胞とHu陽性細胞の局在は相補的な位置にあった。MSI1とHu抗体の両抗体を用いた二重染色では、ほとんどの細胞はMSI1もしくはHuのいずれかのみを発現しており、MSI1、Huの両蛋白を同時に発現している細胞は上衣下層にごく僅かに存在するのみであった（図3）。

24週、32週と発育段階が進むにつれて上衣層および上衣下層の分裂細胞、およびMSI1陽性細胞の数は急速に減少したが、上衣層の細胞の多くは32週齢でもMSI1陽

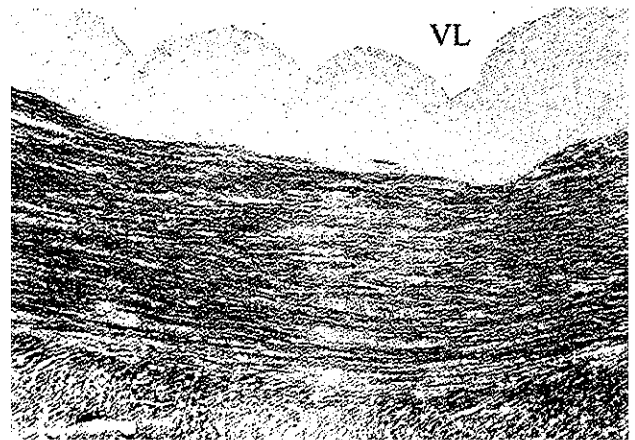


図1) ヒト24週齢胎児脳における脳室周囲組織でのL1発現
L1は上衣下層の深部白質に層状の存在する神経線維に発現がみられた。
VL:脳室、倍率 400倍

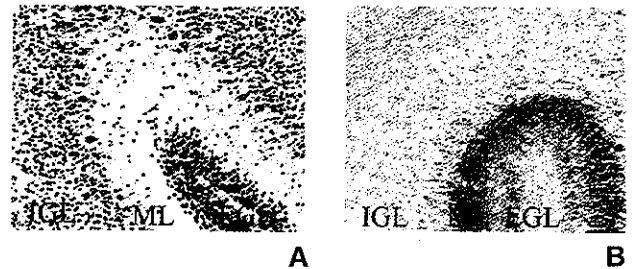


図2) ヒト32週齢胎児脳における小脳でのL1発現
L1の発現は小脳分子層と外顆粒層の内側部分に層状に観察された。A) ヘマトキシリン染色 B) L1免疫染
EGL: 外顆粒層, IGL: 内顆粒層, ML: 分子層、倍率 400倍

性の状態を保ち、少数のHu陽性細胞が上衣下層に存在した。（図4A）。小脳では32週齢において、外顆粒層とプルキンエ細胞層にMSI1を強く発現する細胞が存在し、内顆粒層（internal granular layer）にも弱くMSI1を発現する細胞が存在した。Huはプルキンエ細胞で弱く、内顆粒層の顆粒神経に強く発現されていた。MSI1、Huの両方を発現する細胞はほとんど存在しなかった（図4B）。

考 察

L1は胎生期の神経細胞の成長円錐や軸索の膜表面などで強く発現し、神経系発生過程における細胞移動、神経突起進展、神経線維の束化に関する機能を持つと考えられている。今回私たちがおこなったL1蛋白の発現様