

る頭部や菱脳におけるこのような発現パターンは、*sox10* の発現パターンと極めて類似した発現であることが両者の比較から明らかになった。胎生 9.5 日では頭部神経堤細胞由来の組織である、三叉神経節などの脳神経に発現が強く、また神経管全体に弱い発現が観察された。このように、*Sip1* は主に神経堤細胞やそれに由来する組織で比較的強い発現が観察された。このことは SIP1 がこれらの細胞や組織において、何らかの役割を担っていることを示唆している。

(2) *Sip1* ノックアウトマウス胚における神経組織形成異常—頭部および神経管について

(a) 頭部. 胎生 8.5 日における頭部においては、特に前頭部の形成が阻害されていた。前頭部神経隆起 (anterior neural ridge) における *fgf8* の発現は終脳を含む前頭部の形態形成に重要な役割を担っているとされている。そこで *Sip1* ノックアウトマウス胚における *fgf8* の発現を観察したところ、前頭部神経隆起における *fgf8* の発現がほとんど観察されず、またこのことと呼応して *otx2* の発現も低下していた。このことは *Sip1* が終脳を含む前頭部の形態形成に基本的に重要な役割を担っていることを示している。また胎生 8.5 日の前頭部においては、野生型ではすでに将来の眼形成の基部となる optic pit (眼窩) が形成されているが、ノックアウトマウス胚においては optic pit の形成が観察されない。

(b) 神経管. さらに体幹部においては、頭尾軸全体にわたって神経管が閉じていなかった (図 a,b)。またその横断組織切片像から、神経管の神経上皮は形成されているが、非神経外胚葉との境界に生じる神経ヒダ構造 (neural folds) が明確ではないようである。次にこのような表現型との関連性が予想される種々のマーカー遺伝子の発現解析を行った。その結果、*Sip1* ノックアウトマウス胚においては、胚盤葉上層 (epiblast) からの神経板形成に伴ってその神経板で消失すべき *E-cadherin* の発現が持続しているのがわかった。さらに epiblast から神経板の形成に伴って、神経板で発現が開始しその後頭部及び神経管でその発現が維持される *sox2* の発現が、*Sip1* ノックアウトマウス胚においては野生型と比較して低下していることが分かった (図 e,f)。

(3) SIP1 ノックアウトマウス胚における神経組織形成異常 - 神経堤細胞について

神経堤細胞で発現し、その増殖と分化において重要な役割を担っていること

がわかっている *sox10* の発現が、特に頭部および脳梁部において *Sip1* の発現と極めて類似していた。また最近明らかになったヒト SIP1 欠損症は、Hirschprung 病（頸部神経堤細胞から由来する腸管神経節の欠失によって起こる）患者の中から発見されており、SIP1 の機能と神経堤細胞の発生においてその関連性が指摘されていた。

そこで *Sip1* ノックアウトマウス胚において、*sox10* を含めた、種々の神経堤細胞マーカー遺伝子の発現解析を行った。その結果、頭部での *sox10* の発現は野生型と比較して減少あるいは同程度のレベルで観察されたが、詳細に調べると、遊走する神経堤細胞がほとんど観察されなかった。このことは、他の神経堤細胞のマーカーである *AP2* を用いても同様であった。一方、頸部 (vagal) での *sox10* の発現は全く消失していた (図 c,d)。同様に頸部神経堤細胞での発現も観察されている *msx1* の発現も消失していた。これらの結果は SIP1 が神経堤細胞の正常な発生およびその後の分化に必須であることを示している。

D. 結論

SIP1 の神経組織形成過程における機能について

上述したように、*Sip1* ノックアウトマウス胚においては、神経板における *sox2* 遺伝子の発現の低下、および消失すべき *E-cadherin* 遺伝子の持続的発現が観察された。このことは epiblast から神経板を生じる過程（神経誘導）か、あるいは生じた神経板細胞の正常な維持に何らかの障害を有していることを示唆している。仮に正常な神経板細胞が生じていないとすると、上述した神経堤細胞の異常はその二次的な結果である可能性も考えられる。またこのことは、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュの系において指摘されているように、SIP1 が初期胚における神経組織の形成に重要な役割を担っていることを示しているのかもしれない。今後はこのような観点から、SIP1 の初期神経組織形成過程における機能についてさらに詳細な解析を行いたい。

E. 研究発表

(原著論文)

1. Higashi Y, Maruhashi M, Nelles L, Van de Putte T, Verschueren K, Miyoshi T, Yoshimoto A, Kondoh H, Huylebroeck D: Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* 32: 82-84, 2002

2. Muta M, Kamachi Y, Yoshimoto A, Higashi Y, Kondoh H: Genes Distinct roles of SOX2, Pax6 and Maf transcription factors in the regulation of lens-specific delta1-crystallin enhancer. *Cells* 7: 791-805, 2002
3. Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y: Smad interacting protein-1 (Zfhx1b) deficient mice reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease - mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 73, 465-470, 2003

(総説)

1. 東雄二郎, 若松延昭: zfhx1 ファミリーとその欠損症. *生化学* 75: 27-36, 2003

(学会発表)

1. 丸橋光次, Tom Van de Putte, Danny Huylebroeck, 近藤寿人, 東雄二郎: マウス胚の体節分節化過程における *SIP1* 遺伝子の役割. 日本発生生物学会 (横浜) 2002.5.21-23.
2. 好本あき, 東雄二郎, 近藤寿人: 転写制御因子 SIP1 がレンズ発生で果たす役割; レンズ特異的な遺伝子欠失マウスによる解析. 日本発生生物学会 (横浜) 2002.5.21-23.
3. 好本あき, 東雄二郎, 近藤寿人: 転写制御因子 SIP1 がレンズ発生で果たす役割; レンズ特異的な遺伝子欠失マウスによる解析. 日本分子生物学会年会 (横浜) 2002.12.11-14.
4. 山田憲一郎, 伊藤美武, 石原尚子, 山田尚一, Tom Van de Putte, 近藤 寿人, Danny Huylebroeck, 島田厚良, 東雄二郎, 若松延昭: SIP1 ヘテロ変異マウスに見られる脳梁欠損とその分子病態. 日本分子生物学会年会 (横浜) 2002.12.11-14.
5. Tom van de Putte, 丸橋光次, Annick Francis, Luc Nelles, 近藤寿人, Danny Huylebroeck, 東雄二郎: *Sip1* ホモ欠失変異マウスにおける神経組織の形成異常. 日本分子生物学会年会 (横浜) 2002.12.11-14.

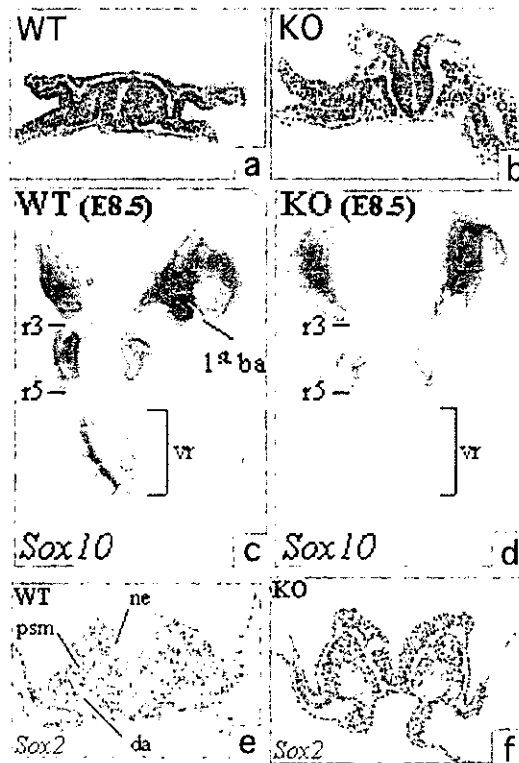


図. *Sip1* ノックアウトマウス胚（胎生 8.5 日）の表現型

左側 (WT) は野生型、右側 (KO) はノックアウトマウス胚を示す。(a,b), H.E. 染色横断切片像。KO 胚では神経管が閉じていない。(c,d), *sox10* による whole mount *in situ* hybridization. 頸部 (vr, vagal region) での *sox10* の発現が欠失している。(e,f), *sox2* による切片の *in situ* hybridization. KO 胚では *sox2* の発現が低下している。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

HSCR-MR 症候群モデル（Sip1 ヘテロ欠失）マウスの表現型と
脳内発現遺伝子の解析

主任研究者：若松 延昭

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学部長）

研究協力者：山田 憲一郎、山田 裕一

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学）

伊藤 美武 （愛知医科大学 動物実験センター）

石原 尚子 （名古屋大学大学院 医学研究科 小児科）

研究要旨

SIP1 欠損症では、著明な脳発達障害と様々な神経堤障害が出現する（HSCR-MR 症候群）。我々は、Sip1 ヘテロ欠失変異マウス（Sip1^{+/-}）を2系統（ICR、C57BL/6J）と交配し純系化した。SIP1 欠損症は ZFHx1B 遺伝子（ZFHx1B）のハプロ不全で発症（一方の染色体のみに異常が見られる）するので、Sip1^{+/-}の終脳の解析によりヒトの SIP1 欠損症に見られる知的障害の分子病態が明らかになると期待される。Sip1^{+/-}は、純系化した ICR と C57BL/6J の両系統において、野生型にくらべて体重の増加が遅延していた。さらに、戻し交配をくり返している途中に、ICR の Sip1^{+/-}のメスでは膣閉が、ICR の老齢（約2才齢）Sip1^{+/-}では、後肢の機能不全と脊椎の異常が観察された。純系化した胎児の終脳について解析すると E17.5 の ICR Sip1^{+/-}の全てのマウスに SIP1 欠損症に見られる脳梁欠損が出現した。脳梁欠損は神経軸索の形成や伸長に異常がある場合にも出現するので、ヒト脳では正常な神経終末でのシナプス形成が障害されていると考えられる。そこで E15.5 の胎児の終脳より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により神経軸索の伸長などに関与する多数の遺伝子の発現量を野生型と Sip1^{+/-}で比較検討した。Sip1^{+/-}において、Zfhx1b の発現量は約半分に低下し、逆に Sip1 により転写の抑制を受ける Cdh1 (E-cadherin)は2倍以上に上昇していた。神経軸索の伸長に関与すると考えられる蛋白質である Mena は約 70 %に低下していた。一方、アクチンの重合脱重合

を制御すると考えられている RhoA、Rac1、Cdc42 などの低分子 G 蛋白質や脳梁形成時に神経軸索の走行に関与する Slit2 や Robo1 には著明な変化は見られなかった。今後、さらに多くの Sip1+/- の終脳での異常発現遺伝子を同定することにより、SIP1 欠損症の著明な知的障害の分子病態が解明されると期待される。

A. 研究目的

SIP1 欠損症では、著明な知的障害、運動発達遅滞などの脳発達障害と特徴的な顔貌、先天性心疾患、Hirschsprung 病などの神経堤障害が見られる (HSCR-MR 症候群)。我々は、SIP1 欠損症のモデルとして Sip1 ヘテロ欠失変異マウス (Sip1+/-) を 2 系統 (ICR、C57BL/6J) と交配し純系化した。本年度の研究目的は、同マウスの終脳で異常に発現している遺伝子を同定し、SIP1 欠損症の主症状である知的障害の分子病態の解明を行うことである。

B. 研究方法

1) Sip1+/- の形態的な異常の有無 (成長や構造異常等) の解析

SIP1 欠損症に見られる特徴的な顔貌と知的障害に注目し、a) 出生直後 (P0) のマウスの頭部の形態異常の有無を観察した。b) 胎生 15.5 日 (E15.5) 及び E17.5 の胎児脳を Kluver-Barrera 法等で染色し、形態異常の有無について解析した。

2) 終脳における遺伝子発現の定量

E15.5 の ICR 系統の Sip1+/- (もどし交配 7 回、N=7) の終脳より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて種々の遺伝子の発現量を定量した。

C. 研究結果

Sip1+/- では以下の形態異常が認められた。1) ICR、C57BJ の両系統ともに Sip1+/- は野生型にくらべて体重の増加が遅く、成長遅延が見られた。2) ICR 系統の Sip1+/- のメスでは、陰閉が出現した。3) ICR 系統の老齢 (約 2 才齢) Sip1+/- では、後肢の機能不全と脊椎の異常が観察された。4) E17.5 の ICR 系統の Sip1+/- (N=7) の全てに、脳梁欠損が見られた (図 1)。しかし頭部の形態的な変化 (ヒトに見られる眼間解離や顔面中央部の陥凹など) や著しい行動異常は見られなかった (図 1)。

脳梁欠損は神経軸索の形成や伸長に異常がある場合に生ずると考えられて

おり、神経ネットワーク (シナプス形成) が機能不全になっている可能性を示唆している。そこで脳梁が形成される直前の Sip1+/- の E15.5 胎児の終脳より total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて様々な遺伝子 (特に神経軸索の伸長に関与する遺伝子) の発現量を野生型と比較検討した。Sip1+/- において、Sip1 自体の発現量は約半分に低下していた。逆に Sip1 により転写抑制を受ける遺伝子である Cdh1 (E-cadherin) は、約 2.5 倍に上昇していた (図 2)。さらに、神経軸索の伸長に関与する因子である Mena は約 70% に低下していた (図 3)。一方、actin の重合脱重合を制御すると考えられている RhoA、Rac1、Cdc42、脳梁形成時に神経軸索のガイダンスを制御する Slit2 や Robo1 に変化は見られなかった (図 3)。

D. 考察

ヒトの SIP1 欠損症の症例には重度の知的障害が見られる。知的障害は脳発達過程において特に海馬と前頭前野におけるシナプスの形成障害が病因と考えられている。Sip1+/- でみられた脳梁欠損の分子病態を明らかにすることは、本症に見られる知的障害の病因解明に有効であると考えられる。今回、マウス終脳での遺伝子発現量の定量に用いた RT-PCR 法では、① Sip1 が Sip1+/- で野生型に比較して約半分に低下していた、② Sip1 により転写抑制を受ける遺伝子である Cdh1 が約 2.5 倍に上昇していたことにより、他の遺伝子の発現量の正確な定量が可能であると考えられる。

E15.5 の終脳における遺伝子発現に異常が見られた遺伝子 (Mena) は、胎生期の神経軸索の伸長に関与することがノックアウトマウスの研究により明らかになっている。Mena は、伸長している神経軸索の先端部分である成長円錐に局在し、アクチンの重合を制御する Profilin に結合する。Mena のホモ欠失マウスでは脳梁欠損が出現するので、Mena の発現の減少が Sip1+/- の脳梁形成に関与するか否か、今後の研究が必要である。

一方、神経軸索の伸長に重要な働きをしている遺伝子の中でも、Sip1+/- の E15.5 胎児の終脳における発現量に変化が見られなかったものも多い。Cdc42 は、Rho ファミリーのの一つとして actin 重合のシグナル伝達を担っている。構造的に脳梁形成に必要である glial wedge などのグリア細胞の分化誘導に必要である Nfia や、glial wedge などから分泌され、神経軸索のガイダンスを行う Slit2、その receptor である Robo1 も発現量に変動は見られなかった (図 2)。Nfia

のホモ欠失マウスも脳梁欠損を示す。今後は、ジーンチップなどを用いて網羅的に Sip1+/-で変動が見られる遺伝子を同定することが重要である。それらの遺伝子の解析により、神経軸索の伸長から脳梁形成に到る過程のどの段階に Sip1 が関与しているのかが明らかになると期待される。

E. 結論

Sip1+/-では、脳梁欠損、脊椎の異常、膣閉等が見られ、Sip1 はヒトと同様にマウスにおいても正中構造の形成に重要であることが明らかになった。正中構造の形成には正中を越える軸索の走行が必須であり、Sip1+/-で見られた脳梁欠損の分子病態を解明することにより本症の知的障害の病因が明らかになると考えられる。

F. 研究発表

原著論文

1. Nagaya M, Kato J, Niimi, N, Tanaka S, Wakamatsu N: Clinical feature of a form of Hirschsprung's disease caused by a novel genetic abnormality. *J Pediatr Surg* 37: 1117-1122, 2002
2. Yoneda M, Fujita T, Yamada Y, Yamada K, Fujii A, Inagaki T, Nakagawa H, Kishikawa M, Shimada A, Nagaya M, Azuma T, Kuriyama M, Wakamatsu N: Late infantile Hirschsprung disease-mental retardation syndrome with a 3-bp deletion in *ZFHX1B*. *Neurology* 59: 1637-1640, 2002.

総説, 報告

1. 若松延昭, 長屋昌宏: ヒルシュスプルング症候群. *ゲノム医学* 2: 259-264, 2002.
2. 東雄二郎, 若松延昭: *zfx1*ファミリーとその欠損症. *生化学* 75: 27-36, 2003.
3. 山田裕一, 野村紀子, 若松延昭, 小笠原信明, 谷口敦夫, 鎌谷直之: 新しく同定されたLesch-Nyhan症候群の遺伝子変異. *痛風と核酸代謝* 27: 36, 2002.

学会発表

・(国内)

1. 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭: 遺伝子診断により早期に確定診断した Rett 症候群の 3 例. 日本小児科学会東海地方会 (名古屋) 2002.5.12.
2. 若松延昭: 多様な脳・神経堤発達障害を呈する SIP1 欠損症. 特別講演, 多摩小児神経懇話会 (府中) 2002.5.18.
3. 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 松本昭子, 宮崎修次, 早川智恵美, 水野誠司, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭, 山中 昴, 長屋昌宏: SIP1 欠損症の中枢神経症状について. 日本小児神経学会 (仙台) 2002.6.28.
4. 若松延昭: 多様な臨床症状を呈する Hirschsprung Disease-Mental Retardation 症候群の病因遺伝子. シンポジウム「Hirschsprung 病の基礎と臨床」, 日本小児病理研究会 (東京) 2002.9.7.
5. 山田裕一, 山田憲一郎, 石原尚子, 野村紀子, 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 大屋一博, 瀬川昌巳, 三牧正和, 米田誠, 長屋昌宏, 若松延昭: 神経堤障害を伴う知的障害、ヒルシュスプルング病-MR 症候群の ZFHXB 変異. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002.11.14.
6. 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一, 三浦清邦, 加藤純爾, 桑原直樹, 長屋昌宏, 若松延昭: 2q22-23 の部分欠失を有する SIP1 欠損症 3 症例の臨床像と遺伝子異常. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002.11.14.
7. 山田憲一郎, 小野教夫, 大木隆史, 石原尚子, 三浦清邦, 熊谷俊幸, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭: 染色体 6q21 と 12p13 で相互転座が見られ、重度の発達障害を呈する症例の病因遺伝子の解析. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002.11.14.
8. 山田憲一郎, 伊藤美武, 石原尚子, 山田裕一, T. Van de Putte, 近藤寿人, D. Huylebroeck, 島田厚良, 東雄二郎, 若松延昭: Sip1 ヘテロ欠失変異マウスに見られる脳梁欠損とその分子病態. 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.12.
9. 水沼真紀子, 山田裕一, 山田憲一郎, 孫田信一, 若松延昭, 藤森 新: Lesch-Nyhan 症候群患者に認めた X 染色体逆位の遺伝子構造の解析. 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.13.
10. 石原尚子, 山田裕一, 山田憲一郎, 三浦清邦, 大木隆史, 熊谷俊幸, 加藤純爾, 桑原直樹, 小林康子, 米田誠, 長屋昌宏, 若松延昭: Sip1 欠損症の多様な臨床型と遺伝子異常. 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.14.
11. 山田裕一, 若松延昭, 小笠原信明: HPRT 欠損症の遺伝子解析. シンポジウ

ム I 「先天性プリン・ピリミジン代謝異常症 -最近の進歩-」, 日本痛風・核酸代謝学会 (東京) 2003.2.13.

12. 水沼真紀子, 山田裕一, 若松延昭, 小笠原信明, 渡辺浩一, 小片展之, 山内俊一, 藤森 新: Lesch-Nyhan 症候群患者に新しく同定された転座変異の解析. 日本痛風・核酸代謝学会 (東京) 2003.2.13.

(国際学会)

1. Yamada K, Ono T, Ishihara N, Yamada Y, Ohki T, Miura K, Kumagai T, Sonta S, Wakamatsu N: A case of severe developmental delay with pharyngeal anomaly due to a *de novo* translocation [46, XY, t(6;12)(q16;p12)]. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore, USA) 2002.10.16.
2. Yamada Y, Nomura N, Yamada K, Igarashi N, Wakamatsu N: Molecular characterization of a large genomic deletion including a part of the *HPRT* gene responsible for the Lesch-Nyhan. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore USA) 2002.10.19.
3. Ishihara N, Yamada K, Yamada Y, Miura K, Ohya K, Nakayama A, Yoneda M, Nagaya M, Wakamatsu N: Molecular characterization of *ZFHXB* in patients with SIP1 deficiency. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore USA) 2002.10.18.

班会議

1. 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一, 若松延昭: SIP1 欠損症の多様な臨床像: 2q22 欠失症例に見られる特異な症状について. 平成 14 年度厚生科学研究 (こころの健康科学事業、H13-こころ-018) 第 1 回班会議 (名古屋) 2002.9.21.
2. 若松延昭, 東雄二郎: Sip1 ヘテロ欠失変異マウスに見られる脳異常所見について. 平成 14 年度厚生科学研究 (こころの健康科学事業、H13-こころ-018) 第 1 回班会議 (名古屋) 2002.9.21.
3. 若松延昭, 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一: SIP1 欠損の臨床症状を呈する 2q22-23 欠失症例の分子遺伝学的解析. 平成 14 年度厚生科学研究 (こころの健康科学事業、H13-こころ-018) 第 2 回班会議研究発表会 (名古屋) 2003.2.28.
4. 山田憲一郎, 石原尚子, 山田裕一, 若松延昭: Sip1 ヘテロ欠失マウスの終

脳における異常発現遺伝子の同定. 平成 14 年度厚生科学研究（こころの健康科学事業、H13-こころ-018）第 2 回班会議研究発表会（名古屋）2003.2.28.

講演

1. 若松延昭：遺伝子と遺伝病：知的障害の病因遺伝子について. 愛知県臨床検査技師会, 遺伝子・染色体研究班講演会（名古屋）2002.11.23.
2. 若松延昭：先天的遺伝子異常の研究の現状. 愛知県コロニー平成 14 年度療育関連職員研修Ⅲ（春日井）2002.12.12.
3. 若松延昭：知的障害の病因遺伝子の同定と分子病態解明へのアプローチ. 徳島大学大学院講義（徳島）2003.2.21.
4. 若松延昭：SIP1 欠損症：神経堤障害、てんかんを呈する知的障害患者の病態解明と治療法の開発. 平成 14 年度厚生科学研究（こころの健康科学事業 中間・事後評価委員会（東京）2003.3.7.

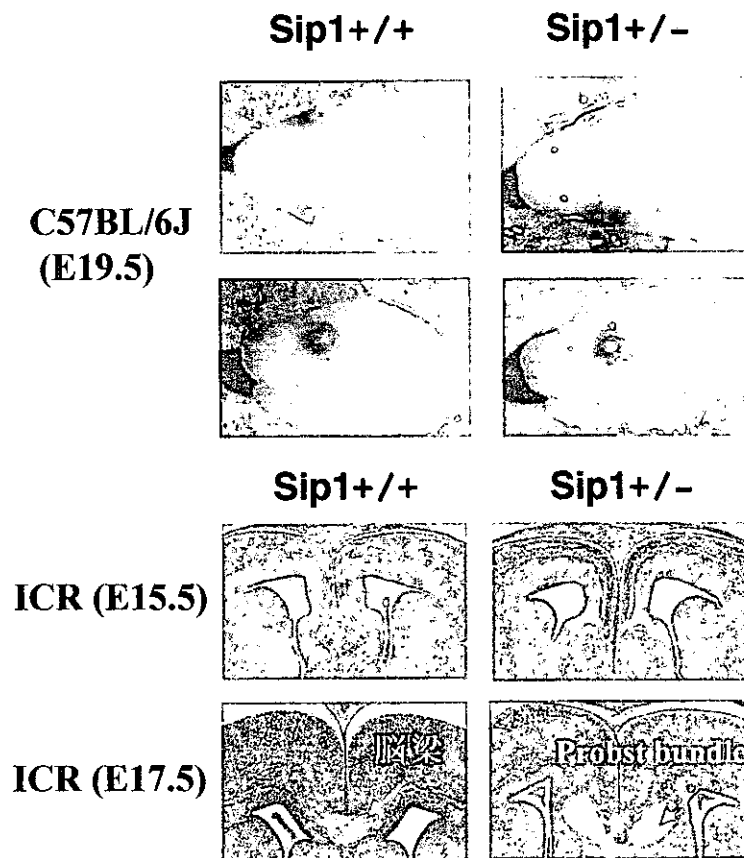


図 1. Sip1+/-マウスの頭部と終脳の形態

ICR 系統の Sip1+/-マウスでは、ヒト SIP1 欠損症に見られる顔面（頭部）の形成異常は見られない。しかし、Sip1+/-ではヒトと同様に脳梁欠損が認められた。

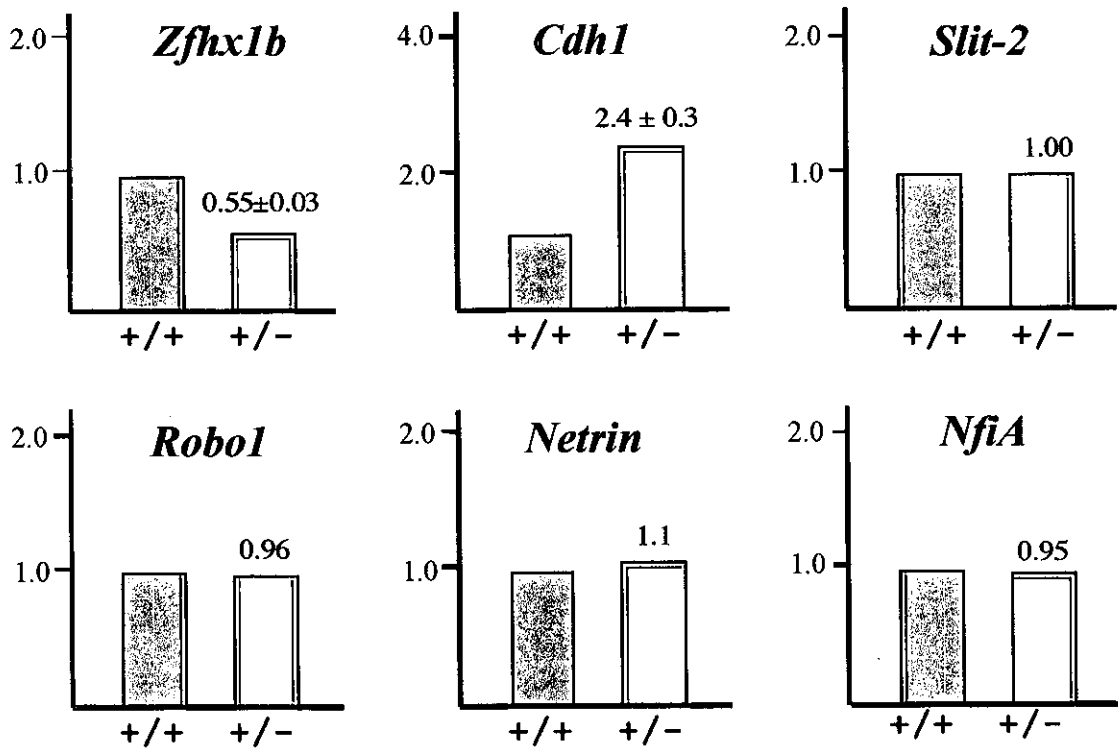
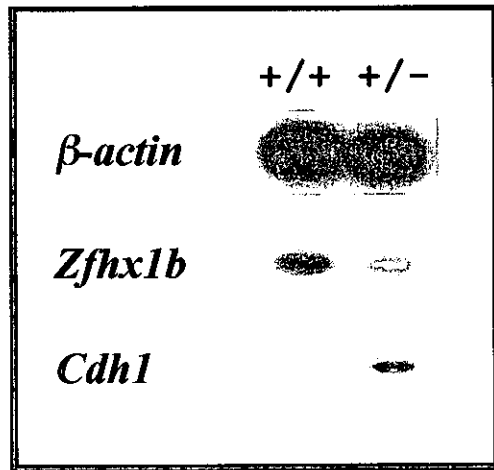
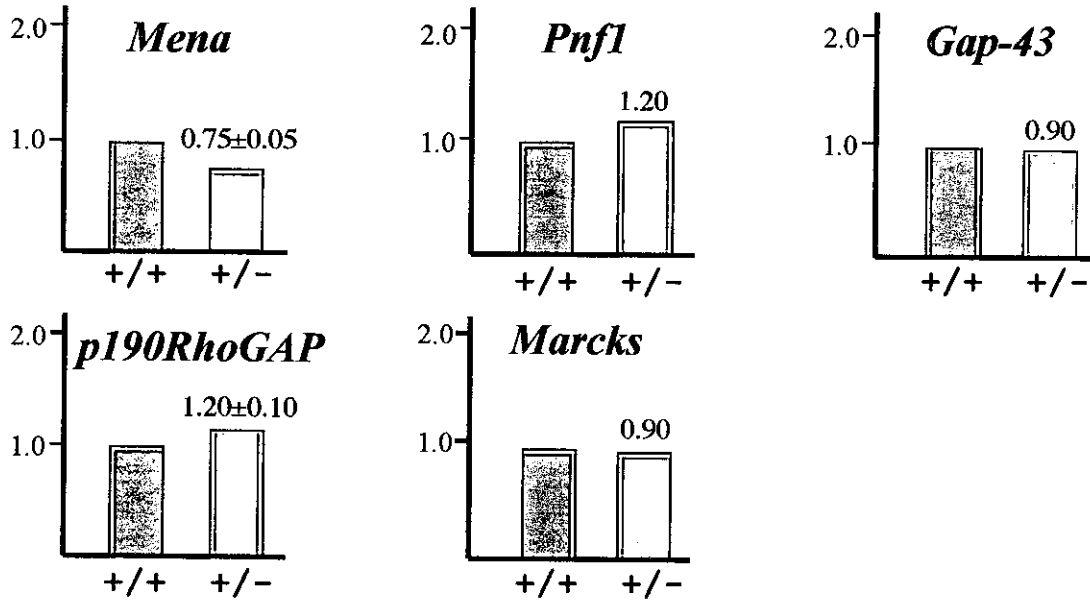


図 2. *Sip1*^{+/-}マウス (ICR 系統, E15.5) の終脳における遺伝子発現 -1

F-actin binding proteins



Rho family small G proteins

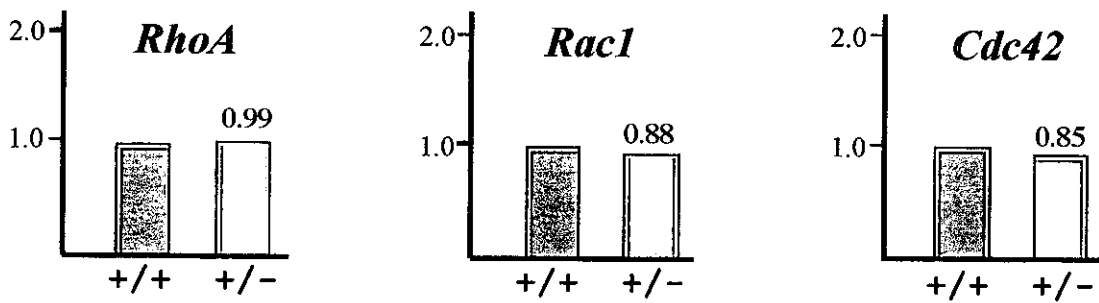


図 3. *Sip1*^{+/-}マウス (ICR 系統, E15.5) の終脳における遺伝子発現 -2

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

神経堤細胞の発生・分化におけるシグナル分子の役割の解析

分担研究者：栗原裕基

（熊本大学発生医学研究センター 胚形成部門細胞識別分野 教授）

研究要旨

神経堤細胞の発生・分化におけるシグナル分子の役割についてエンドセリンシステムを中心に解析し、頭部神経堤細胞から鰓弓の外胚葉性間葉細胞や血管平滑筋細胞への分化過程で ET-1→ET-A 受容体経路が HAND などの転写因子の誘導に関与し、第 1 鰓弓における下顎と上顎の形成決定においては、Dlx 遺伝子の発現を介して下顎の形質決定に重要な役割をしていることが明らかになった。さらに、神経堤細胞のマーキング、単離同定、特異的遺伝子導入のために ET-A 受容体プロモーターに GFP やトリレトロウイルス受容体 TVA をつないだトランスジェニックマウスを作成し、ET-1 の標的となる神経堤細胞を標識することに成功した。このマウスは ET-1→ET-A 受容体経路のシグナル解析のみならず、神経堤細胞研究に広く応用可能であり、本プロジェクトへの貢献が期待できる。

A. 研究の背景

神経堤細胞は、神経板の陥入過程で神経溝の両縁に生ずる外胚葉由来の細胞集団として発生する。自己再生能と多分化能を有する幹細胞としての性質を備え、その末裔は神経細胞やグリア細胞・皮膚メラノサイト・副腎髄質細胞など多彩である。神経堤細胞は神経管の閉鎖に伴って遊走し、その行き先によって運命が決定される。

頭部神経堤細胞は神経細胞やグリア細胞・皮膚メラノサイトの他、頭頸部や大血管の形成に与る間葉細胞、血管平滑筋細胞へ分化する点で特徴的である。これらの細胞は、鰓弓部に遊走し、間葉系の細胞（ectomesenchymal cell）に分化した後、さらに鰓弓部の骨格系や軟部組織・腺支持組織を形成する。これらは、Meckel および Reichert 軟骨を中心とする骨格系の他、鰓嚢の発達とも関連

して、口蓋や舌・歯・腺組織・軟部組織などの構造を形成する。

これら頭部神経堤細胞の発生異常は、総動脈管・大血管転移などの大血管起始異常、Fallot 四徴症、大動脈弓縮窄・離断、動脈管開存などの先天性心疾患とともに顔面・口蓋・胸腺・副甲状腺の形成異常を合併し、その多くは染色体 22q11 の欠失を伴い、症候の頭文字と染色体の番号を並べて CATCH22 と総称されている。

B. 研究目的

我々はこれまで、ET-1 遺伝子のノックアウトにより、このペプチドが胎生期器官発生において、ET-1 が頭部/心臓神経堤細胞の分化や形態形成に重要であることを見いだした。さらに我々は ET-1 ノックアウトマウスの解析を分子細胞レベルで進めることによって、神経堤細胞から鰓弓および大血管形成への関与のメカニズムを解明する手がかりを得ることを目指した。さらに、ET-1 シグナルの標的となる神経堤細胞の同定と単離できるシステムを開発することにより、神経堤幹細胞の分化誘導機構研究への広い展開を目指した。

C. 研究結果および考察

(1) ET-1 ノックアウトマウスの解析

ET-1^{-/-}マウスでは鰓弓および鰓弓動脈における神経堤由来の大血管平滑筋・骨・軟骨などの間葉系組織に分化および形態形成異常を認めた。これらの組織において、ET-1 は上皮細胞に、ETA 受容体は神経堤由来外胚葉性間葉細胞に発現が見られた。ET-1^{-/-}胚の大血管平滑筋および鰓弓間充織では dHAND, eHAND, gooseoid などの転写因子の発現が低下～消失しており、さらに大血管における neuropilin-1 の発現が著減していた。dHAND^{-/-}マウスにおいて neuropilin-1 の発現が低下していること、neuropilin-1^{-/-}マウスにおいても大血管形成に同様の異常をきたすことから、ET-1→dHAND→neuropilin-1 のシグナル経路が大血管形成に重要であることが明らかになった。

これまで、エンドセリン-1 (ET-1) が頭部/心臓神経堤細胞から血管平滑筋を含めた間葉系細胞への分化に、dHAND, eHAND, gooseoid などの転写因子の活性化を介して関与すること、血管平滑筋への分化と血管形成においては、ET-1→dHAND→neuropilin-1 のシグナル経路が重要と考えられ、SemaphorinIII や VEGF165 との相互作用が今後注目されることを示してきた。

さらに、神経堤細胞から軟骨への分化・形態形成においては FGF8→Sox9 のシグナル経路との協調作用が示唆された。さらに解析を進めた結果、ET-1 ノックアウトマウスの下顎は重複した上顎の形態と解釈するのが妥当であることがわかり、ET-1 は鰓弓発生初期に Dlx 遺伝子を制御することによって形態形成の決定因子として働いていることが明らかになった。

(2) ET-1 シグナル標的細胞の同定および単離システムの開発

これらの検討をさらに進め、ET-1 下流シグナルの胚発生における分子機能を解析するため、以下のような新たな遺伝子改変マウスを作成した。

ET-1 の標的細胞をマーキングするため、その受容体である ETAR 遺伝子プロモーターによって蛍光蛋白 GFP が発現するトランスジェニックマウスを作成した。GFP の発現は、神経管形成初期より神経外胚葉に、その後のステージで神経堤細胞や血管平滑筋細胞に発現し、これらの細胞の可視化、同定、追跡、単離を可能にした。

さらに、ETAR 遺伝子プロモーターによってトリレトロウイルス受容体 TVA が発現するトランスジェニックマウスを作成し、一般にはマウスには感染しないトリレトロウイルスを ET-1 の標的細胞に特異的に感染させることが可能となった。これにより、生体において神経堤細胞や血管平滑筋細胞に特異的に遺伝子を導入し、その効果を調べることの出来るシステムを実現し、現在解析を進めている。

E. 結論

本研究により、神経堤細胞が血管平滑筋細胞に分化し大血管形成に関与する過程において ET-1 シグナルの重要性と他の因子との関連が明らかになってきた。しかし、ET-1 によって作動する細胞内シグナルのどの経路がどのようにして神経堤細胞の分化段階を制御するのか、細胞レベルの変化がどのようにして形態の変化につながるのかなど、発生学的に重要な課題が残されている。本研究で作成した ETAR 遺伝子プロモーターを用いたマウスは、その解析に極めて有用である。即ち、神経堤細胞のサブポピュレーションとして ETAR 陽性細胞を同定してその動態を追跡することによって分化及び形態形成に重要なシグナル分子を同定していくことが可能になる。さらにこのマウスを用いることにより、ET-1 以外の分化制御因子に関する研究に広く応用可能であり、本プロジェクトに大きく貢献できるものと期待される。

3. 研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

Nagaya M, Kato J, Niimi, N, Tanaka S, Wakamatsu N: Clinical feature of a form of Hirschsprung's disease caused by a novel genetic abnormality. *J Pediatr Surg* 37: 1117-1122, 2002.

Yoneda M, Fujita T, Yamada Y, Yamada K, Fujii A, Inagaki T, Nakagawa H, Kishikawa M, Shimada A, Nagaya M, Azuma T, Kuriyama M, Wakamatsu N: Late infantile Hirschsprung disease-mental retardation syndrome with a 3-bp deletion in *ZFH1B*. *Neurology* 59: 1637-1640, 2002.

Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y: Smad interacting protein-1 (*Zfhx1b*) deficient mice reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease - mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 73, 465-470, 2003.

総説

若松延昭, 長屋昌宏: ヒルシュスプルング症候群. *ゲノム医学* 2: 259-264, 2002.

東雄二郎, 若松延昭: *zfhx1* ファミリーとその欠損症. *生化学* 75: 27-36, 2003.

20020881

以降 P.83-P.114までは雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.81の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。