

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

ヒルシュスプルング病に関連した SIP1 遺伝子異常に関する
中国・四国・九州・沖縄地区の調査結果

分担研究者：水田 祥代（九州大学大学院医学研究院 小児外科 教授）
研究協力者：田口 智章（九州大学大学院医学研究院 小児外科 助教授）

研究要旨

ヒルシュスプルング病に顔貌異常、知的障害、身体発育異常、小頭症、てんかんを合併している症例について、中国・四国・九州・沖縄地区の小児外科診療施設 49 施設にアンケート調査を依頼した。1 年目の調査および 2 年目の再依頼で 902 例を集計することができた。うち 21 trisomy の症例を除外し、上記症状が重複する症例に関して、個々の臨床像を症例別調査票により 13 例をピックアップすることができた。今年度はこれらの個々の症例に関して遺伝子解析を行う承諾をとるよう手配した。

A. 研究目的

ヒルシュスプルング病症例の中にてんかんや知能発達障害と特異な顔貌を呈する一群の症例があり、神経堤細胞の分化と関連が深い SIP1 遺伝子がある原因遺伝子であることを本研究班長の若松らが世界に先駆けてつきとめることに成功した。これを受けて、このような特殊な病態を伴うヒルシュスプルング病の症例をピックアップし、インフォームドコンセントの得られる症例に関しては遺伝子解析を行うために、中国・四国・九州・沖縄地区の小児外科診療施設における本症例の調査を目的として本研究を施行した。なお、今回の調査は疫学調査ではなく、あくまでも疑わしい症例のピックアップを目的として行った。

B. 研究の対象と方法

中国・四国・九州・沖縄地区の小児外科診療施設として、中国・四国地区は日本小児外科学会認定施設・準認定施設・教育関連施設を対象に、九州・沖縄地区は日本小児外科学会認定施設・準認定施設・教育関連施設にくわえて九州小児外科学会研究会の施設会員も対象とした。

調査方法はアンケート方式とし、アンケート用紙は班長が作成したものを一部改変し、診療年数、その間のヒルシュスプルング病症例数、そのうち特徴的顔貌をともなった症例数、知的障害を認める症例数、身体的な発育異常を認める症例数、小頭症を認める症例数、てんかんを併発している症例数、同胞発生例、中枢性低換気症候群（オンディーヌカース）

合併例、神経芽腫その他腫瘍併発例、Waardenburg 症候群合併例について Fax で返事をいただく方式にした。なおアンケート送付時に班長および長屋班員の原著論文のコピーを同封し、顔貌異常のイメージを理解していただけるよう配慮した。回答がなかった施設に再度用紙を送付し催促すると同時に、上記症状を重複する症例で 21trisomy を合併しない症例について、症例別に調査票に記載していただき、個々の症例について検討した。

C. 研究結果および考察

今回の調査では、疑わしい症例は 1 例ずつ症例調査用紙に記載していただいたので、症状の重複状態がよく把握できた。症状の重複が多いほど広範囲の欠失が考えられるため、遺伝子異常の確率が高く優先的に検査を行うべきであろう。21trisomy という記載がなく、上記の症状を重複して有する症例を 13 例ピックアップした。これらのうち 2 例はすでに死亡しており検査不能、また 2 例は連絡不能であった。症例 12 は今年度に主任研究者に検査を行っていただいたが異常なしという結果であった。残り 8 例の内、4 例に採血可能の承諾が得られたため、個々の施設において倫理委員会を通していただき、検体を主任研究者に送るようお願いすることができた。

D. 結論

ヒルシュスプルング病に合併する臨床症状から SIP1 遺伝子異常が疑われる症例を 13 例ピックアップすることができた。13 症例のうちインフォームドコンセントの得られた症例は 5 例で、そ

のうち 1 例検査を行っていただいたが、異常なしという結果であった。残り 4 例について個々の施設から直接主任研究者に検体をお送りいただくことになった。

E. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Taguchi T, Suita S, Nakamura M, Yamanouchi T, Ogita K, Taguchi S, Uesugi T, Nakano H, Inaba S: The efficacy of autologous cord-blood transfusions in neonatal surgical patients. *J Pediatr Surg* 38: 604-607, 2003.
- 2) Taguchi T, Suita S, Masumoto K, Nada O: Universal distribution of c-kit-positive cells in different types of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 19:2 73-279, 2003.
- 3) Taguchi T, Suita S, Taguchi S, Tanaka S: Peutz-Jeghers syndrome in children: High recurrence rate in short-term follow-up. *Asian J Surg* 26: 221-224, 2003.
- 4) Ogita K, Suita S, Taguchi T, Yamanouchi T, Nakamura M, Taguchi S, Nishimoto Y, Uesugi T: Effects of omega-3 fatty acids in rat allogenic small intestinal transplantation. *Pediatr Surg Int* 19: 157-161, 2003.
- 5) Ogita K, Suita S, Taguchi T, Nakamura M, Taguchi S, Uesugi T: Effect of a nucleoside/nucleotide-free diet in rat allogenic small intestinal transplantation. *Pediatr Surg Int* 20:5-8, 2004.
- 6) Nishimoto Y, Taguchi T, Masumoto K, Ogita K, Nakamura M, Taguchi S,

Takada N, Suita S: Efficacy of real-time monitoring to determine motility

in porcine small intestinal transplantation. *Pediatr Surg Int* 20: 9-13, 2004.

表1 ピックアップ症例の一覧

	型	顔貌	小頭	てんかん	身体	精神	現在	採血	結果
1 福岡こども	S	+			+	+	死	不能	
2 福岡こども	S	-				+	19	連絡不能	
3 長崎移植外科	S	+	-	-	+		2	可	
4 大分1外	L	+	-	-	+	+	5	可	
5 長崎腫瘍外	S	+	+	-	-	+	3	可	
6 琉球1外	Z	-	-	+	+	-	12	可	
7 熊本児外	S		-	-	+	+	13	連絡不能	
8 香川児外	S	-	-	+	-	-	15	不可	
9 香川児外	L	-	-	+	-	+	2	不可	
10 愛媛2外	S	+	+	+	+	+	10	不可	
11 愛媛2外	S	-	-	+	-	+	4	不可	
12 徳島児外	L	+	+	+	+	+	30	施行	異常なし
13 県立広島	S	-	-	+	-	+	死	不能	

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

Sip1 欠損マウスを用いた、Sip1 の体節形成過程における機能解析

分担研究者：東 雄二郎（大阪大学 生命機能研究科 助教授）

研究要旨

Sip1 は Zn フィンガーとホメオドメイン様配列および Smad 結合領域を有する DNA 結合型の転写因子である。Sip1 ノックアウト (KO) マウス胚では、第 7 番目までは小さな体節を生じるがそれ以降は形成されない。体節形成過程における Sip1 の機能を知るために、Sip1 の発現パターン、Sip1 KO 胚の形態的観察および種々の分子マーカーを用いた解析を行った。その結果、Sip1 KO 胚における oscillator 遺伝子 (*L-fringe*、*Hes7*、*Dll1*) や前体節中胚葉での *Fgf8* の発現パターンの変化等から、Sip1 が「体節の分節化境界の成立」に関与していることが示された。

A. 研究目的

Sip1 KO 胚は、胎生 8.5 日における体節形成が著しく抑えられていることや、前頭部の低形成、また神経管の開裂と神経堤細胞由来組織の欠失等を見いだした。このことは Sip1 が体節や神経組織形成過程において基本的な役割を担っていることを示している。本年度は Sip1 の体節形成過程における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Sip1 の発現パターン、また Sip1 KO 胚の体節形成過程における表現型の形態学的解析および種々の分子マーカーを whole mount あるいは組織切片に対する *in situ* hybridization 法を用いた解析を詳細に行った (図 1)。

C. 研究結果

体節形成過程における Sip1 発現領域を、

L-fringe 遺伝子を指標に、同時二重染色法を用いてその発現パターンを比較検討した。その結果、予定分節境界の尾側の約一体節分の領域で強く発現することがわかった。

第 7 体節期までの胚において、野生型とホモ変異胚の分節化した体節領域と尾側原条領域を含む未分節体節中胚葉の相対的な大きさ (頭尾軸に沿った長さ) を比較したところホモ変異胚においては、未分化 (分節) 沿軸中胚葉の領域が相対的に大きくなっていった。

野生型とホモ変異胚について、*paraxis*、*EphA4*、*EphrinB2*、*Mesp2*、*Notch1*、*Notch2* 等の遺伝子に関してはそれらの大まかな発現パターンは変化が見られなかったが、全体的に発現のレベルは低下していた。このことは、各体節の頭尾軸に沿った極性は変化していないことや、基本的な分節化機構は働いていることを示している。一方、未分節および未分化中胚葉で発現している *Tbx6* と *Fgf8* の発現を調べたところ、その

発現領域が前方側（頭側）へ広がっていた。一つの体節が生じる時間に同調して、未分節中胚葉において周期的に発現パターンが変化する遺伝子 L-fringe、Hes7、Delta-like 1 について調べた。その結果、いずれの遺伝子についても、野生型と比較して、ホモ変異胚ではそれらの発現が PSM（presomitic mesoderm: 前体節中胚葉）の前方側に移動し、且つ前方側のストライプ状の発現が一本多い発現パターンを示していた。

D. 考察

Sip1 KO 胚において分節化した体節中胚葉の領域に比較して PSM の領域が相対的に増大していたことや Fgf8 や Tbx6 の発現が PSM の前側へその発現領域が増大していたことは、正常胚においては、Sip1 が Fgf8 の発現を PSM の前側の領域で発現を抑制しその発現領域を制御している可能性が考えられる。またその結果として、PSM での L-fringe、Hes7、Delta-like 1 の周期的発現が、野生型より前方側でも持続して起こり、ストライプ状の発現が一本多い発現パターンを示したと考えられる。今後はこのような考えが実際に正しいのかどうかを含めて、Sip1 の体節形成過程における機能について、沿軸中胚葉特異的な conditional ノックアウト等を用いてさらに詳細に解析を行

いたい。

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 丸橋光次、Tom Van de Putte、Danny Huylebroeck、近藤寿人、東雄二郎：「体節の分節境界の成立」に果たす転写制御因子 SIP1 の役割。日本発生生物学会（札幌）2003.6.11.
- 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。日本発生生物学会第 36 回大会（札幌）2003.6.11.
- 3) 三好智也、丸橋光次、安見孝広、近藤寿人、東雄二郎： δ EF1/SIP1 二重ノックアウトマウスを用いた zfhx1 (δ EF1/SIP1)ファミリー転写制御因子の機能における類似と相違の研究。日本発生生物学会第 36 回大会（札幌）2003.6.11.
- 4) 安見孝広、三好智也、丸橋光次、近藤寿人、東雄二郎：転写制御因子 SIP1 の下流標的遺伝子の探索。日本発生生物学会第 36 回大会（札幌）2003.6.11.

F. 知的所有財産の出願・登録状況 なし

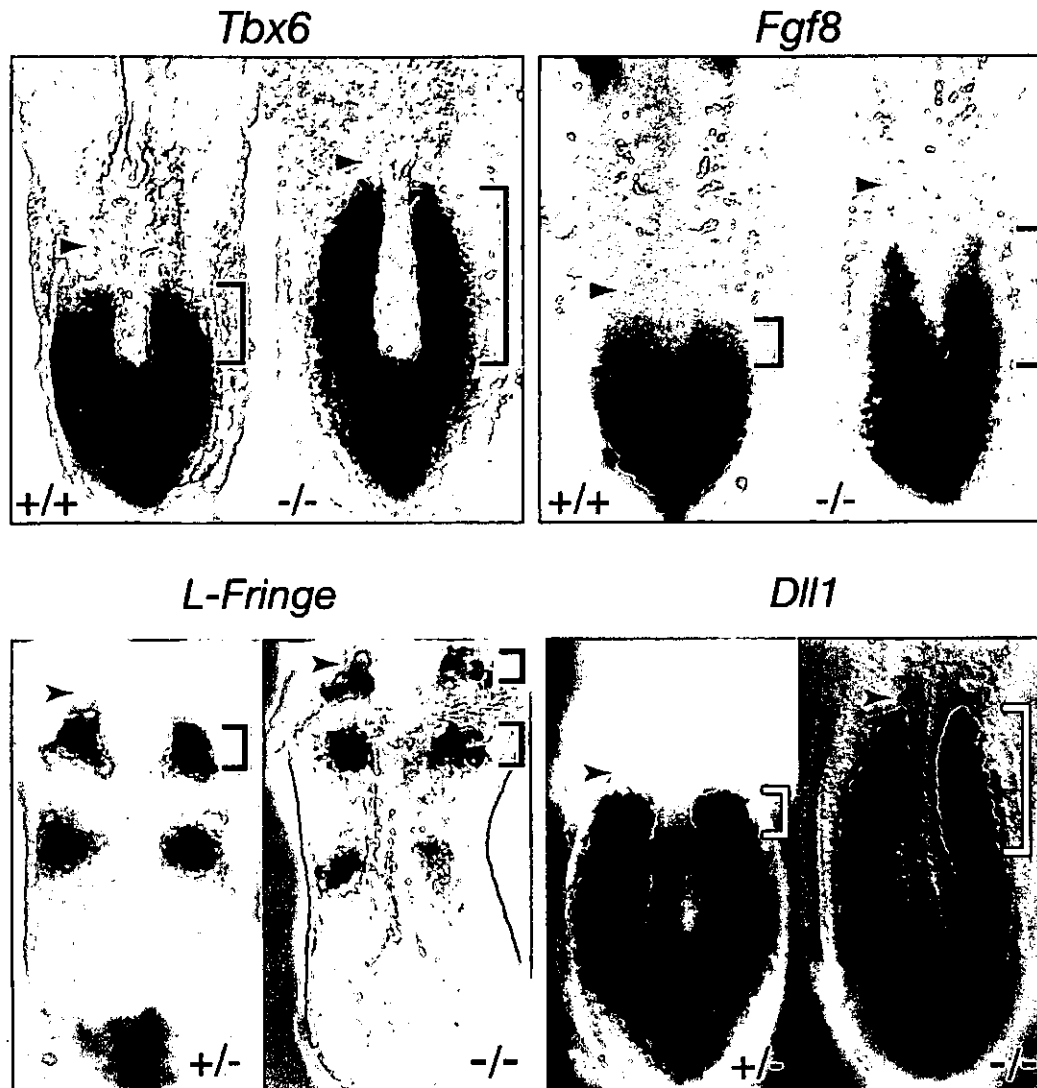


図1 SIP1ノックアウトマウス胚（胎生8.5日）の前体節中胚葉における *Tbx6*、*Fgf8*、*L-fringe*、*Dll1* の発現パターンの変化

KO胚 (-/-) では *Tbx6* と *Fgf8* の発現領域がともに前方（頭側）へ広がっている。*L-fringe* と *Dll1* (Delta like 1) の発現も前方（頭側）へ広がり、*L-fringe* は前側のストライプが1本多い。▶, > : 予定分節化境界。

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

PGP9.5の染色性から見たSip1ヘテロ欠失変異マウスの腸管壁内神経について

分担研究者 草深 竹志（大阪大学大学院医学系研究科 小児外科助手）

研究協力者 奈良 啓悟、米田 光宏、黒田 征加、福澤 正洋
（大阪大学大学院医学系研究科 小児外科）

研究要旨

SIP1欠損が動物モデルにおいて腸管壁内神経に異常をもたらすか否かを、Sip1ヘテロ欠失変異マウスを用いて検討した。すなわち胎生18日目にヘテロ、野生型それぞれ24、27個体の胎児を得て、採取した腸管よりパラフィン包埋標本を作成後薄切して、神経組織マーカーであるPGP9.5の抗体を用いた免疫染色を行ない腸管壁内神経を観察した。ヘテロ12個体、野生型16個体の直腸の標本において、肛門も含めて観察が可能であったが、この内ヘテロの3個体において肛門近傍の腸管に壁内神経細胞を認めず、25%(3/12)程度の浸透度でヒトに見られるヒルシュスプルング病と一致する所見を得た。これらの結果は、ヒトにおけるSIP1欠損症でしばしばヒルシュスプルング病を合併する知見と良く一致し、SIP1欠損が腸管壁内神経の異常につながり得ることを強く支持するものと考えられた。

A. 研究目的

2001年に、ヒルシュスプルング病に知的障害、小頭症、特徴的な顔貌を合併する症候性の患児において、Sip1 (Smad-interacting protein 1) 遺伝子の異常が報告された。その後さらに加えられた症例の知見より、この遺伝子異常はSIP1のハプロ不全をもたらしており、症例のほぼ全例で重度の知的障害、運動発達遅滞、特徴的顔貌、小頭症が見られるとともに、てんかん、先天性心疾患、ヒルシュスプルング病が様々に合併することが確かめられてきた。これらの臨床例における所

見は、SIP1のハプロ不全が、脳（知的障害、てんかん、運動発達遅滞、小頭症）と神経堤（ヒルシュスプルング病、先天性心疾患、特徴的な顔貌）両者の分化・発達に障害を与えていることを示唆している。一方、東らによりのSip1遺伝子の機能解析を目的に、マウスSip1遺伝子のnullホモ欠失変異マウスが作成されており、ホモ欠失体では、頭部を含めた全領域において神経管が開じず胎生9.5から10.5日で致死となることが示されている。現在までヒトで検出されてきたSip1遺伝子異常は、変異に関してヘテロの状態で

あるが、これに対応したヘテロ欠失変異マウスは生存し生殖能力も有する。ヒト SIP1欠損症の動物モデルと考えられるヘテロ欠失変異マウスにおいて、ヒトと同様にヘテロ不全により症候性の異常を生ずるか否かは病因を考える上でも重要である。本研究ではSIP1のハプロ不全により惹起されると考えられる異常の中でも特にヒルシュスプルング病を定義する腸管壁内神経の異常の有無につきヘテロ欠失変異マウスにおける検討を行った。

B. 研究方法

昨年度までの研究として、Sip1ヘテロ欠失変異の成獣マウス12個体、野生型成獣マウス6個体につき比較検討を行ったが、腸管壁内神経について、HE染色、S100免疫組織、AchE染色、NADPH diaphorase染色に所見においては、ヘテロ欠失変異個体と野生型個体との間に明らかな差異は確認されず、無神経節腸管は証明されなかった。

そこで今年度の研究では、検討症例数を増やすとともに、重篤な症状を持つ個体は死産あるいは出生後短期間で死亡している可能性も考えて、満期付近での胎児において検討することを企画した。

すなわち、ヘテロ欠失変異マウスの雄と野生型の雌との交配により得られた胎生18日目の胎児について検討を行うこととし、ネンブタール腹腔内投により安楽死せしめた3匹の母獣よりそれぞれ10、19、22個体（後者2匹は排卵誘発を施行）の胎児を得た。これらの胎児の体重を測定後、直腸・結腸・小腸を実体顕微鏡下に採取して、パラホルムアルデヒドにて固定後パラフィン包埋標本を作成した。薄切した標本に対して、神経組織マーカー

であるPGP (protein gene product) 9.5の抗体を用いて免疫組織染色を行ない腸管壁内神経の形態を観察した。

一方、組織採取時に尾の一部よりDNAを抽出し、以下のプライマーを用いてPCRを行った。プライマー-intron6-F (5'-GAACTAGTTGAATTGGTAGAATCAATGGGG-3')とintron6-R (5'-GTAAAGGCTCTCTACGCCTTTTTTCAGTTAG-3')との組み合わせでは正常のSip1遺伝子配列から197 bpのPCR産物が生成され、プライマー-intron6-Fとintron7-R (5'-AAGCATGTCGGTAAGCTGACCAACTACTAG-3')の組み合わせでは変異の遺伝子配列から288 bpの産物が生成される。これらのPCR産物の大きさを電気泳動して確認し各個体のgenotypeを決定した(図1)。

C. 研究結果

検討した51個体のgenotypeは、ヘテロ欠失変異であるもの24個体、野生型であるものが27個体であり、体重についてはヘテロ欠失変異個体が平均 1.219 ± 0.245 g、野生型個体は 1.150 ± 0.210 gであった。胎児の個体数はほぼ同数であり、また体重においても差は見られないことより、子宮内における個体の発生と成長は、ヘテロ欠失変異と野生型との間に特に差はないものと考えられた。また、直腸の標本において、肛門も含めて観察できたものが、ヘテロで12、野生型で16個体であった。

野生型の標本でのPGP9.5免疫組織染色においては、小腸、結腸を含む観察腸管のいずれの部位においても、強い染色性を有する腸管壁内の神経組織がほぼ数珠状に連続して認められた。これを強拡大で観察すると染色陽性の部分は腸管壁

筋層間の神経節に一致しており、なかでも神経細胞の細胞質に強い染色がみられた。肛門も含めて観察できた直腸遠位端標本では、これらの染色陽性の腸管壁内神経節は肛門管の口側の部分まで分布していた(図2A)。一方ヘテロ欠失変異個体での観察では、多くの個体で野生型と同様に分布する筋層間神経節が観察された(図2B)。しかし、3個体において、肛門近傍の直腸に壁内神経細胞が認められなかった(図3A)。これら3個体における所見は特徴的で、野生型やその他のヘテロ欠失変異個体で見られた強い染色性を示す神経節は全く見られず、この神経節の欠如は肛門管付近の直腸遠位端から口側に向い連続しており、染色陽性の神経組織の出現を経た後、より口側では野生型と同様の染色性を示していた。こうした所見はヒトに発生するヒルシュスプルング病患者の病変腸管でみられる腸管壁内神経の欠如所見と良く一致していると考えられた。

腸管壁内神経を欠如する個体の発生頻度は、肛門までを含む直腸を検討できた個体を母数とすると25%(3/12)であり、ヘテロ欠失変異個体全体を母数とすると12.5%(3/24)となった。

D. 考察

これまでに*Sip1*遺伝子の異常が証明された症例の観察から、SIP1のハプロ不全が脳(知的障害、てんかん、運動発達遅滞、小頭症)および神経堤(ヒルシュスプルング病、先天性心疾患、特徴的な顔貌)両者の分化・発達に障害を与えていることが示唆されている。

このうち重度の知的障害、運動発達遅滞、特徴的顔貌、小頭症については症例

のほぼ全例で見られる症状であるが、ヒルシュスプルング病についてはSIP1欠損症の重要な症状ではあるものの全例ではなく約半数の症例に明らかとなる表現型である。すなわちヒルシュスプルング病をもたらす神経堤細胞由来の腸管壁内神経細胞の発達・分化の障害は、SIP1のハプロ不全が影響を与えるもののその程度には個体差があり、組織学的には直腸遠位端まで正常同様に腸管神経節の分布が見られる例も少なからず存在することとなる。

こうした不完全な表現型の出現が真に*Sip1*遺伝子異常に伴うものかを窺う一つの手段として動物モデルにおける知見の検討がある。本研究で用いた東らにより作成された*Sip1*遺伝子の欠失変異マウスの変異は、蛋白翻訳領域の約半分の領域を占める第7エキソンを欠失しており、この変異アレルは蛋白の発現を生じないnull変異であることが確認されている。すなわちヘテロ欠失変異個体では野生型の大きさのSIP1蛋白が、存在量が約1/2に減少して発現している。こうしたハプロ不全の状態にある個体での、腸管壁内神経節の発達・分化に与える影響は、本研究による結果から見る限り、不完全な浸透性をもって直腸遠位部に腸管壁内神経節の欠如をもたらすというものであった。ここで見られた神経節の欠如は直腸遠位端からある程度口側に連続してみられ、それより口側では野生型と同様に正常の神経節支配を示していた。こうした形態はヒトのヒルシュスプルング病患者にて見られるものと同様であり、病的表現型の不完全な浸透性ととともに、マウスモデルでの知見はヒトSIP1欠損症で観察されるヒルシュスプルング病の発現様式

と良く一致しているものと思われる。本研究の結果は、SIP1のハプロ不全が個体差をもって、神経堤細胞由来の腸管壁内神経細胞の発達・分化に対して障害をもたらすという、ヒトに於いて考えられている病因病態の説明をさらに強く支持するものと考えられた。

E. 結論

Sip1 遺伝子のヘテロ欠失変異マウスの腸管において、その直腸遠位端を中心に、PEP9.5 の発現を指標にして腸管壁内神経の形態を観察し、12.5%~25%の個体において、明らかな腸管壁内神経節の欠如を認めた。本研究により SIP1 の

ハプロ不全が個体差をもって、神経堤細胞由来の腸管壁内神経細胞の発達・分化に対して障害をもたらすことが強く支持された。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 奈良啓悟、草深竹志、米田光宏、黒田征加、他：Sip1 ヘテロ欠失変異マウスにおける腸管壁内神経の検討。日本小児外科学会総会（大阪）2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし



図1 Genotypeの決定

各胎児より調整したDNAを用いてPCRを行い、2種類のPCR産物の有無（288 bp; ヘテロ、197 bp; 野生型）により genotype を決定した。

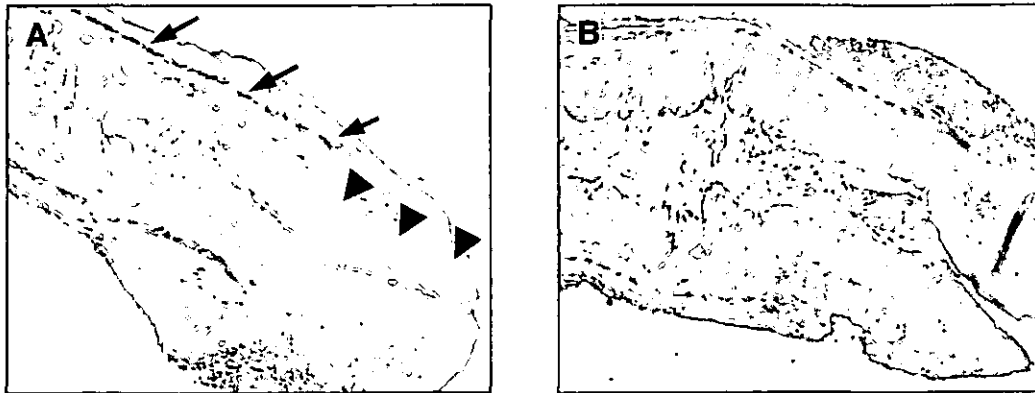


図 2 肛門付近を含んだ直腸遠位端のPGP9.5免疫組織染色像

- A:** 野生型個体; 強い染色性を有する腸管壁内の神経組織 (矢印) が肛門管 (矢頭) の口側まで連続して認められる。筋層間神経節に相当すると考えられる。
- B:** ヘテロ欠失変異個体; この個体では野生型と同様に分布した筋層間神経節が観察される。

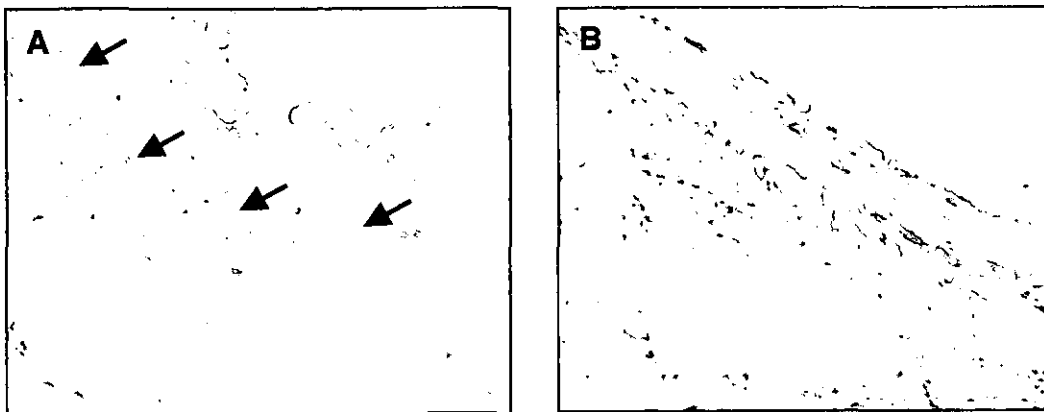


図 3 直腸遠位部のPGP9.5 免疫組織染色像

- A:** ヘテロ欠失変異個体; この個体の標本では壁内筋層間 (矢印) に染色陽性を呈する神経節が全く見られない。
- B:** 野生型個体での同等部位の所見では、明らかな染色陽性の神経節が多数観察される。

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

Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの神経突起(軸索)の解析

分担研究者：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）

石原 尚子（名古屋大学医学部医学研究科 小児科）

中西 圭子、渡部 眞三、大平 敦彦

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 周生期学）

伊藤 美武（愛知医科大学 動物実験センター）

東 雄二郎、近藤 寿人（大阪大学 生命機能研究科）

Danny Huylebroeck（University of Leuven）

研究要旨

我々は、著明な知的障害を呈する SIP1 欠損(異常)症の病態を分子レベルで明らかにするために、Sip1 ヘテロ欠失変異マウス (Sip1+/-) を 2 系統 (ICR、C57BJ) のマウスと戻し交配し、両マウスの表現型を解析した。胎生 15.5 日 (E15.5) および E17.5 の胎児脳を解析したところ、E17.5 の ICR 系統の全ての Sip1+/- に脳梁欠損が見られた。脳梁欠損は神経軸索の形成や伸長に異常がある場合に出現するので、脳梁形成が終了している生直後 (P0) の ICR 系統の野生型および Sip1+/- の脳に DiI を注入し、脳梁形成に関与する軸索の染色を行った。野生型では、DiI を注入した脳半球から対側の半球まで軸索が染色されたが、Sip1+/- では大半が正中部の手前で止まっており、正中を通過する軸索はわずかであった。次に、E15.5 の ICR 系統の野生型と Sip1+/- の終脳を用いて神経細胞の初代培養を行い、軸索と考えられる一番長い神経突起が細胞長径の 5 倍以上に伸びている細胞数を計測した。野生型では、長い突起をもつ細胞数が全体の 30% であったのに対し、Sip1+/- では 15% と減少していた。以上より Sip1 は胎生期の神経軸索の伸長に重要であると考えられた。

A. 研究目的

Sip1 ヘテロ欠失変異マウス (Sip1+/-) を ICR および C57BJ 系統ともどし交配し、純系化した。ICR 系統のマウスでは、脳梁欠損が出現した。脳梁欠損の病態を明らかにするために以下の研究を行った。

B. 研究方法

① 脳の構造異常：

E15.5 および E17.5 の胎児脳の固定切片を Kluver-Barrera 法で染色し、形態異常の有無について解析した。

② DiI を用いた軸索走行異常の解析：
P0 の野生型と Sip1+/- の頭部を 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。頭部の表皮と頭蓋骨を取り除いて終脳を露出させ、DiI の結晶を右半球の側頭部の脳表面直下に埋め込んだ。4%パラフォルムアルデヒド中で 8 週間、室温で DiI を拡散させた後、30 μ m の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。

③ 初代神経培養細胞の軸索長の解析：
E15.5 の胎児の終脳から脳幹部と海馬を切除した残りの大脳皮質を、パパインで処理して神経細胞を分離した。得られた神経細胞を 24 穴のポリリジンコートしたプレート上にまき (1.2×10^4 cell/well)、無血清培地で培養した。48 時間後に軸索と考えられる一番長い神経突起が細胞長径の 5 倍以上に伸びている神経細胞数を計測した。

C. 研究結果

- ① E17.5 の ICR Sip1+/- の全てに、脳梁欠損が見られた。海馬交連、前交連には異常は認められなかった。
- ② 野生型(P0)では、DiI を注入した脳半球から対側の半球まで神経軸索が長く伸長し、脳梁を形成していた (図 1A)。しかし、Sip1+/- (P0) では大半の軸索が正中の手前で止まっており、正中を通過しているのはわずかであった (図 1B、脳梁形成なし)。
- ③ 野生型は、神経突起が細胞長径の 5 倍以上に伸びている細胞数が全体の

30%であったが、Sip1+/- は 15% と減少し、特に 7 倍以上に伸びている細胞数は著明に減少していた。

D. 考察

DiI 染色の解析により、Sip1+/- (P0) では、本来脳梁が形成されるべき正中中部で、軸索が止まっていた。脳梁欠損マウスは、軸索誘導(axon guidance)因子や、成長円錐の F-actin の重合/脱重合制御に関与する因子の遺伝子異常で出現する。今後、これらの因子と Sip1 との関連を明らかにするために、Sip1 が関連するシグナルの下流の遺伝子を明らかにすることが重要である。

E. 結論

Sip1+/- に見られた脳梁欠損は、DiI 染色の結果から神経軸索の伸長の低下によると考えられた。さらに、Sip1+/- (E15.5) の初代神経培養細胞でも、神索 (一番長い突起) の伸長が低下していたことから、Sip1 は神経軸索伸長に関与していると考えられる。

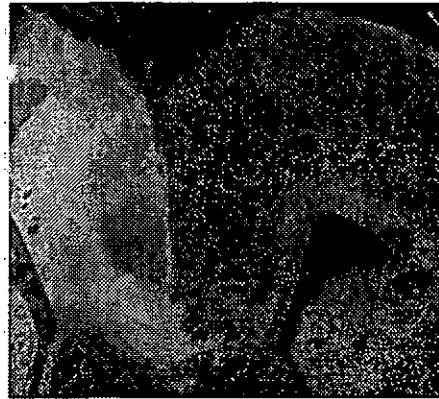
F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 山田憲一郎, 伊藤美武, 石原尚子, 山田裕一, Tom Van de Putte, 近藤寿人, 島田厚良, Danny Huylebroeck, 東雄二郎, 若松延昭: Sip1 ヘテロ欠失マウスの表現型と終脳における異常発現遺伝子の同定. 日本人類遺伝学会 (長崎) 2003.10.22.



A. 野生型(P0)



B. Sip1ヘテロ(P0)

図1 Dilを用いた軸索染色

Dilを用いて脳梁形成に関与する軸索を染色すると、野生型では対側まで軸索が伸長していたが(A)、Sip1ヘテロマウスでは大半の軸索伸長が正中部で止まっていた(B)。

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

Zfhx1b に特異的な siRNA を用いた *Zfhx1b* ノックダウンの試み

分担研究者：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）

研究要旨

我々は、著明な知的障害と、様々な神経堤発達障害が見られる HSCR-MR 症候群の原因遺伝子の一つが Smad interacting protein-1（以下 SIP1）をコードする *ZFHXB* であることを明らかにした。本症の症状の分子メカニズムを解明するために、マウス *Zfhx1b* の開始コドンより約 600 bp の領域を中心に 7 種類の siRNA (21mer) を作成した。これらの siRNA をマウス P19 細胞に導入し、RT-PCR により *Zfhx1b* の発現量を定量した。しかし、これらの siRNA は *Zfhx1b* の発現を強く抑制することができなかった。今後、さらに多くの siRNA を作成し、*Zfhx1b* のノックダウンに有効な siRNA の同定を試みる。

A. 研究目的

SIP1 は Smad1,2,5 と結合し、E-cadherin (*CDH1*) などの転写の抑制を行っている。また Sip1 は胎生期の神経堤細胞に発現しており、Sip1 ノックアウトマウス (*Sip1*^{-/-}) は、神経堤細胞の減少や遊行異常が見られ、胎生 9.5 日で致死となる。胎生 9.5 日では脳神経が形成されていないので、脳形成における Sip1 の機能を解析することができない。本症の患者のモデルである Sip1 ヘテロノックアウトマウス (*Sip1*^{+/-}) では、脳梁欠損が見られるので、脳梁形成前の胎生 15.5 日 (E15.5) の終脳を用いて、DNA マイクロアレイによる解析を行ったが、再現性のある結果が得られず、Sip1 のマウス脳形成における役割を解明できなかった。そこで本年度は、*Zfhx1b* の転写を

特異的に阻害する 21mer の二本鎖 RNA (siRNA) を作成し、培養細胞に加えることにより、細胞内の Sip1 の発現量を減少させて、細胞内で発現量が変動する他の遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

①Dicer 酵素を用いた siRNA の作成：
ヒト *ZFHXB* の開始コドンより約 600 bp の領域を pLITMUS 28i ベクター(NEB)にサブクローニングした。T7 ポリメラーゼを用いて両側から転写し二本鎖 RNA を作成した。得られた二本鎖 RNA を Dicer 酵素 (GTS) によりランダムに切断し、21mer の siRNA を得た。

②siRNA の導入と total RNA の抽出：
Zfhx1b に対する siRNA を siPORT Lipid と siPORT Amine (Ambion)を用いてマウ

ス P19 細胞に導入した。12 時間後に再び導入し、60 時間後に Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて totalRNA を抽出した。

③RT-PCR 法による *Zfx1b* の発現量の解析： RNA 6000 Nano Chip (Agilent technology) による定量後、4.5 μ g の total RNA を逆転写し (Amersham)、First strand cDNA を得た。この cDNA を鋳型として *Zfx1b* に特異的なプライマーを用いて、アイソトープによる定量 PCR を行った (cycle 数は 18-26 回)。9%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により PCR 産物を分離後、BAS1800 を用いて発現量を定量した。量的コントロールとして b-actin を同時に定量し、その値を分母とした *Zfx1b* の発現量を siRNA を導入しなかった細胞と比較した。

④作成した siRNA の位置と配列：
(ターゲットサイト)

開始コドンより

227-AAGGGCTGCTACCAAGAGAGG
264-AAGGGAGAGTGTGTGGAGCA
340-AAGGAAGATTATGATGCAATG
491-AAGAGTACCTTCAGCGAAGCG
939-AACTGCAAGAAACGCTTCTC
2634-AAGCAACAACCCTGTGTTCCGG
3459-AAGGGACGGCGACGAGGAGGA

C. 研究結果

① Dicer 酵素で作成した siRNA を導入した HEK293 細胞では *ZFH1B* の発現量が、siRNA を導入しなかった細胞の約 40 % に抑制されていた。従って、開始コドンより約 600 bp の領域には、*ZFH1B* の発現を抑制する配列が存在すると考えられた。

② ①の結果をもとに、マウス *Zfx1b* の開始コドンより約 600 bp の領域を中

心に 7 種類の siRNA を作成した。これらの siRNA を siPORT Lipid と siPORT Amine を用いてマウス P19 細胞に導入し、RT-PCR により *Zfx1b* の発現量を測定した。図 1 に *Zfx1b* の cDNA 上での機能ドメインと作成した siRNA の位置を示した。siRNA を添加しない control に対する *Zfx1b*/b-actin の比を示した。これらの siRNA は *Zfx1b* の発現を抑制しなかった。

D. 考察

今回作成した siRNA ターゲットサイトの選別は以下の 4 点を考慮して行った。

- ① AA で始まる部分である。
- ② 約 50% の GC 含量 (30~70%) である。
- ③ 全ての塩基が均等であるほうがよい。
- ④ 開始コドンから 100 bp 以内は避ける。

引き続き、種々の siRNA を用いて研究を行い、*Zfx1b* を 50% 以下に抑制する siRNA の同定を試みる。本研究により Sip1 カスケードの下流にあるタンパク質を同定できると考えられる。

E. 結論

Dicer 酵素を用いて作成した siRNA の結果から、開始コドンより約 600 bp の領域には、*ZFH1B* の発現を抑制することができる配列が存在すると考えられたが、その領域中で強く *Zfx1b* の発現を抑制する配列は明らかにできなかった。今後、さらに多くの siRNA を作成し、*Zfx1b* のノックダウンに有効な siRNA の同定を試みる。