

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（東京大学大学院医学系研究科 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、神経堤細胞の分化に関わるエンドセリン下流シグナル経路や転写因子の制御機構を明らかにするとともに、エンドセリンが胚発生において、ホメオティック遺伝子である *Dlx5/6* の誘導を介して鰓弓の背腹軸方向のパターン形成という形態形成の基本プログラムに関与することを明らかにした。

A. 研究目的

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・大血管転位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。

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目指した。

B. 研究方法

1. 遺伝子変異マウスの解析

組織標本、アルシアンブルー/アリザリンレッドによる骨格染色、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析などにより遺伝子変異マウスの表現型を解析した。

2. 培養細胞を用いた遺伝子機能解析

カルパイン6の分子機能に関して、HeLa細胞を用いて免疫細胞染色、遺伝子強制発現、siRNAによる遺伝子ノックダウンなどの手法で解析した。

C. 研究結果

1. ET-1 遺伝子欠損マウスの解析

ET-1^{-/-}骨格の形態観察により、下顎における骨・軟骨が上顎構成成分の鏡像重複であることを見出した。さらに、上顎弓 (*Prx2*, *Bmp4*) および下顎弓 (*Pitx1*, *dHAND*, *eHAND*) の遺伝子マーカー発現の解析から、*ET-1*^{-/-}の下顎弓の遺伝子発現パターンが上顎弓のパターンをとることを明らかにした。以上より、*ET-1*^{-/-}胚の下顎は、上顎の形態へのホメオティック様変異と解釈した。この解釈の妥当性は、*ET-1*^{-/-}胚において第1, 2鰓弓の背腹軸パターン形成の決定因子である *Dlx5*, *6* の遺伝子発現が第1, 2鰓弓腹側 (第1鰓弓では下顎弓) で特異的に消失していること、ETA 受容体 (ETAR) 拮抗薬を用いた発生薬理学的方法により、ET-1 シグナル要求時期が背腹軸に沿った鰓弓の領域決定時期 (胎生9日前後) に一致することからも裏付けられた。これらの結果及び ET-1 と ETAR の発現解析から、鰓弓腹側における上皮細胞と沿軸中胚葉由来間葉細胞から産生される ET-1 は ETAR を介して頭部神経堤細

胞に作用し、背腹軸に沿った神経堤細胞の運命決定に寄与していると考えた。

2. カルパイン6の機能解析

鰓弓形成における ET-1 シグナルの下流として *Dlx6*→*dHAND* のシグナル経路があるが、その標的遺伝子の一つとしてカルパインファミリー遺伝子の1つであるカルパイン6遺伝子を同定した。さらに、その発現が鰓弓・心臓などで *dHAND* と一致すること、細胞骨格に作用して細胞形態や増殖に影響する因子であることを明らかにした。

D. 考察

ET-1 が形態形成因子として神経堤細胞に作用し、ホメオティック遺伝子 *Dlx5*, *Dlx6* を誘導することによって、鰓弓の背腹軸方向のパターン形成を制御していることが証明された。前後軸決定に関する最近の知見とともに、鰓弓における神経堤幹細胞の運命決定機構に関して以下の仮説が考えられる。「ロンボメア 1, 2 領域の神経堤幹細胞は isthmus からの第一の FGF シグナルにより *Hox* 遺伝子発現の負の調節を受け、前後軸方向のアイデンティティーが決定される。続いて ET-1 シグナルが遊走過程の神経堤細胞に作用し、シグナル応答性を変化させる。さらに第二の FGF シグナルが神経堤細胞に作用して *Dlx* 遺伝子発現が誘導され、背腹軸方向のアイデンティティーが決定される。」さらに、そのシグナルの標的分子の1つとしてカルパイン6が同定され、細胞形態や増殖への作用によって形態形成に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

神経堤細胞による顎顔面及び心大血管の形成過程において、ET-1 が ET-A 受容体を介し、ホメオティック遺伝子である Dlx5/6 の誘導を介して鰓弓の背腹軸方向のパターン形成という形態形成の基本プログラムに関与することを明らかにした。さらに、ET-1 シグナルの下流遺伝子として dHAND、カルパイン 6 を同定することにより、形態形成の分子メカニズムがさらに明らかになると期待される。

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Federoff HJ, Ogawa S: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*, in press.
 - 2) Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H: Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev*, in press.
- ### 2. 学会発表
- 1) 栗原由紀子: 大血管 鰓弓形成に関与する神経堤細胞と Endothelin-1 の役割. 第 26 回日本分子生物学会 (神戸) 2003.12.10.
 - 2) 尾関英徳: Endothelin-1 遺伝子欠損マウスにおける下顎弓の homeotic transformation. 第 26 回日本分子生物学会 (神戸) 2003.12.12.
 - 3) 砺波一夫: 鰓弓形成に関与する Endothelin-1 の下流遺伝子の探索: DNA マイクロアレイを用いた検討. 第 26 回日本分子生物学会 (神戸) 2003.12.12.

3. 研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

Ishihara N, Yamada K, Yamada Y, Miura K, Kato J, Kuwabara N, Hara Y, Kobayashi Y, Hoshino K, Nomura Y, Mimaki M, Ohya K, Matsushima M, Nitta H, Tanaka K, Segawa M, Ohki T, Ezoe T, Kumagai T, Onuma A, Kuroda T, Yoneda M, Yamanaka T, Saeki M, Segawa M, T Saji, Nagaya M, Wakamatsu N: Clinical and molecular analysis of Mowat-Wilson syndrome associated with *ZFHX1B* mutations and deletions at 2q22-q24.1. *J Med Genet* 41: 387-394, 2004.

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: 273-279, 2003.

Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Federoff HJ, Ogawa S: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*, in press

Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H: Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev*, in press.

20030754

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

5. その他

平成15年度 こころの健康科学研究事業 (H13-こころ-018)
第2回班会議

[会期] 平成16年2月6日(金) 16:40~19:30

[会場] 名古屋通信会館 7F 望の間
〒451-0046 名古屋市西区牛島町5番6号
TEL: 052-551-5111 FAX: 052-551-5151
(交通) JR 名古屋駅下車、徒歩8分

開会挨拶: 若松 延昭 (16:40)

司会: 若松 延昭 (16:45~17:10)

1-1.演題: SIP1の機能について-SIP1 ホモ変異マウスを用いた解析結果を中心に-
東 雄二郎 (大阪大学大学院生命機能研究科・形態形成)

1-2.演題: 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
草深 竹志、奈良 啓悟 (大阪大学大学院医学系研究科・小児外科)

<休憩> (17:10~17:40)

司会: 田口 智章 (17:40~18:20)

2-1.演題: ZFHX1Bの変異あるいは欠失が見られる HSCR の腸管神経叢病理所見
島田 厚良、石原 尚子、長屋 昌宏 (愛知県心身障害者コロニー)

2-2.演題: Hirschsprung 病類縁疾患の病理に関する研究
田口 智章、水田 祥代 (九州大学大学院医学研究院・小児外科)

2-3.演題: 知的障害を伴った Hirschsprung 病の分析
長屋 昌宏 (愛知県心身障害者コロニー・総長)

司会: 長屋 昌宏 (18:20~19:00)

3-1.演題: 新たに同定した ZFHX1B 変異
山田 憲一郎、石原 尚子、山田 裕一、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)

3-2.演題: 東北・北海道地区の SIP1 欠損症症例の検索結果について
天江 新太郎、林 富 (東北大学医学部・小児外科)

3-3.演題: Hirschsprung 病・類縁疾患における NGF/受容体系の発現の検討
ならびに当院における遺伝子異常を伴った3症例の臨床経過報告
黒田 達夫、佐伯 守洋 (国立成育療養センター・小児外科)

<総合討論> (19:00~19:30)

閉会挨拶: 若松 延昭

平成15年度 こころの健康科学研究事業 (H13-こころ-018)
第1回 班会議

[会期] 平成15年9月20日(土) 12:00~14:30

[会場] アイリス愛知 2F 「サフラン1」

〒460-0002 名古屋市中区丸の内二丁目5-10

TEL: 052-223-3751 FAX: 052-223-3760

(交通) 地下鉄桜通線「丸の内駅」下車、徒歩8分

開会挨拶: 若松 延昭

1. SIP1欠損症の臨床研究

司会: 長屋 昌宏 (愛知県心身障害者コロニー・総長)

1-1. 発表: 「SIP1欠損症の臨床症状」

石原 尚子 (名古屋大医・小児科、愛知県コロニー研究所・遺伝学)

1-2. 討論: 「本年度の臨床研究の進め方」

2. SIP1欠損症の基礎研究

司会: 東 雄二郎 (大阪大学院・生命機能)

2-1. 発表: 「Sip1ヘテロ欠失変異マウス脳における異常発現遺伝子」

山田 憲一郎 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学)

2-2. 発表: 「脳特異的 Sip1 ホモ欠失変異マウスに見られる異常所見について」

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)

3. 総合討論

その他

閉会挨拶