

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2005 年度～2008 年度  
 課題番号：17591539  
 研究課題名（和文） 神経板の発達における遺伝子発現に関する検討-特に外胚葉・中胚葉との関連について  
 研究課題名（英文） expression of sox-2 in chick embryo treated with noggin during neuronal development

研究代表者 稲垣隆介（INAGAKI TAKAYUKI）  
 関西医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：10213109

## 研究成果の概要：

神経組織の発生は複雑で、単に神経外胚葉が分化していくのではなく、周囲の中胚葉組織などとの相互関係があることが分かっている。神経の発生を調整していると思われる、noggin などが神経発生にどのような影響を及ぼすかを調べた。

当初は、より若い胚における神経発生を調べることが目的であったが、実験を続けていくあいだに、noggin などは一次神経管が形成される時期よりも、一次神経管の発生のやや後期から二次神経管の発生の初期に影響をもたらしている可能性が高くなったために、実験を、やや後期に移した。

その結果、noggin は時期選択性に、特に二次神経管の正常な発達に重要な影響を与えていることが確認された。このような研究を続けることで閉鎖性二分脊椎の発生病態を解明する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	2,000,000	0	2,000,000
2006 年度	1,000,000	0	1,000,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
総計	3,700,000	210,000	3,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：noggin, sox-2, neurulation, BMP, in situ whole mount hybridization

## 1. 研究開始当初の背景

正常の neurulation（神経胚形成）は大きく二つに分けられる。primary neurulation と secondary neurulation である。両者の境界についてはいまだ明らかでないが、S2 レベルではないかとされてい

る。

受精後第二週の終わりに胎児は epiblast（胚盤葉上層）と hypoblast（胚盤葉下層）の二層である。その後、原始線条（primitive streak）が形成され、その最も頭側に原始

結節 (Hensen's node) が形成される。epiblast の細胞が原始結節部へ移動しながら、epiblast と hypoblast の間で脊索 (notochord) を形成するようになる。ectodermal germ layer (外胚葉層) は平らなディスク状となる (頭側が尾側よりも広い)。前述のように外胚葉の下に脊索が現れ、その影響下に神経板が形成される。この神経外胚葉 (neuroectoderm) により神経板が形成されるが、これが neurulation の最初の出来事となる。これらの誘導 (induction) の過程は非常に複雑であり、いまだによく分かっていないが、脊索により epiblast が誘導されると考えられている。この誘導の仕組みやこれらの制御する遺伝子の役割などについても一部は同定されつつある。これらの代表例 (signaling molecule) は activin を含む TGF- $\beta$  や FGF などである。神経外胚葉の誘導については 1924 年に Spemann と Mangold が調べて以来検討が続けられているが、いまだに明らかでない。近年、BMP4 (bone morphogenetic molecule 4) が神経上皮への分化に抑制的な働きがあり、また noggin、chordin などがそれに拮抗することも分かっている。

## 2. 研究の目的

胎生初期に BMP-4 に親和性を持つことので分かっている noggin を、胎生比較的早期のニワトリ胚に処理することで、神経発生に変化が起こることが想定された。具体的には、胎生初期の胚を noggin など処理することで、胎児の外観上の異常が見られるようになるかどうか、また、異常が見られるようであれば、その胎児を in situ hybridization の手法を用い、sox2 な

どの遺伝子発現を調べ、結果として胎児の神経管とその周囲の組織の正常発生を調べることが目的である。また、可能であれば、脊髄髄膜瘤・脂肪腫などに代表される二分脊椎発生の原因検討を行う。

## 3. 研究の方法

より早期の胚を処理するにはニワトリ杯を New の方法で培養した。購入した鶏卵を摂氏 38 度で約 8 時間から 12 時間培養した。Hamburger and Hamilton のステージで 3 の早期と考えられる卵から胚を摘出した。ついで羊膜ごと、胚を New の方法で培養皿 (小ペトリ皿) の上で培養した。ペトリ皿を十分に加湿した培養器の中に再度入れ、約 1 時間培養を行った。やや後期のニワトリ杯を培養するには in Ovo での培養を行った。早期の胚を薬液処理をするには胚にマイクロシリンジ (ハミルトンシリンジ) を用いて薬液を胚に注入した。初期の実験結果では、胎生初期に noggin でニワトリ胚を処理しても、胚の外観には大きな変化が得られなかった。これは、投与方法にも問題がある可能性が否定できないが、まず、処理するニワトリのステージを Hamburger and Hamilton のステージ 3 から 10-14 (より後期) へと変更した。やや大きめのニワトリ胚を noggin で処理した。

また、前述のように、マイクロマニピュレータを用いて胎生初期胚 (Hamburger and Hamilton の 3 前後) に操作を行っても、外観上あまり変化のある個体が得られなかったことから、後期の実験では、sonoporation のテクニックを用いて遺伝子導入を試みた (具体的には Hamburger and Hamilton のステージで 12 から 16 程度)。

胚の数が集まった時点で、whole mount in situ hybridization の手法で SOX

2 の発現を調べた。

#### 4. 研究成果

理由は明らかでないが、胎生早期に（ハン Hamburger and Hamilton のステージの 3-6 程度の時期に処理をしても異常は認められなかった。現時点で考えられる理由は、マイクロシリンジを使用して薬液を注入しても、細胞内に上手く薬液が入らなかった可能性も否定できないが、それ以上に、胚のステージ依存性（処理をした時期の胎児の成長度）が *noggin* にあるのではないかと考えられた。

それに対し、比較的後期に処理をした場合（Hamburger and Hamilton のステージで 15 前後）には外観上 *tail bud* が短く、かつ太くなった個体が得られた。このような個体を *in situ hybridization* の手技で調べたところ、正常個体に比べて神経管の発達が異常であることが確認された。

このことから、*noggin* などは非常に狭い時期選択性を持ち、かつ神経管の正常な発達に必要なと思われる。

一次神経管の発生、その異常に起因すると考えられる開放性二分脊椎に関しては、以前から研究が進められており、多くの成果が得られている。また、開放性二分脊椎の代表疾患である脊髄髄膜瘤の発生原因に関する知見は、多くの研究者に受け入れられている。それに対し、二次神経管の正常発生に関する研究は少ない。さらに、その発生異常によると思われる、閉鎖性二分脊椎の発生病態の検討に関する研究は少ない。

本研究の後期に得られた、異常な胎児はその形態からは、ヒトで見られる、比較的重

度の閉鎖性二分脊椎に類似していた。また、*whole mount in situ hybridization* で調べた *sox-2* の発現実験の結果は、神経管が正常に分化しておらず、本来なら上手く分化するものが、凝集しているような所見が得られた。この所見も、ヒトの脊髄脂肪腫例に見られる脊髄末梢部の異常に相関があると考えられた。

当初は、より早期の神経管の発生に *noggin* などが関与していると考えたが、結果的には *noggin* は時期選択性に二次神経管の発生に関与している可能性が示唆された。本研究からは、二次神経管の異常な発達に起因すると考えられる閉鎖性二分脊椎の発生病態の解明に、このような研究を続けることが必要と考えられた。

ただし、前述のように、神経の発生には、*noggin* のみならず、*chordin*, *folistatin*, *MRP* グループなどが複雑に絡み合っていることも示唆されており、より、一層の検討が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 稲垣隆介、特集、二分脊椎への取り組み、二分脊椎の発生と予防対策  
雑誌名：小児外科、41 巻、(印刷中)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 稲垣隆介、河本圭司、二分脊椎症に必要な神経発生、第 26 回日本二分脊椎研究会、平成 20 年 6 月、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣隆介 (INAGAKI TAKAYUKI)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10213109

(2) 研究分担者

山内康雄 (YAMANOUCHI YASUO)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00121997

(3) 連携研究者