

平成22年5月31日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390050  
 研究課題名（和文） 脳の初期形態形成における遺伝子と環境要因の相互作用ならびに  
 その障害による発生異常  
 研究課題名（英文） Gene-environmental interaction in early morphogenesis of the brain  
 and developmental anomalies due to its disturbance  
 研究代表者  
 塩田 浩平（SHIOTA KOHEI）  
 京都大学・大学院医学研究科・名誉教授  
 研究者番号：80109529

## 研究成果の概要（和文）：

Sonic hedgehog (Shh)分子はCNSの腹側形成因子であるが、本研究ではShhが脳の皮質形成、眼球の腹側部の形成にも関与していることを初めて明らかにし、関連分子との関係も解明した。また、妊娠初期のエタノール曝露は前脳の分化を障害して全前脳胞症の原因となるが、マウスモデルを用いた実験で、エタノールがprotein kinase Cを活性化することによって脳の原基におけるShhの発現を抑制しHPEを誘発することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Sonic hedgehog (Shh) is a ventralizing factor in the developing brain. In this study, we showed that Shh is involved in the formation and patterning of the cerebral cortex and the morphogenesis of the ventral part of the eye. Ethanol exposure in early development can result in holoprosencephaly (HPE), which is a developmental anomaly of the forebrain. We used a mouse model of ethanol-induced HPE, and revealed that ethanol activates protein kinase C in the prechordal mesendoderm, thereby impairs the expression of Shh in the embryo and induces HPE malformations.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）（6901）

キーワード：脳、形態形成、遺伝子、環境要因、発生異常

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子ノックアウトマウスなどを用いた実験によって、脳の形態形成を制御する

分子とその機能が同定され、それらの機能異常による脳の発生異常が次々に明らかにされてきているが、ヒトの脳の発生異常の多く

はその原因と病理発生メカニズムが不明なままである。これは、分子の機能と高次の形態および機能との関連が十分解明されていないことによる。また、多くの中脳神経系 (CNS) 先天異常の発症には、胎生期の環境条件や、遺伝子と環境要因の相互作用が重要と推定されている。しかし、両者の相互作用は単純ではなく、ヒトの先天異常を予防するためにも、新たな視点と研究アプローチによる問題の解明が急務である。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変動物および異常誘発実験モデルを組み合わせて、脳の正常および異常発生に対する Sonic hedgehog (Shh) および関連の分子の役割、ならびに CNS の異常発生における遺伝子と環境要因 (エタノール) の相互作用を実験的に明らかにする。特に、CNS の中でも複雑な構造と機能を有する前脳の形態形成機構に焦点を当てて、そのメカニズムを形態と分子の両面から明らかにし、併せて全前脳胞症 (holoprosencephaly, HPE) に代表される前脳の発生異常の異常発生メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 大脳の形態形成における Shh 分子の役割

Shh ノックアウトおよび大脳皮質特異的 Shh コンディショナルノックアウト (CKO) マウスを用い、初期ニューロンの増殖分化から大脳皮質形成に至る終脳の形成過程における Shh と関連分子の役割を形態学的方法と分子細胞生物学的方法により明らかにする。特に、これまで不明であった大脳皮質形成における Shh の機能を重点的に調べる。

### (2) 全前脳胞症 (HPE) の発症における遺伝子と環境要因の関与

妊娠中のエタノール曝露による HPE 発症のマウスモデルを作製し、エタノール曝露を受けたマウス初期胚において形態形成や神経分化に関わる遺伝子の発現がどのように修飾されて正常な発生過程が攪乱されるかを調べ、脳の異常発生における遺伝子と環境要因の相互作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) Shh は CNS の腹側形成因子であることが明らかにされているが、大脳皮質形成過程における Shh 発現パターンや役割は不明であった。本研究によって、終脳背側において Shh が増殖中の神経幹細胞を中心に発現し、発生後期には分化した神経細胞からも分泌されることを明らかにした。

さらに、終脳背側特異的に Shh の発現を抑制するコンディショナルノックアウトマウスを作製して解析した結果、Shh シグナルが神経幹細胞の細胞周期を制御することによ

って細胞の増殖や生存、分化のタイミングをコントロールしていること、ならびに大脳皮質のパターニングにも重要な役割を果たしていることを明らかにした。これは、大脳、特にその背側の発生分化にも Shh が関与していることを初めて明らかにした重要な成果である。

(2) Shh シグナル下流の因子である線維芽細胞増殖因子 15 (Fgf15) が発生中の間脳と中脳に発現することから、Fgf15 の役割を解明する目的でプロモーター解析を行った。その結果、Fgf15 遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域にある Gli 結合部位 (GliBs) に活性型 Gli2 が、Gli 応答エレメント (GliRE) に抑制型 Gli2 が結合することがわかった。この結果から、抑制型 Gli2 が GliRE に結合することによって脳の原基における Fgf15 の発現を制御していることが明らかになった。

(3) Shh が胚の眼の原基に発現することから、マウス胚の眼原基における Shh と関連遺伝子の発現を解析し、以下のことを明らかにした。

① Shh は眼杯茎 (optic stalk) における Pax2 の発現を誘発し、眼杯 (optic cup) における Pax6 の発現を抑制する。

② Shh は、Vax1, Vax2, Pax2 の発現を活性化することによって眼杯の近位-遠位軸および背腹軸の形成に関与する。

③ 発生中の眼の網膜の背側部に Bmp4 が発現し、それが Tbx5 の発現を活性化することによって、腹側化因子である Shh と拮抗する。

④ Shh シグナルの細胞内への伝達に関与する分子である Smoothened (Smo) の発現を抑制したコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作製して解析したところ、Smo CKO マウス胚では、眼杯の腹側の陥入が障害されたが、背側部と眼杯茎は正常に分化した。Smo CKO マウス胚では、眼胞における Bmp4 の発現が増強した一方、Vax1 と Vax2 の発現が低下し、やや遅れて Pax2, Pax6 の発現も抑制された。この結果から、Smo CKO マウスでは、眼杯全体で Bmp4 の発現が増強することによって腹側化因子である Shh シグナルが抑制され、その結果、Vax1, Vax2 の活性化が起こらないために眼球の腹側の分化が障害されて、眼の発生異常が誘発されると考えられた。

(3) 妊娠初期に摂取されたエタノールは HPE 奇形の原因になる。胚のエタノール曝露による HPE の発現機序を明らかにするため、妊娠 7 日の C57BL/6J マウスにエタノールを腹腔内投与し、胎児における Shh 遺伝子の発現と Shh シグナルのアンタゴニストである protein kinase A (PKA) の活性化を調べた。その結果、エタノール

処理群の胎児の脊索前中内胚葉 (PME) で、Shh の発現が抑制されPKA が活性化されていることが明らかになった。また、抗酸化作用をもつビタミンC, E でマウス胚を前処理すると、PME の細胞死が抑制され、HPE の発症も減少した。この結果から、妊娠初期のエタノールは、PKA を活性化することによって Shh の発現を抑制しHPE を誘発すること、およびその病理発生過程に細胞死が関与していることが明らかになった。

#### 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 34 件)

- ① Shiota K, Yamada S: Early pathogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet Part C* 154C:22-28, 2010 (査読あり) .
- ② Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K, Ishibashi M: Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mech Dev* 127(1-2):62-72, 2010 (査読あり)
- ③ Komada M, Saitsu H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K, Ishibashi M: Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development*, 135, 2717-2727, 2008 (査読あり)。
- ④ Komada M, Saitsu H, Shiota K, Ishibashi M: Expression of Fgf15 is regulated by both activator and repressor forms of Gli2 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 369(2):350-356, 2008 (査読あり) .
- ⑤ Aoto K, Shikata Y, Higashiyama D, Shiota K, Motoyama J: Fetal ethanol exposure activates protein kinase A and impairs Shh expression in prechordal mesendoderm cells in the pathogenesis of holoprosencephaly. *Birth Defects Res Part A*

82(4):224-231, 2008 (査読あり) .

- ⑥ Higashiyama D, Saitsu H, Komada M, Takigawa T, Ishibashi M, Shiota K. Sequential developmental changes in holoprosencephalic mouse embryos exposed to ethanol during the gastrulation period. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007 Jul;79(7):513-523, 2007 (査読あり) .
- ⑦ Shiota K, Yamada S, Komada M, Ishibashi M: Embryogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet (Part A)* 143A:3079-3087, 2007 (査読あり) .

[学会発表] (計 18 件)

- ① Shiota K: The interplay of genetic and environmental factors in human dysmorphogenesis: Holoprosencephaly as a model. インドネシア解剖学会, 2009年8月7日、Jogjakarta, Indonesia.
- ② Shiota K, Yamada S, Uwabe C: Holoprosencephaly in the Kyoto collection of human embryos: Phenotypic variability and epidemiologic characteristics. The 35<sup>th</sup> European Teratology Society Meeting, 2007年9月3日、Bratislava, Slovakia.

[図書] (計 5 件)

- ① Pooh RK and Kurjak A(編)、Jaypee Brothers Medical Publishers、FETAL NEUROLOGY、2009. PP.1-13.
- ② Kurjak A and Chervenak FA(編)、Jaypee Brothers Medical Publishers、Controversies on the Beginning of Human Life、2008. PP.151-165.

[その他]

ホームページ:

<http://www.cac.med.kyoto-u.ac.jp/>  
(京都大学医学研究科先天異常標本解析センター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 浩平 (SHIOTA KOHEI)  
京都大学・医学研究科・名誉教授  
研究者番号：80109529

(2) 研究分担者

石橋 誠 (ISHIBASHI MAKOTO)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30232341

滝川 俊也 (TAKIGAWA TOSHIYA)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：902630095

山田 重人 (YAMADA SHIGEHITO)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80432384