

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790163  
 研究課題名(和文)ニワトリ胚、マウス胚を用いた尾部退行症候群(人魚病)発症分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)The analysis of molecular mechanism of Caudal Regression Syndrome (CRS)

## 研究代表者

鈴木 堅太郎 (SUZUKI KENTARO)  
 熊本大学・発生医学研究所・助教  
 研究者番号：20404345

## 研究成果の概要(和文)：

外生殖器、後肢を含む後方体幹部に形態異常がおこる尾部退行症候群は、その発症メカニズムがほとんどわかっていない先天性疾患である。本研究から、増殖因子の1つである Bmp4(骨形成タンパク質4)が初期のパターン化遺伝子の発現を制御し、後方体幹部形成の形成に必須であることがわかった。本研究により尾部退行症候群の発生メカニズムを理解する上で有用なモデルマウス(Bmp4 遺伝子コンディショナル遺伝子改変マウス)を確立することができた。

## 研究成果の概要(英文)：

Caudal regression syndrome (CRS) comprises developmental anomalies of the caudal vertebrae, urogenital organs and hind limbs. The mermaid like phenotypes has been often described in many literatures including old legends. However, the pathogenetic mechanisms are not understood. This study suggested that Bmp4, one of the Bmp ligands, may be essential molecule to make the caudal body with regulating the expression of patterning genes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：先天異常学、奇形学、尾部退行症候群(人魚病)、増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

尾部退行症候群(人魚病)は外生殖器、後肢を含む後方体幹部に見られる形態異常の総称で、軽微な尾椎の欠失から左右の後肢が癒着してしまう重篤なものまで様々である。原腸

陥入は多細胞生物の形成に必要な細胞供給を担う重要なイベントであり、胚体の後部末端まで起こると必ず停止する。この原腸陥入の停止が早期に起こってしまうことが尾部退

行症候群を引き起こす原因の1つとして考えられるが、現在のところ、その発症メカニズムをはじめ後方体幹部の発生分子メカニズムでさえほとんどわかっていない。

私はこれまでニワトリ胚を用いた実験系で増殖因子の1つであるBmp（骨形成タンパク質）シグナルが原腸陥入の停止に深く関与していることを見出した（図1）。さらに興味深いことにBmpのアンタゴニストである*Noggin*を過剰発現させたニワトリ胚は、後肢が癒合してしまうという、いわば、尾部退行症候群発症様の形成異常を示した（図2）。

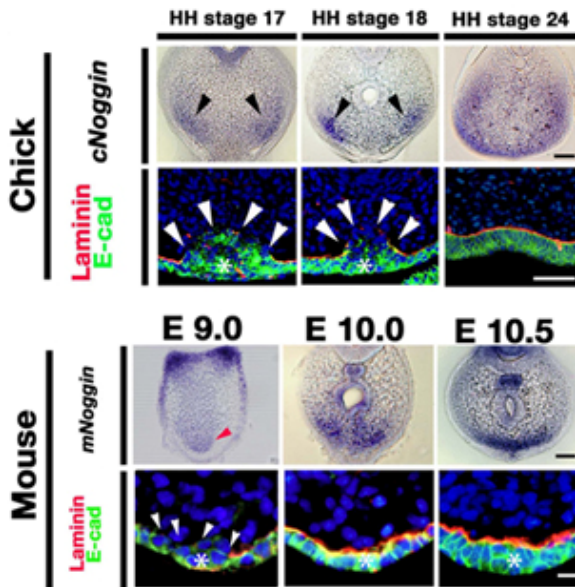


図1 ニワトリ胚において、Bmpのアンタゴニストである*cNoggin*の発現は尾部腹側間葉の側方に発現する（黒矢頭）。*cNoggin*の発現が弱い部位では基底膜の崩壊が観察される（白矢頭）。このような基底膜の崩壊は*cNoggin*の発現が尾部腹側間葉全体に及ぶ時期（HH stage 24）になると観察されなくなる。一方、マウス胚の尾部形成過程でもニワトリ胚と同様に、*mNoggin*の発現が強まるに従って基底膜の崩壊は観察されなくなる（E 10-10.5）。*Noggin*の発現の有無と原腸陥入の停止との関連性が示唆される。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。

## 2. 研究の目的

ニワトリ胚は遺伝子導入が容易であり細胞系譜を調べる実験系として極めて有効である。一方、マウスは遺伝学的解析をする際非常に強力なツールである。本研究は、それ

ぞれの実験系のメリットをいかし、分子レベルおよび細胞系譜の両局面から尾部退行症

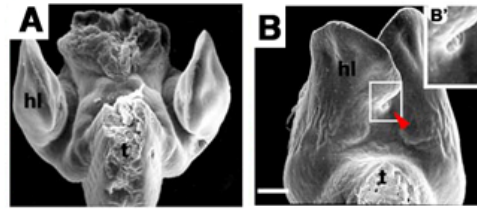


図2 *Noggin*を過剰発現させたニワトリ胚は、後肢が癒合してしまう(B, B' 白枠部拡大図)。hl; hind limb, t; tail、スケールバー;200  $\mu\text{m}$ 。

候群の発症メカニズム、さらに後方体幹部の発生メカニズムを総合的に理解することを目的とする。さらに、尾部退行症候群の発生メカニズムを理解する上で有用なモデルマウスを確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 泌尿生殖器系および後肢形成に寄与する細胞系譜の解析

ニワトリ胚は、細胞系譜を調べる実験系として極めて有効である。原腸陥入の最終段階で出現する中胚葉性細胞のうち、泌尿生殖器系の器官形成および後肢形成に寄与する中胚葉性細胞を明らかにするため、ニワトリ胚を用いたDiIラベル実験を行った。

### (2) 尾部退行症候群発症メカニズムの解析 {細胞系譜（細胞移動）異常の関与}

原腸陥入を経た中胚葉性の細胞は、様々な器官を形成するため器官形成予定領域に適切かつ正確に移動する必要がある。私はこの適切な細胞移動ができなくなることが尾部退行症候群を引き起こす一因ではないかと考えた。また原腸陥入期における早期のBmp（骨形成タンパク質）シグナルの減弱が後部体幹部の形成異常をきたすと考えられる。そこでBmpシグナルが減弱した中胚葉性の細胞系譜を調べるため、原条末端領域でBmpのアンタゴニストである*Noggin*を強発現しBmpシグナルの活性が低下した細胞の振る舞い（細胞移動）を調べるため、DiIラベル実験を行った。

### (3) 尾部退行症候群発症および分子メカニズムの解析

通常の遺伝子ノックアウトマウス法の場合、遺伝子の機能が重要であればあるほどそのノックアウトマウスは胎生初期で死ん

でしまい、器官形成過程における機能を調べることが難しい。Bmp 遺伝子群の場合も同様で、多くの場合胎生初期で死亡してしまう。そこで胎生致死を避けるため Cre-loxP システムを用いたコンディショナル遺伝子機能喪失法を用い、尾部退行症候群様モデルマウスの作成を試みた。

#### 細胞増殖・細胞死の解析

器官形成過程において適切な細胞増殖および細胞死の制御は極めて重要である。そこで本研究で確立した Bmp 4 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスにおいて細胞増殖・細胞死に変化が観られないか細胞増殖は BrdU 取り込み実験で、細胞死は TUNEL 法により調べた。

#### 遺伝子発現解析

これまでの遺伝子発現解析の結果から後方体幹部発生過程においても多く器官形成に深く関与する遺伝子群が発現していることがわかった。Bmp4 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスと野生型において、特に四肢形成および外生殖器形成過程において重要な発生制御因子群の遺伝子発現を whole mount in situ 法により調べた。さらに必要に応じて組織レベルでの発現を詳しく調べるため、切片 in situ および免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ステージ 10 のニワトリ胚を中心に、原条末端領域を DiI でマーキングし5日後に DiI ポジティブな細胞が何処へ移動するのか調べた。その結果、DiI をラベルする時期により、原条末端由来の細胞が寄与するであろう器官は大きく異なることがわかった。また、将来の外性器および後肢を形成する細胞群を同定することができた(図3)。将来の外生殖器の一部を構成する総排泄腔膜は限定

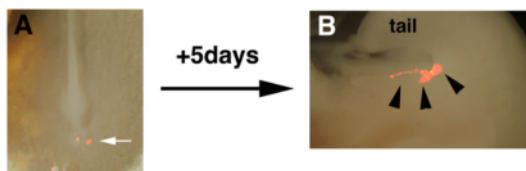


図3ニワトリ胚を用いた DiI ラベリング実験  
総排泄腔膜(B:黒矢印)形成に寄与する細胞集団は、原腸陥入停止直前の原始線条およびその周辺の細胞群(A:白矢印)に由来する。

した場所に存在する細胞集団から形成され

るが、後肢を形成する細胞集団は広範囲に存在している可能性が示唆された。

(2) 正常胚において DiI ポジティブな細胞は、体幹中心部から遠ざかるように移動した。一方、*Noggin* の強発現により Bmp シグナルの活性が低下した細胞は逆に中心部へ移動することがわかった。よって Bmp シグナルは原腸陥入後の細胞の適切な移動に必須である可能性が示唆された。

(3)- Bmp 遺伝子群のノックアウトマウスは、機能の重要さゆえ胎生初期に死亡してしまう。この問題を回避するため、私は Cre-loxP システムを用いていくつかの Bmp 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製しその表現型を調べた。その結果、Bmp の1つである Bmp4 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスが、外生殖器を含む泌尿生殖器の異常等、尾部退行症候群に類似した表現型を示すことがわかった。

(3)- Bmp4 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスが尾部退行症候群に類似した表現型を呈する原因を理解するため、細胞増殖、細胞死の変化を野生型と比較した。特に細胞死に関して、Bmp4 は四肢形成、外生殖器形成の両過程において促進因子としての機能が報告されている。胎生 9.5 日齢から E11.5 まで調べたが、野生型と比較して顕著な違いは観られなかった。よって少なくとも Bmp4 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスに見られる尾部退行症候群様の形成異常は、細胞増殖、細胞死の変化が原因ではないことが示唆された。Bmp ファミリーの1つの特徴としてその機能の重要さゆえ、それぞれの機能を補償し合う(相補作用)ことが知られている。Bmp4 が発現する領域では、その他の Bmp リガンドが発現していることから、後方体幹部の発生においても Bmp は補償的に機能しており、その Bmp リガンドを同定することは興味深いと考える。

(3)- これまで行ってきた遺伝子発現解析により、多くの遺伝子群はニワトリ胚およびマウス胚において共通に発現している。本研究では、まず *Fgf8*、*Shh*、*Wnt* 遺伝子等四肢形成および外生殖器形成過程に重要な機能を有している発生制御因子群の発現を調べた。しかし、これらの遺伝子の発現に大きな変化は観られなかった。興味深いことにパターン化遺伝子の1つである *Tbx* 遺伝子群の発現が野生型に比べ、変化していることがわ

かった。以上の結果より後方体幹部の発生過程において Bmp シグナルは、細胞増殖，細胞死の制御ではなく初期のパターン化に寄与している可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表](計1件)

第32回日本分子生物学会(平成21年12月9日~12日、パシフィコ横浜、神奈川)  
Wnt/beta-catenin シグナルによる外生殖器原器隆起点の決定メカニズム、鈴木堅太郎、中田翔子、中瀬直己、Westphal Heiner、山田源

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

鈴木 堅太郎 (SUZUKI KENTARO)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：20404345