

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590221

研究課題名（和文） Hes1 および FRS2 α による間葉性神経堤細胞の細胞分化制御機構の解析研究課題名（英文） Roles of Hes1 and FRS2 α for differentiation of mesenchymal neural crest cells

研究代表者

亀田 芙子 (KAMEDA YOUKO)

北里大学・医学部・名誉教授

研究者番号：10032898

研究成果の概要（和文）：

Notch-Hes シグナルは多くの組織で細胞分化を抑制し幹細胞を維持している。神経系で Hes1 は proneural gene である Mash1 や Ngn2 の発現を抑制し、神経前駆細胞を維持する。Hes1 ノックアウト (-/-) マウスでは神経細胞の分化が早期に起こり、神経管は形成されず脱脳症など脳の形態形成異常が生じる。今回の研究で Hes1 が神経組織の他に多く組織で細胞分化を制御し、その発現に関与することを明示した。①Hes1-/-マウスにおける下垂体隆起部の発生を野生型マウスと比較して調べた。野生型マウスと同様に Hes1-/-マウスにおいて胎生 (E) 11.5 に隆起部原基は形成されたが、その後成長できず E14.5 で退化・消失した。②中脳ドーパミン (mesDA) ニューロンの発生を調べると、Hes1-/-マウスで mesDA ニューロンは正常に形成されたが、E13.5 日から減少し、その走行と分布は野生型のそれらから大きく逸脱していた。さらに多数の mesDA ニューロンが後脳に侵入し、また野生型では後脳のみ局在するセロトニン (5-HT) ニューロンが中脳にも局在するなど、ニューロンの異所性発現が観察された。このように峽に発現する Hes1 が isthmus organizer として mesDA ニューロンや 5-HT ニューロンの局在と分布を制御することを示した。③交感神経上頸神経節 (SCG) および頸動脈小体の発生を調べると、Hes1-/-マウスでは E12.5 で既に SCG の萎縮が生じた。また長期間未分化の状態にとどまり細長い形状を示し、さらに胎齢と共に SCG の体積および細胞数は著しく減少した。E17.5 で体積は野生型 SCG の 26.3% の大きさしかなく、細胞総数は 24.5% しかなかった。Hes1-/-マウス 30 例中 4 例 (13.3%) において第 3 鰓弓動脈由来の総頸動脈が欠損しており、頸動脈小体は形成されなかった。総頸動脈が存在する胎仔では頸動脈小体の形成時期は野生型と同様であったが、その体積は E17.5 で野生型の 52.5% の大きさしかなかった。④神経堤細胞を生産に亘って特異的にラベルできる Wnt1-Cre/R26R トランスジェニック・マウスを解析し、交感神経節のみならず、頸動脈小体は神経性神経堤細胞由来であることを明示した。またこのマウスを Hes1 マウスと交配し Hes1-/-マウスの神経堤細胞をラベルした。Hes1 遺伝子の欠損により鰓弓に分布する間葉性神経堤細胞数が減少し、咽頭内胚葉由来内分泌器官（胸腺、上皮小体、鰓後体および甲状腺）の発生が著しく阻害されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Hes genes are essential effectors of Notch signaling, which regulates the maintenance of progenitor cells and the timing of their differentiation in various tissues and organs. Hes1 represses the expression of proneural bHLH factors such as Mash1 and Ngn2, acting as a negative regulator of neuronal differentiation. The defective morphogenesis of the neural tube and exencephaly are caused in *Hes1* null mutant mice. In the present study, we have indicated that Hes1 plays crucial roles for the development of many tissues in addition to neuronal epithelium

1) The hypophyseal pars tuberalis surrounds the median eminence and infundibular stalk of the hypothalamus as thin layers of cells. The pars tuberalis primordium was formed in the basal-ventral part of Rathke's pouch in the null mutants at E11.5 as well as in wild-type embryos. In contrast to the wild-type, the mutant primordium could not extend rostrally with age and disappeared at E14.5, resulting in lack of the pars tuberalis.

2) Despite the severe defects of neurogenesis, the mesencephalic dopaminergic (mesDA) neurons were specified in the *Hes1* null mutants at the midline of the ventral mesencephalon in close proximity to two signal centers - floor plate and med/hindbrain boundary (i. e., the isthmus organizer). From E13.5 onward, the cell number and fiber density of the mesDA neurons decreased in the null mutants. Their distribution pattern was also different from that of the wild type. In particular, mesDA neurons grew dorsally and invaded the rostral hindbrain. 5-HT neurons were also ectopically located in the mutant midbrain. Thus, the loss of *Hes1* resulted in disturbances in the inductive and repulsive activities of the isthmus organizer.

3) *Hes1* represses the expression of proneural factor *Mash1* which is essential for the differentiation of the sympathetic ganglia and carotid body glomus cells. The developments of the superior cervical ganglion (SCG) of sympathetic trunk and the glomus cells were severely affected by the loss of *Hes1*. At E17.5, the volume of the SCG in the *Hes1* null mutants was reduced to 26.4% and the cell number was reduced to 24.5% of the values in wild-type embryos. In 4 out of 30 cases (13.4%), the common carotid artery derived from the third arch artery was absent in the null mutants, and the carotid body was not formed. When the artery was retained, the organ grew in the wall of the third arch artery. However, the volume of the carotid body in the null mutants was only 52.5% of the value in wild types at E17.5.

4) Using the *Hes1* mutant mice crossed with *Wnt1-Cre/R26R* mice in which the neural crest lineage was labeled indelibly, we examined the role of *Hes1* for the differentiation of neural crest cells in the pharyngeal region. During the early embryonic development, the mesenchymal neural crest cells colonize the pharyngeal arches and contribute to the migration and growth of the pharyngeal endoderm-derived organs including ultimobranchial body, parathyroid, thymus, and thyroid glands. In *Hes1*^{-/-}·*Wnt1-Cre/R26R* mice, the pharyngeal arches and pouches were normally formed and the neural crest cells were distributed in each arch. However, the cell population was markedly decreased between E12.5 - E13.5, when the pharyngeal organs move into their destined places. In particular, there were few neural crest cells around the primordia of thymus and parathyroid remaining close to the pharyngeal cavity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：Hes1^{-/-} マウス、Wnt1-Cre/R26R double transgenic マウス、神経管形成不全、中脳ドーパミンニューロン、isthmus organizer、神経堤細胞、交感神経上頸神経節、頰動脈小体、第3頰弓動脈

1. 研究開始当初の背景

Notch-Hes シグナルは多くの組織において細胞分化を抑制し幹細胞を維持しており、また一種類の前駆細胞から種々の細胞が分化する際には細胞の運命を決定している。bHLH型の転写調節因子である *Hes1* は神経系にお

いては神経分化を促進する *Mash1*, *Ngn2*, *Ngn3*, *Math1* などの発現を抑制して、神経幹細胞を維持している。*Hes1*^{-/-}マウスでは神経幹細胞が正常より早くニューロンに分化するため、神経上皮が十分に肥厚できず脳や網膜の形態形成に異常がおこる (1)。また消

化器系では内分泌細胞の分化が促進し、膝・腸に異常が生じる(2)。神経堤細胞は頭頸部では神経節細胞への分化の他に間葉性細胞へと分化し、骨、筋肉および結合組織となり、顔面や頭蓋の大部分の形成に関与する。我々は Hes1^{-/-}マウス胎児を解析し、神経堤細胞によって形成される脳髄膜および頭蓋冠が欠損し脳実質が露出していること、頭蓋底下下垂体窩より前方の神経堤細胞で形成される部位の骨化が起らないこと、さらに間葉性神経堤細胞で占められる二次口蓋に形成不全が生じるなど、このマウスが間葉性神経堤細胞の分化障害による形態形成異常と考えられる表現型を示すことを見出した(3)。また間葉性神経堤細胞によって形成される前眼部の形成異常も見出している。

- 1) Hatakeyama, J. et al., (2004) Development 131:5539-5550.
- 2) Jensen, J. et al., (2000) Nature 24:36-44.
- 3) Akimoto, M., Kameda, Y. et al., (2010) J. Craniofac. Surg. 21: 1443-1449.

2. 研究の目的

今まで Hes1 と神経堤細胞との関連は全く注目されていなかったが、我々は Hes1^{-/-}マウスの頭頸部で、間葉性神経堤細胞が分布する器官の発生が異常になることを見出した。神経堤細胞は多くの細胞に分化する幹細胞であるので、経時的に明確にラベルすることが神経堤細胞の研究には必須である。Wnt1-Cre/R26R ダブル・トランスジェニックマウスを用いると遺伝的に生涯に亘って神経堤細胞および神経堤由来細胞を特異的にラベルできる。Hes1^{+/-}マウスとWnt1-Cre/R26R マウスを交配し、Hes1 ホモ変異体 (-/-) マウスにおいて、神経堤細胞の移動、分化、発達を詳細に解析し、Hes1 遺伝子がどのように神経堤細胞の分化を制御し、各器官の発生に関与しているかを明らかにする。今回、神経堤細胞によってその発生が調節されると考えられている、内胚葉由来内分泌器官 - 鰓後体(甲状腺C細胞)、上皮小体、胸腺、甲状腺- の分化・発達を調べる。ヒトの遺伝病として最も高頻度に発現するDiGeorge 症候群は各鰓弓に侵入する間葉性神経堤細胞の異常が原因と考えられており、特異な顔貌、免疫不全症、甲状腺機能低下症、低Ca⁺⁺血症、心血管異常などがみられる。今回の研究でHes1の欠落がDiGeorge 症候群の原因の一つとなる可能性を示す。

さらに下垂体隆起部、中脳ドーパミン・ニューロン、交感神経幹、頸動脈小体などの発生が Hes1 の支配を受けることを見出したので報告する。

3. 研究の方法

(1) 各胎令の Hes1^{-/-}マウス胎児を採取、固定・連続切片を作製して、下垂体隆起部、中脳ドーパミン・ニューロン、交感神経上頸神経節、頸動脈小体、および咽頭内胚葉由来内分泌器官(甲状腺、鰓後体、胸腺、上皮小体)の形成・分化・発達を野生型と比較して調べた。

(2) Wnt1 は神経堤細胞に特異的に発現する遺伝子である。Wnt1-Cre トランスジェニックマウスを Cre 組み換えによってβ-galactosidase 活性を示す Rosa26R (R26R) レポーター・マウスと交配すると X-gal 組織化学染色によって神経堤細胞を生涯に亘って特異的にラベルできる。Wnt1-Cre/R26R ダブル・トランスジェニックマウスを用いて神経堤細胞を可視化し、その発生を調べた。

(3) Hes1 の欠損が神経堤細胞の発生にどのように影響するか調べるため、Hes1^{+/-}・Wnt1-Cre マウスと Hes1^{+/-}・R26R マウスを交配し、Hes1^{-/-}・Wnt1-Cre/R26R マウスを作製した。

(4) Hes1^{-/-}マウスの各組織(隆起部、中脳、交感神経上頸神経節、頸動脈小体、甲状腺、鰓後体、胸腺、および上皮小体)を各組織のマーカーとなる各種抗体を用いての免疫組織化学、cRNA プローブを用いての in situ ハイブリダイゼーションで調べた。Wnt1-Cre/R26R マウスではβ-galactosidase の発現を調べるために X-gal 組織化学染色を行って観察した。

(5) TUNEL 法によってアポトーシスを起こしている細胞を同定した。

(6) 有糸分裂を起こしている細胞を特異的にラベルできる Phospho-Histone H3 抗体を用いて細胞増殖を調べた。

(7) 中脳ドーパミン・ニューロンの総数、交感神経上頸神経節および頸動脈小体の体積と細胞総数、アポトーシス数、増殖中の細胞数を分析ソフト (WinROOF) を用いて定量的に解析した。

4. 研究成果

①下垂体隆起部は正中隆起と下垂体ロータを取り囲む薄い細胞層である。隆起部細胞はメラトニン・リセプターと各種時計遺伝子を発現しており、下垂体ホルモンの分泌周期を調節している。Hes1^{-/-}マウスにおける隆起部の形成・分化・発達を隆起部細胞の各種マーカーを用いて野生型と比較して解析した

(4). すなわちα-subunit of glycoprotein hormone (αGSU) cRNA プローブを用いての in situ ハイブリダイゼーション、および LHα subunit, chromogranin A, TSHβ の抗体を用いての免疫組織化学で調べた。野生型マウス

では隆起部原基は胎生(E)11.5日でラトケ囊の腹側基部に形成され、E13.5で間脳に接触し、胎令と共に間脳基部に沿って頭側へと伸長する。Hes1^{-/-}マウスでは野生型と同様にE11.5で隆起部原基は形成されたが成長せず、間脳形成不全のため間脳からの刺激を受けられず、E14.5で退化・消失した。このようにHes1は下垂体隆起部の分化・発達のための必須遺伝子であることを明らかにした。

4) Akimoto M, ---Kameda Y. (2010) Cell Tissue Res. 340: 509-521.

②Hes1は野生型マウス神経系において、胎生初期に2つのシグナルセンター、中脳・後脳境界部(峽)と基板底部、に発現する。中脳ドーパミン(mesDA)ニューロンはこれらシグナルセンターに接して中脳腹側底正中に形成され、発生が進むとその神経線維は線条体へと投射する。Hes1^{-/-}マウスにおけるmesDAニューロンの形成・分化・発達を2つのmesDAニューロン・マーカー—tyrosine hydroxylase (TH)とPitx3—を用いて野生型と比較して解析した(5)。Hes1^{-/-}マウスでは神経組織のみならず頭頸部の間葉性神経堤細胞の分化が阻害されるため、脳髄膜と頭蓋冠が欠損し、脳脱出症が生じた。神経管が形成されないため中脳は基板のみからなり翼板は欠損し、細胞増殖が起こる脳室上皮は脳表面に露出していた。終脳および間脳腹側部の形成不全も生じた。このように著しい脳の形成不全にもかかわらず、Hes1^{-/-}マウスでmesDAニューロンは野生型と同様にE11.5でTHの反応を示し、形成・分化は正常に起こることが分かった。E12.5日では細胞分化が早まるため、野生型より多数のTH—およびPitx3-陽性ニューロンが存在した。しかしE13.5日からmesDAニューロンは減少し、特に神経線維の減少が著しかった。野生型ではE14.5日からTH陽性線維は前方に伸びE15.5日で線条体に達するが、Hes1^{-/-}マウスでは神経線維の著しい減少の他に、その走行と分布が野生型のそれらから大きく逸脱していた。さらに多数のTH陽性線維が後脳に侵入し、また野生型では後脳のみにも局在するセロトニン(5-HT)ニューロンが中脳にも局在するなど、ニューロンの異所性発現が観察された。峽に発現するHes1がisthmus organizerとしてmesDAニューロンや5-HTニューロンの局在と分布を制御すると考えられる。

5) Kameda et al., (2011) Dev. Biol. 358:91-101.

③Wnt1-Cre/R26Rダブル・トランスジェニックマウスを使用すると神経堤細胞を神経板に生じる発生初期から、移動中および各種細胞に分化した後の神経堤由来細胞をも生涯

に亘って極めて特異的にラベルできる。このマウスの発生を解析し、神経堤細胞の移動、頭部・顔面・頸部における分布および細胞分化を調べた。特に頸動脈小体について解析した(Kameda et al., Dev. Dyn. in press)。頸動脈小体は主細胞と支持細胞から成るが、各胎令の頸動脈小体の全細胞はβ-galactosidase(gal)の強い反応を示した。また各胎令の交感神経上頸神経節もβ-galの強い反応を示した。すなわち交感神経上頸神経節および頸動脈小体主細胞は神経性神経堤細胞由来であることを明示した。第3鰓弓動脈は鰓弓に侵入する間葉性神経堤細胞によって形成される。頸動脈小体原基は第3鰓弓動脈壁に形成されるが、第3鰓弓動脈壁および第3鰓弓動脈壁由来の総頸動脈壁もβ-galの強い反応を示した。すなわち頸動脈小体支持細胞は間葉性神経堤細胞由来の細胞であることを示した。

④神経系でHes1はproneural geneであるMash1やNgn2の発現を抑制し、神経前駆細胞を維持している。Mash1は交感神経系や頸動脈小体主細胞の形成に必須の遺伝子であり、Mash1が欠損するとこれらは形成されない。Hes1^{-/-}マウスにおける交感神経上頸神経節(SCG)および頸動脈小体の発生を野生型と比較して調べた(Kameda et al., Dev. Dyn., in press)。野生型マウスの頸部交感神経原基はE12.5で明確となり、E13.5でSCGは下頸神経節から分離し頭側へと移動を始める。E14.5からSCGは成体と同様に頸椎C1-C3のレベルに位置し肥大していく。Hes1^{-/-}マウスではE12.5で既にSCGの萎縮が生じており、また長期間未分化の状態にとどまり、頭側移動や肥厚は起こらず細長い形状を示した。胎令と共に体積および細胞数は著しく減少し、E17.5では体積は野生型SCGの26.3%の大きさしかなく、細胞総数は24.5%しかなかった。野生型マウスの頸動脈小体原基はE13.0で第3鰓弓動脈壁に形成されるが、この時SCGと接しており、E13.5でSCGからの前駆細胞が原基に侵入を始め主細胞へと分化する。Hes1^{-/-}マウス30例中4例(13.3%)において第3鰓弓動脈由来の総頸動脈が欠損しており頸動脈小体は形成されなかった。総頸動脈が存在する胎仔では頸動脈小体は形成され、形成時期は野生型と同様であったが、E17.5で頸動脈小体の体積は野生型の52.5%の大きさしかなかった。第3鰓弓動脈壁に頸動脈小体原基が形成されても、Hes1^{-/-}マウスでは交感神経上頸神経節が低形成のため、主細胞前駆細胞を十分に供給できず、頸動脈小体は発達できなかったと考えられる。Histone H3抗体で免疫染色しSCGおよび頸動脈小体における細胞増殖を調べると、野生型と比較してHes1^{-/-}マウスでは増殖数が著し

く減少していた。このように Hes1 は SCG および頸動脈小体の分化・発達を制御する遺伝子であることが分かった。

⑤咽頭由来内分泌器官の形成・移動は発生初期に各鰓弓に侵入する間葉性神経堤細胞との密接な相互作用によってなされる。

Hes1^{-/-}マウスではこれら咽頭由来器官は欠損するか著しく低形成であり、痕跡的に存続する場合は発芽部位に止まり移動できないことを見出した(6)。各胎令の Hes1^{-/-}マウスで、鰓弓に分布する間葉性神経堤細胞を X-gal 染色をして野生型マウスと比較して調べた(Kameda et al., 投稿中)。各鰓弓が形成・融合する E10.5 - E13.5 の胎仔では X-gal whole mount 染色を行い観察した。Hes1^{-/-}マウスで各鰓弓は正常に形成、分化・融合して咽頭領域は形成された。また間葉性神経堤細胞は鰓弓に分布していたが、野生型マウスと比較して、X-gal の反応は弱かった。次に切片を作製して X-gal 陽性の間葉性神経堤細胞の分布を観察した。胸腺と上皮小体は第3咽頭嚢、鰓後体は第4咽頭嚢、甲状腺は第1と第2鰓弓の間で咽頭腹側正中の甲状腺原基より生じる。鰓後体は E13.5 で甲状腺と結合し、E14.5 から C 細胞として甲状腺内に分散する。野生型マウスでは各原基が生じる咽頭嚢および咽頭内胚葉上皮の周囲には X-gal 陽性の間葉性神経堤細胞が密に分布していた。また野生型マウスでは各原基は下降し成体の位置へと移動するが、移動中の原基も X-gal 陽性の間葉性神経堤細胞で密に包まれていた。一方 Hes1^{-/-}マウスでは各咽頭嚢および各原基の周囲に分布する X-gal 陽性の間葉性神経堤細胞数は減少しており、特に咽頭腔周辺に留まり下降できない胸腺と上皮小体の周囲には X-gal 陽性の間葉性神経堤細胞は殆ど分布していなかった。H3 抗体を用いて免疫染色し細胞増殖を調べると、野生型と比較して Hes1^{-/-}マウスの咽頭領域結合組織の細胞増殖は著しく減少していた。Hes1^{-/-}マウスでは間葉性神経堤細胞が十分に増殖できず、間葉性神経堤細胞との相互作用によって分化・移動する咽頭内胚葉上皮由来の内分泌器官は十分に発達できなかったと考えられる。なお移動は既に E10.5 で終わる甲状腺原基は Hes1 遺伝子の欠損であまり大きな影響を受けなかった。Mash1 によって細胞分化が制御されている鰓後体は殆どの例で退化し、C 細胞は欠損するか、ごく少数が甲状腺内に分布するのみであった。

6) 亀田英子ら、(2010) 解剖学雑誌 85:118.

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 6 件) (すべて査読あり)

- (1) Kameda Y, Saitoh T, Fujimura T: Hes1 regulates the number and anterior-posterior patterning of mesencephalic dopaminergic neurons at the mid/hindbrain boundary (isthmus). *Dev. Biol.* 358(1): 91-101, 2011.
- (2) Akimoto M, Nishimaki T, Arai Y, Uchinuma E, Yamauchi H, Kameda Y: Hes1 regulates formations of the hypophyseal pars tuberalis and the hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 340(3): 509-521, 2010.
- (3) Akimoto M, Kameda Y, Arai Y, Miura M, Nishimaki T, Takeda A, Uchinuma E: Hes1 is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J. Craniofac. Surg.* 21(5): 1443-1449, 2010.
- (4) Arai Y, Gradwohl G, Kameda Y: Expression of neuropeptide Y and agouti-related peptide in the hypothalamic arcuate nucleus of newborn neurogenin 3 null mutant mice. *Cell Tissue Res.* 340(1) 137-145, 2010.
- (5) Kameda Y: *Hoxa3* and signaling molecules involved in aortic arch patterning and remodeling. *Cell Tissue Res.* 336(2):165-178, 2009.
- (6) Kameda Y, Ito M, Nishimaki T, Gotoh N: *FRS2 α* is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus. *Dev. Dyn.* 238(3): 503-513, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 亀田英子、斎藤昂良、根本典子、加藤時雄、井関祥子: Hes1 ホモ変異型マウスにおける交感神経上頸神経節および頸動脈小体の形成不全。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012 年 3 月 28 日、甲府。(解剖学雑誌 87:p118, 2012)
- (2) Kameda Y, Nemoto N, Katoh T: Hes1 gene involved in the development of mesencephalic dopaminergic neurons in the mouse。第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、(J. Physiol. Sci., 61:Suppl.1, S116, 2011)。
- (3) Kameda Y: Signaling molecules involved in the development of thyroid C cells in mice。14th International Congress of Endocrinology。2010 3/27, (Kyoto)。

- (4) 亀田英子ら： Hes1 ホモ変異体マウスにおける甲状腺C細胞の形成不全. 第115回日本解剖学会全国学術集会、2010年3月29日、盛岡. (解剖学雑誌 85: p118. 2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀田 英子 (KAMEDA YOKO)
北里大学・医学部・名誉教授
研究者番号：10032898

(3) 連携研究者

斎藤 昂良 (SAITOH TAKAYOSHI)
北里大学大学院・理学研究科・大学院生
秋本 峰克 (AKIMOTO MINEKATSU)
北里大学大学院・医療系研究科・大学院生
根本 典子 (NEMOTO NORIKO)
北里大学・医学部・技術員
加藤 時雄 (KATOH TOKIO)
北里大学・医学部・技術員