

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790158

研究課題名（和文） 神経堤細胞の発生・分化における Dlg の機能解析

研究課題名（英文） The role of Dlg in neural crest development.

研究代表者

向後 晶子 (KOGO AKIKO)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：20340242

研究成果の概要（和文）：Dlg は、細胞膜近傍に必要な各種蛋白質を繋ぎとめる足場蛋白質として働くと考えられている。また、心臓の心室中隔の形成や、大動脈、肺動脈の形成には、心臓神経堤細胞が深く関与していることが知られている。Dlg 遺伝子を欠損したマウスは心臓周辺に重篤な形態異常を発症することから、Dlg が神経堤細胞の発生に関与しているのではないかと考え、本研究でその可能性を検証した。

研究成果の概要（英文）：Dlg is thought to be a scaffolding protein, which links proteins attached to plasma membrane. Cardiac neural crest cells are known to be involved in the morphogenesis of the heart and outflow tracts. Dlg gene-targeted mice exhibit severe developmental defects in outflow tracts and ventricular septum. We evaluated the possibility that Dlg is involved in the neural crest development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

(1) Dlg とは

Dlg/ SAP97 (discs large、以下 Dlg) は、シロウジョウバエの上皮細胞における癌抑制因子として同定された、膜関連型グアニル酸キナーゼ (MAGUK) 蛋白質の一員である。MAGUK 蛋白質は一般的に足場蛋白質として働くことが知られており、Dlg もまた、神

経細胞のシナプスにあってグルタミン酸受容体や K⁺チャネルに足場を提供すると考えられている。また Dlg は上皮細胞にも広く存在するが、足場蛋白質としての具体的な機能は知られていなかった。

(2) 上皮の発生における Dlg の機能

私は、哺乳類の発生における Dlg の機能に興味をもち、東京大学分子細胞生物学研究所の

秋山徹教授らによって作成された Dlg ノックアウト (KO) マウスの解析を行ってきた。DlgKO マウスでは、100%の割合で顔面の形態異常と口蓋裂が見られ、出生当日にチアノーゼを起こして死亡することが知られていたが、その原因やその他の発生異常の有無などは全く解明されていなかった。このマウスの泌尿生殖器の発生過程を観察したところ、KO マウスでは腎臓、尿管を始めとする泌尿生殖器の低形成や形態異常が見られることがわかった (Iizuka-Kogo et al. Development. 2007)。

(3) Dlg KO マウスにおける心臓奇形

さらに、この研究の過程で、DlgKO マウスの心臓付近を観察したところ、心臓に心室中隔欠損 (が見られ、また肺動脈、大動脈、大動脈弓の形態に異常が見られることを発見した。

(4) 神経堤細胞の発生と心臓奇形

神経堤細胞は、脊椎動物の発生の過程で、頭部から体幹部にかけての神経管の両側で生じる間葉系の細胞集団で、背側から腹側に向かって体内を遊走し、末梢神経組織、色素細胞、頭頸部の骨組織など、非常に多様な細胞種に分化する。以前から、実験的に神経堤細胞を除去した動物では心室中隔欠損を発症するなど、心臓領域に発生異常を発症することが知られていたが、近年、一部の神経堤細胞は鰓弓を通して心臓領域に達し、実際に総動脈幹の中隔形成や、大動脈弓近辺の血管再編に関わることが判明し、この神経堤細胞は心臓神経堤細胞と呼ばれるようになった。

2. 研究の目的

従来、Dlg が心臓発生に関与することや、神経堤細胞の発生に寄与する可能性については全く報告されていなかったが、Dlg KO マウスで口蓋裂、心室中隔欠損などの異常がみられたことから、Dlg は神経堤細胞の発生においてなんらかの機能をもつことが予想された。そこで神経堤細胞の発生における Dlg の機能を明らかにすることを目的として本研究を行った。心臓大血管の先天奇形や口蓋裂は、ヒトにおいても頻繁に見られる異常であり、その発症の一因となる遺伝子の機能を明らかにすることは臨床的にも意義深い。さらに、Dlg は神経細胞や上皮細胞で強発現することから、従来の機能解析ではこれらの細胞が対象とされており、神経堤細胞のような間葉系細胞における機能は全く注目されていなかった。以上のことから、神経堤発生における Dlg の機能解明は、臨床的にも、また基礎的にも重要であると考えられた。本研究の目的遂行に向けて、具体的には、以下の点に着目して研究を行った。

① Dlg は神経堤細胞の形成、移動、分化、生存のうち、どの段階に関与するか？

② 神経堤細胞の挙動を決めているのは神経堤細胞自身の Dlg か、あるいはその周辺の細胞の Dlg か？

③ Dlg は神経堤細胞内でどのようなメカニズムで細胞の挙動を決めているのか？

上記 3 点に加え、研究の途上で使用する Dlg KO マウスを有効に利用するため、神経堤以外の組織において、新規表現型を検索することも、期間中継続して行うこととした。このようにして Dlg の新規機能を見出すことができれば、マウスを有効利用できるだけでなく、神経堤発生における機能を解析する上で参考になると考えたからである。

3. 研究の方法

(1) Dlg KO マウスにおける神経堤由来組織の発生異常の形態学的解析。

(2) Dlg KO マウスにおけるアポトーシス細胞発生の検証。

(3) トランスジェニック技術を用いた神経堤由来細胞の蛍光標識マウスの作出。

(4) トランスジェニックマウスを用いた正常発生における心臓神経堤細胞の挙動の解析。

(5) 正常マウス神経堤組織および周辺組織における Dlg の発現部位の特定。

(6) Dlg KO マウスにおける骨形成過程の観察。

4. 研究成果

(1) 心臓流出路中隔形成不全の検証

Dlg KO マウスでは心臓流出路の中隔形成不全が見られる。この発生機序を検証し、KO マウスでは血管内壁に中隔隆起は形成されるものの、本来 E11.5 から E12.5 にかけて癒合するはずの両側の中隔隆起が癒合していないことを見出した。中隔隆起は神経堤に由来するが、隆起そのものは形成されていたことから、癒合不全の原因が細胞数の減少にあるのか、あるいは癒合現象そのものが阻害されているのかを知ることが、今後の Dlg の機能解明のために必要であると考えられた。

(2) Dlg KO マウス頭頸部におけるアポトーシスの発生

胎生 10.5 日の Dlg 遺伝子 KO マウス頭頸部では、間葉系細胞の細胞死が野生型マウスに比べて増加していた。Dlg 遺伝子 KO マウスでは上顎骨、口蓋骨などの低形成と口蓋裂が必発するので、この過程に神経堤由来細胞の細胞死が関与している可能性が示唆された。

(3) 神経堤由来細胞標識マウスの解析

① トランスジェニックマウス

神経堤発生を追跡するためには、神経堤に由来する細胞を特定する必要がある。そこで神経堤細胞が EGFP によって標識されるマウスを供するため、熊本大学生命資源研究・支援センターより、2 系統のトランス

ジェニックマウス (P0-Cre マウスと CAG-EGFP マウス) を導入・交配して Tg(P0-Cre/CAG-CAT-EGFP)マウスを得た。

② 神経堤細胞可視化の確認

このマウスを用いて、神経堤に由来すると言われている細胞 (末梢神経系、副腎髄質、心臓流出路、顔面など) が EGFP によって標識されることを確認した。

③ 心臓神経堤細胞遊走の観察

胎生 9.5 日~11.5 日にかけて、神経堤細胞が心臓流出路に侵入する過程を観察したところ、左右の咽頭弓を経て移動してきた神経堤由来の細胞集団は、左右 2 つの細胞集団となって心臓流出路内の両側に進入することが確認された。

④ 神経堤細胞における Dlg 発現の確認

Dlg が間葉系の細胞で働く例は知られていない。Dlg が神経堤細胞の発生に関与するとして、間葉系細胞である神経堤細胞自身が Dlg を発現しているのだろうか? 神経堤標識マウスで Dlg 蛋白質の免疫染色を行ったところ、咽頭弓および心臓流出路の神経堤由来細胞で Dlg 蛋白質の発現が確認された。

(4) 神経堤以外の組織における Dlg の機能

① 胸郭部発生異常

Dlg KO マウスの心臓およびその周辺組織の解析途上で、KO マウスにおける胸骨の形態異常を発見した。Dlg 遺伝子 KO マウス胸骨には胸骨裂が多発し、また軟骨部の過剰な石灰化が見られた。胸骨は沿軸中胚葉に由来することから、神経堤由来細胞における Dlg の機能と比較・対比させる意味で、胸骨の発生における Dlg の機能は非常に興味深い。

② 骨形成と Dlg

胸骨はその形成過程が複雑 (2 本の左右胸骨櫛が正中で癒合し、その後はしご状に骨化する) であることから、どの段階に Dlg の欠損が影響しているのかわかりにくかった。そこでより単純な長管骨 (上腕骨および大腿骨) に着目し、その形態、組織観察等を行った。その結果、胎生 15.5 日および胎生 18.5 日の Dlg KO マウス長管骨は野生型よりも有意に短い、骨端部の静止軟骨層の長さには有意差がなく、骨中央の石灰化領域 (肥大軟骨層) が有意に短いこと、一方で骨の太さには有意差がないことが判明した。

(5) 神経堤標識 Dlg KO マウスの作出

上記トランスジーンを持ち、なおかつ Dlg 遺伝子を欠損したマウスを交配によって作出し、神経堤細胞発生に対する、Dlg 遺伝子欠損の影響を直接的に解析することを試みた。実験には胎生期のミュータントマウスが大

量に必要なが、マウスの飼育スペースは限られているため、今年度は、実験に必要な十分数のミュータントマウスを安定的、かつ効率的に供給するための態勢を整備する段階で終わっている。この態勢を維持して今後ミュータント胎仔をサンプリングし、今後解析をさらに進めていく予定である。

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 3 件)

- ① Hasegawa Y, Iizuka-Kogo A, Akiyama T, Senda T. High Expression of Pitx-2 in the ICAT-deficient Metanephros Leads to Developmental Arrest. *Acta Histochem Cytochem* 43 (2) :51-9, 2010 (査読有)
- ② Yoshimi Hasegawa, Kiyotoshi Satoh, Akiko Iizuka-Kogo, Atsushi Shimomura, Ryuji Nomura, Tetsu Akiyama, and Takao Senda: Loss of ICAT gene function leads to arrest of ureteric bud branching and renal agenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 988-994, 2007 (査読有)
- ③ Atsushi Shimomura, Mahito Ohkuma, Akiko Iizuka-Kogo, Kazuyoshi Kohu, Ryuji Nomura, Ei-ichi Miyachi, Tetsu Akiyama, and Takao Senda: Requirement of the tumour suppressor APC for the clustering of PSD-95 and AMPA receptors in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* 26 (4) :903-912, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 千田隆夫、向後晶子
P0-Cre/CAG-EGFP トランスジェニックマウスを用いた心臓神経堤細胞の可視化と Dlg1 発現の解析
日本解剖学会第 115 回全国学術集会
2010 年 3 月 29 日 盛岡
- ② 横山敦司、吉野寧維、尾之内高慶、向後晶子、野村隆士、織田直久、千田隆夫、伊藤光泰 C 末端欠損 APC 発現マウス甲状腺の組織形態学的解析
第 52 回日本甲状腺学会学術集会
2009 年 11 月 3-5 日 名古屋
- ③ 向後晶子、千田隆夫 P0-Cre/CAG-GFP トランスジェニックマウスを用いた心臓神経堤細胞の観察
日本解剖学会第 69 回中部支部学術講演会
2009 年 10 月 10-11 日 浜松
- ④ 千田隆夫、下村敦司、尾之内高慶、野村隆士、向後晶子、酒井一由 APC 蛋白質の C

末端特異的な新規機能の探索
日本解剖学会第 69 回中部支部学術講演会
2009 年 10 月 10-11 日 浜松

⑤ 向後 晶子、千田 隆夫
泌尿生殖管の形態形成における Dlg1 の機能の解析

日本解剖学会第 114 回全国学術集会
2009. 3. 30 岡山

⑥ 千田 隆夫、向後 晶子、秋山 徹
Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスにおける骨形成の異常について

第 40 回日本解臨床分子形態学会
2008. 10. 3-4 福岡

⑦ Akiko Iizuka-Kogo Morphogenesis of the Müllerian Duct and Requirement of Dlg1

International Symposium for Gonad and Brain sex Differentiation
2008. 9. 15 Fukuoka

⑧ Akiko Kogo, Tetsu Akiyama, Takao Senda
The role of Dlg1 (Discs Large Homolog-1) in organogenesis

41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists.
2008. 5. 29 (Tokushima)

⑨ 向後 晶子、秋山 徹、千田 隆夫
胸部器官の発生における Dlg1 の機能
日本解剖学会第 113 回全国学術集会

2008. 3. 28 大分

⑩ 向後 晶子、石田尾 武文、秋山 徹、千田 隆夫

Dlg1 はマウス正中部の器官形成に必要である

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)
2007. 12. 13 横浜

⑪ 向後晶子、千田隆夫 Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスにおける心臓の発生異常
日本解剖学会 第 67 回中部支部学術集会
2007. 10. 14 長久手

⑫ 向後晶子、石田尾武文、秋山徹、千田隆夫
Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスにおける心奇形の発生

第 78 回日本動物学会
2007. 9. 22 弘前

〔図書〕 (計 1 件)

千田隆夫・野村隆士・向後晶子・尾之内高慶
日本組織細胞化学会編 組織細胞化学 2009
「免疫組織化学の原理と応用」 2009 p. 1-18

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~hnagashi/KD/B/open/100011.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向後 晶子 (KOGO AKIKO)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号 : 20340242