

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791215

研究課題名(和文)二分脊椎症モデルSIP1ノックアウトマウスを用いた神経管閉鎖メカニズムの解析

研究課題名(英文)An analysis of mechanism of neural tube closure using the SIP1 knock-out mice as a spina bifida model

研究代表者

西崎 有利子(Nishizaki, Yuriko)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・リサーチレジデント

研究者番号：90378901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：神経管閉鎖障害を示すSIP1ノックアウトマウスを、二分脊椎症のモデル動物として解析し、神経管閉鎖障害のメカニズムを解析することを目的として研究を行った。SIP1ノックアウト胚では、細胞の収縮を担うべき分子が、神経管の収縮側への局在が観察されず、寸断化していることが明らかになった。また、正常胚では、神経管が閉じる背側部位に局所的に見られるBMPの入力シグナルが、SIP1ノックアウト胚では見られなかった。SIP1ノックアウト胚の一部の神経外胚葉は、上皮様の小疱が形成され、神経への分化にも異常が見られていた。本研究により、これまで知られていなかった二分脊椎症の発症原因の特定につながる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanism of neural tube closure defects. For this purpose, we analyze the SIP1 knock-out mice as a spina bifida model. The apical localization of several molecules participating neural tube contraction were found to be insufficient. The phosphorylation of Smad5 on the dorsal side of the neural tube of the SIP1 knock-out embryo was not observed. A part of the neural ectoderm cells of the SIP1 knock-out embryo abnormally differentiated and transformed into the epithelial-like cells with a bleb morphology. These results give some insights into the unknown function of SIP1 in neural tube closure, a fundamental biological process harboring etiologies of spina bifida.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：SIP1 神経管閉鎖 二分脊椎症

1. 研究開始当初の背景

正常発生における神経管は、胚盤葉上皮が肥厚して神経板を形成し、神経板が張表側に折れ曲がってきて神経溝が形成されるとともに、神経板の周囲が盛り上がりできた神経摺が融合して神経管が形成される。この発生過程の異常により引き起こされる二分脊椎症は、日本においては3000人あたり1人と欧米に比べて低発生率であるが、世界的に見た発生率は出生1000人あたり1人前後と高頻度に見られる先天異常である。二分脊椎症の発生には、複数の病因の関与が推定されており、環境要因として胎生早期における葉酸欠乏、ビタミンA過剰摂取、抗てんかん薬の服用、遺伝子要因として、人種、葉酸代謝の多形が知られている。しかし、環境要因ならびに遺伝子要因に関する知見は未だ不十分であり、二分脊椎症の予防・治療に役立てるためには更なる解析が必要である。

SIP1(Smad-interacting protein 1)はzinc finger and homeobox containing factor 1と呼ばれる転写因子の一種であり、そのノックアウトマウスは胎生期9から11日目まで致死となる。その特徴的な表現形の一つとして、頭尾軸全域に沿って二分脊椎症の原因となる神経管閉鎖障害が観察される。また、SIP1はヒトではヒルシュスプルング病の原因遺伝子の一つに挙げられており、SIP1ノックアウトマウスでは、神経管が閉鎖する神経摺領域から、神経堤細胞は形成されるが、その遊走は起こらない。

神経管の閉鎖には、ダイナミックな細胞の形態変化を伴うため、細胞骨格の再構築が要求される。マウスやニワトリの実験から、細胞骨格を制御する低分子量Gタンパク質RhoAや、Wnt/PCPシグナル経路が関与していることが報告されている。しかしながら、SIP1のノックアウトマウスで見られる神経管閉鎖障害が、これらのシグナル経路とどのような関係にあるのか、また、どのような分子メカニズムで起こっているのかについては、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

転写因子SIP1のノックアウトマウスは、神経管が閉鎖しない表現型を示し、胚性致死である。SIP1が神経管閉鎖障害にどのように関わっているのかは明らかになっていない。また、正常な神経管閉鎖のメカニズムに関しても、その詳細な理解は不十分である。本研究では、ヒトの二分脊椎症のモデル動物となるSIP1ノックアウトマウスを使用し、その障害メカニズムを解明することにより、二分脊椎の障害ならびに正常な神経管形成のメカニズムを理解し、将来的に、この疾患の予防や治療に貢献できる基礎研究を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1)SIP1の遺伝子座にGFP蛍光タンパクをコードする遺伝子を挿入し、SIP1とGFPの融合タンパク質を発現するSIP1-GFPレポーターノックインマウスを作成した。このマウスを用いて免疫組織染色を行うことにより、神経管閉鎖期におけるGFPの発現を指標に、SIP1の発現を解析した。

(2)SIP1ヘテロノックアウトマウスの雌雄を交配して得られるホモノックアウト胚を、神経管閉鎖期である8日目及び、その前後(7日目、9日目胚)で凍結切片化し、様々な抗体を用いて免疫組織染色を行い、その胚の表現型(症状)を解析した。

(3)神経管閉鎖過程に重要な役割を担う、Wnt-PCP経路の構成要素であるVangl2の変異マウスを、SIP1ノックアウトマウスを交配し、SIP1遺伝子とVangl2遺伝子の遺伝子相互作用によって、表現型(症状)の重篤化が見られるかどうかを解析した。

4. 研究成果

本研究では、神経管閉鎖障害を示すSIP1ノックアウトマウスを、二分脊椎症のモデル動物として解析し、神経管閉鎖障害のメカニズムを解析することを目的として研究を行った。

まず、神経管閉鎖過程においてSIP1の発現を明らかにするため、SIP1の遺伝子座にGFP蛍光タンパクをコードするDNAを挿入し、SIP1のC末端にGFPが融合したタンパクとして発現するレポーターノックインマウスを作成し、そのGFPの発現を指標にしてSIP1の発現を解析した。その結果、神経管閉鎖過程にあるマウス8日目胚において、SIP1は神経管全体及び体節に発現していることが観察された。

次に、SIP1ノックアウトマウスではどのような異常によって神経管閉鎖障害が起こるのかを、まずは細胞極性について着目し解析を行った。その結果、細胞の収縮を担うべきF-actinは、正常胚では、閉鎖腔側に局在するが、SIP1ノックアウトマウスにおいては、明確な局在が見られなかった。また、正常胚では、閉鎖腔側に沿って索状のリン酸化ミオシン軽鎖が形成されることによって、神経板が筒状に収縮することが知られているが、ノックアウト胚では、この索状のリン酸化ミオシン軽鎖の形成も不十分で寸断化していることが明らかになった。

神経管閉鎖過程には、Wnt-PCP経路の遺伝子が重要な役割を担っていることが報告されているため、SIP1遺伝子とWnt-PCP経路で働く遺伝子との間における相互作用の有無

について解析を行った。Wnt-PCP 経路の構成要素の一つである Vangl2 遺伝子について検討することとし、Vangl2 のヘテロ変異マウスと、SIP1 ヘテロノックアウトマウスを交配し、その仔として得られる SIP1/Vangl2 ダブルヘテロ胚について解析を行った。SIP1 と Vangl2 のそれぞれのヘテロノックアウトマウスは、単独では神経管閉鎖障害を示さないが、この2つの遺伝子に相互作用があれば、神経管閉鎖障害の症状が出現するまたは重篤化することが予想されたが、予想に反して、SIP1/Vangl2 ダブルヘテロ胚に、神経管閉鎖の症状は見られなかった。また、Wnt-PCP 経路の他の構成分子である Daam1 等についても、その分布や発現について解析を行ったが、現在のところ SIP1 ノックアウト胚と正常胚との間で大きな違いは見られていない。これらの結果から、SIP1 と神経管閉鎖障害の原因となる Wnt-PCP 経路との相互作用があるという実験結果は現在のところ得られておらず、Wnt-PCP 以外の経路によって、SIP1 は神経管閉鎖過程に関与している可能性が示唆された。

また、神経管閉鎖過程の神経管細胞の増殖について異常があるかどうかを調べるため、リン酸化ヒストン H3 抗体を用いて免疫組織染色を行ったが、SIP1 ノックアウトマウス胚と正常胚において大きな違いは観察されなかった。

また、SIP1 は、BMP シグナルの伝達を担う Smad と相互作用する分子であるため、BMP シグナル伝達の入力に異常が見られる可能性も考えられたため、BMP シグナル入力の指標となる Smad5 のリン酸化についても解析を行った。その結果、正常胚では、神経管背側に局所的な Smad5 のリン酸化が見られるのに対して、SIP1 ノックアウト胚ではこの局所的なリン酸化が見られていないことが明らかになった。

細胞分化に関しても、各種の分化マーカーを用いて解析を行った。その結果、SIP1 ノックアウト胚の神経管では、未分化神経細胞のマーカーである Sox2 の発現が低下し、上皮細胞のマーカーである E-cadherin の発現が亢進していることが免疫組織染色で確認された。また、SIP1 ノックアウト胚で発生が進むと、本来神経管が形成されるべきところに、神経管の代わりに、大きく膨らんだ空胞の形成が見られる。その組織の分化状態を調べるために、Sox2 と E-cadherin について免疫組織染色を行った。その結果、SIP1 ノックアウト胚に形成される空胞状の組織は、上皮様の一層からなる細胞から構成されており、本来、共に発現することはない E-cadherin と Sox2 を同時に発現していることが明らかになった。

これらの結果から、神経管閉鎖障害を示す SIP1 ノックアウト胚では、神経分化が正常に起こらず、上皮様に変化していること、神経管の閉鎖が起こるべき背側領域で、BMP シグナルが正常に入力されていないこと、神経管の閉鎖腔側の極性が正常に形成されず、閉鎖腔側のアクチン-ミオシンによる細胞収縮が障害されていることが明らかになった。特に、SIP1 が BMP シグナルの伝達分子である Smad のリン酸化を制御している可能性が示唆された点については、神経管閉鎖の現象のみならず、BMP シグナルの制御についての新たな知見につながる可能性を与えるものである。本研究では、神経管閉鎖障害に関わる分子的要素を一つ一つ SIP1 ノックアウト胚で解析することによって、このような方略でしか解明できない神経管閉鎖の分子機構と SIP1 との関係が明らかになってきた。二分脊椎症の発症原因の中でも、これまで明らかにされていなかった部分に関しての新たな知見であり、将来的に、新たな観点からこの疾患の予防や治療に貢献できるような成果につながるものと考えている。

今後の展望としては、SIP1 と二分脊椎症の研究成果にとどまらず、基礎医学分野全般、あるいは分子生物学分野において、多くの注目を集める BMP シグナリングについての新たな制御機構を明らかにする研究として、さらに広い分野に還元される成果が期待される。今後、SIP1 と Smad リン酸化の間をつなぐ分子機構や、SIP1 と細胞極性・細胞収縮関連分子をつなぐシグナル分子について、さらに解析を計画しているところである。既知の分子とのつながりが明らかになることによって、そのシグナルの阻害剤などを用いた創薬や疾患予防等に貢献できるものと考えている。

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)

Nishizaki, Y., Takagi, T., Matsui, F. and Higashi, Y.

SIP1 expression pattern in brain investigated by generating a SIP1-EGFP reporter knock-in mouse.

Genesis, 2014, 52(1), 56-57 査読有

DOI:10.1002/dvg.22726

[学会発表](計 3 件)

(1) 西崎 有利子、高木 豪、松井 ふみ子、東 雄二郎

レポーターノックインマウスを用いたモワ

ット・ウィルソン症候群の原因遺伝子 SIP1
の発現解析.

2013年12月3日から2013年12月6日
第36回日本分子生物学会、神戸

(2)高木 豪、西崎 有利子、松井 ふみ
子、東 雄二郎

モデルマウスを用いたモワット・ウィルソン
症候群の病態形成の解析.

2013年12月3日から2013年12月6日
第36回日本分子生物学会、神戸

(3)東 雄二郎, 高木 豪, 西崎 有利子,
松井 ふみ子, 中西 圭子, 時田 義人
δEF1/zeb1は下垂体後葉の形成に必須である
□(δEF1/zeb1 is Essential for Development
of the Posterior Lobe of Pituitary).

2012年12月11日から2012年12月14日
第35回日本分子生物学会年会、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔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.inst-hsc.jp/d-perinatology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西崎 有利子(Nishizaki, Yuriko)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究
所・周生期学部・リサーチレジデント

研究者番号: 90378901

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: