

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590195  
 研究課題名 (和文) 頸動脈小体の形成・分化の分子機構解析とパーキンソン病治療への応用  
 研究課題名 (英文) Transcriptional regulation of the carotid body development and treatment for Parkinson's disease  
 研究代表者  
 亀田 芙子 (KAMEDA YOKO)  
 北里大学・医学部・教授  
 研究者番号：10032898

## 研究成果の概要：

頸動脈小体は主細胞と支持細胞から成っており、哺乳動物では舌咽神経・頸動脈洞枝 (知覚性) と交感神経の枝を豊富に受けている。頸動脈小体原基は野生型マウスで胎生 13.5 日令 (E 13.5) に第 3 鰓弓動脈壁に生じるが、Hoxa3<sup>-/-</sup> マウスでは第 3 鰓弓動脈が E 11.5 で退化するため、原基は形成されない。Mash1<sup>-/-</sup> マウスで頸動脈小体原基は正常に形成され、また舌咽神経・頸動脈洞枝も豊富に分布しているが、交感神経節が欠損するため交感神経上頸神経節由来の主細胞前駆細胞が形成されず、頸動脈小体は支持細胞のみから成っている。FRS2 $\alpha^{2F/2F}$  マウスでは、舌咽神経が第 3 鰓弓動脈壁に分布できず、頸動脈小体原基は形成されなかった。すなわち頸動脈小体原基形成には第 3 鰓弓動脈、交感神経上頸神経節および舌咽神経・頸動脈洞枝の三要素が必須であることを明示した。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 600,000   | 2,600,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

## 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：頸動脈小体、FRS2 $\alpha^{2F/2F}$  マウス、Hes1<sup>-/-</sup> マウス、Mash1<sup>-/-</sup> マウス、Hoxa3<sup>-/-</sup> マウス、交感神経上頸神経節、舌咽神経・頸動脈洞枝、第 3 鰓弓動脈

## 1. 研究開始当初の背景

頸動脈小体は血中の酸素と炭酸ガスの分圧および pH 濃度を受容する化学受容器であり、呼吸調節に関与する重要な器官である。頸動脈小体は主細胞と支持細胞から成っており、舌咽神経・頸動脈洞枝 (知覚性) が分布し、

また交感神経上頸神経節と接してその枝を豊富に受ける。頸動脈小体は最も高濃度にドーパミンを含有する器官であり、またドーパミン・ニューロンの保護と再生に強く作用する Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) を高濃度に分泌している。最

近、ドーパミンや GDNF を高濃度に産生する頸動脈小体の脳内移植がパーキンソン病治療のために有望であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

パーキンソン病は中脳黒質より線条体に投射するドーパミン作動性ニューロンの退化により錐体外路系運動障害が出現するヒトで高頻度に起こる病気である。頸動脈小体主細胞がドーパミンおよび GDNF を大量に産生できるように遺伝子改変できれば、またその主細胞を培養で多数採取できるようになれば、パーキンソン病の治療として極めて有望になる。そのためには主細胞の形成・分化に関わる遺伝子の探索が必須であるが、頸動脈小体発生の分子機構については、殆ど分かっていない。我々は各種の遺伝子改変マウスを用いて頸動脈小体の形成・分化の研究を続けてきた。野生型マウスでは頸動脈小体原基は E13.0 で第 3 鰓弓動脈壁に形成される。この時頸動脈小体原基は交感神経上頸神経節からの神経突起で取り囲まれており、E13.5 でこの神経突起から tyrosine hydroxylase (TH)-, TuJ1-および PGP9.5-陽性の神経様細胞が原基内に侵入し、主細胞へと分化することを明示した。Hoxa3 は脊椎動物の頭尾軸に沿った組織の領域特異性を決定するマスター遺伝子である Hox 遺伝子群に属し、第 3 鰓弓に侵入する神経堤細胞と第 3 咽頭嚢に特異的に発現する。Hoxa3<sup>-/-</sup>マウスでは第 3 鰓弓と第 3 咽頭嚢の分化が阻害され、これらから生じる総頸動脈、胸腺、および上皮小体は欠損する。また Hoxa3<sup>-/-</sup>マウスでは第 3 鰓弓動脈が E 11.5 で退化するため、頸動脈小体は形成されない (Kameda et al., 2002)。Mash1 はショウジョウバエの神経分化に関与する bHLH 型転写調節因子 asc の哺乳類相同遺伝子であり、自律神経の分化に関与している。Mash1<sup>-/-</sup>マウスで頸動脈小体原基は正常に形成され、また舌咽神経・頸動脈洞枝も豊富に分布しているが、交感神経節が E13 で退化するため、交感神経上頸神経節由来の主細胞前駆細胞は形成されず、頸動脈小体は支持細胞のみから成っている (Kameda et al., 2005)。FRS2 $\alpha$ は FGF リセプターの細胞内ドメインと結合しているドッキング蛋白で、アダプター蛋白 Shp2 と Grb2 に結合し FGF シグナルの細胞内伝達に関与している。今回の研究は FGF シグナル伝達系が頸動脈小体の形成・分化に及ぼす影響を解明することを目的とした。FRS2 $\alpha$ を欠損したマウスでは胎生早期の致死となるため、FRS2 $\alpha$ の Shp2 結合部位の

みを破壊した FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>マウスにおける頸動脈小体の形成・分化を解析した。Notch-Hes シグナルは細胞分化を抑制して幹細胞の維持に関わり、また一種類の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する。Hes1 は神経分化に必要な転写調節因子 Mash1 や Neurogenin2 の発現を抑制することが知られている。Mash1 が頸動脈小体主細胞の形成に必須の遺伝子であることが分かったので、Mash1 の発現を抑制する Hes1 遺伝子が頸動脈小体の発生にどのように関与しているのか明らかにするため、Hes1<sup>-/-</sup>マウスにおいて頸動脈小体の形成・分化を解析する。上記のような各種遺伝子改変マウスの解析より、頸動脈小体の形成・分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 各胎令の FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>マウス胎児を採取し、頸動脈小体の形成・分化を野生型と比較して調べた。

(2) 各胎令の Hes1<sup>-/-</sup>マウス胎児を採取し、頸動脈小体の形成・分化を野生型と比較して調べた。

(3) 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において頸動脈小体の発生を調べた。

上記遺伝子改変マウスの頸動脈小体を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、および Wnt1-Cre/R26R マウスでは  $\beta$ -galactosidase の発現を調べるための組織化学を行って観察した。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 頸動脈小体および交感神経上頸神経節の体積、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) FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>マウスの解析

FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>マウスで頸動脈小体の発生を調べると、第 3 鰓弓動脈および交感神経上頸神経節は形成されたが、頸動脈小体原基は全く形成されなかった。野生型マウスでは頸動脈小体原基が形成される以前の E12.5 で舌咽神経

の枝が第3鰓弓動脈周囲に分布するが、FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup> マウスでは舌咽神経の分布は認められなかった。また E13.5 で第3鰓弓動脈を取り囲む交感神経上頸神経節からの神経突起も形成されなかった。E18.5 で FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup> マウスの交感神経上頸神経節は低形成で頭側移動ができず頸部下端に止まったままであり、また舌咽神経頸動脈洞枝も頸動脈分岐部に到達できなかった。このように第3鰓弓動脈壁における頸動脈小体原基の形成には舌咽神経（知覚性）の刺激が必須であることを明らかにした。また神経軸索の標的器官への分布には FGF シグナル伝達系が関与することを明示した。

頸動脈小体原基は第3鰓弓動脈壁に形成されるが、Hoxa3 が第3鰓弓動脈の形成・発達に必要な遺伝子である。交感神経上頸神経節から主細胞前駆細胞が頸動脈小体原基内に侵入し主細胞に分化するが、Mash1 が主細胞の分化に必要な遺伝子である。今回の FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup> マウスの解析により、頸動脈小体原基が形成される以前に舌咽神経が第3鰓弓動脈に分布し、原基形成のために必要な環境を整えていることを見出した。すなわち FGF シグナル伝達系が舌咽神経の第3鰓弓動脈壁分布を誘発する。このように**頸動脈小体の形成・分化のためには3つの要因（第3鰓弓動脈、交感神経上頸神経節および舌咽神経・頸動脈洞枝）が必須であること証明した。**

#### (2) Hes1<sup>-/-</sup>マウスの解析

Hes1<sup>-/-</sup>マウスにおいて頸動脈小体原基は形成されたが、低形成であった。Hes1 の欠損は神経幹細胞の早期のニューロン分化を促進するため、神経組織は増殖できず委縮する。Hes1<sup>-/-</sup>マウスの交感神経上頸神経節は野生型に比べて著しく小さく、低形成であった。胎生後期であっても、E12.5 の交感神経幹原基のような細長い形状を維持し、肥厚することはなかった。またアポトーシスの著しい増加を示し、細胞死を起こし退化すると考えられた。Hes1<sup>-/-</sup>マウスでは交感神経上頸神経節が著しい低形成となり、主細胞前駆細胞を頸動脈小体原基に十分供給できず、頸動脈小体は発達できなかったと考えられる。このように**交感神経節前駆細胞→頸動脈小体主細胞の分化・発達には Hes1-Mash1 シグナルが重要な役割を演じていることを明らかにした。**

#### (3) Wnt1-Cre/R26R ダブル・トランスジェニックマウスの解析

Wnt1-Cre/R26R マウスでは  $\beta$ -galactosidase

を発現する細胞として神経堤細胞を特異的にラベルできる。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  $\beta$ -galactosidase 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  $\beta$ -galactosidase の強い反応を示した。交感神経上頸神経節由来の神経様細胞が頸動脈小体原基に侵入して主細胞に分化する。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。また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。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明示した。主細胞および支持細胞は共に神経堤由来細胞ではあるが、その形成・分化は異なる遺伝子によって支配されており、**支持細胞の形成には Hoxa3 遺伝子が必須であることが分かった。**

#### (4) Hes1<sup>-/-</sup>マウスにおける頭頸部の形成・分化の解析

Hes1<sup>-/-</sup>マウスで、頭頸部に分布する間葉性神経堤細胞の分化に異常が生じていることを見出した。すなわち神経堤細胞により形成される髄膜および頭蓋冠が欠損し、前頭蓋底の骨形成が起こらず、また口蓋形成に異常が生じた。また Hes1<sup>-/-</sup>マウスにおいては頸動脈小体を始め、咽頭由来器官—甲状腺、鰓後体、上皮小体および胸腺—は著しい低形成か、または欠損した。これら咽頭由来器官の発達は各鰓弓に分布する間葉性神経堤細胞との相互作用によってなされることが知られている。現在 Hes1<sup>+/-</sup>と Wnt1-Cre/R26R マウスを交配し、Hes1<sup>-/-</sup>マウスの神経堤細胞がどのように障害を受け、頭頸部の表現形に奇形が現れるのかを調べている。頭頸部における間葉性神経堤細胞の分化異常が頭蓋冠形成異常、無脳症、口蓋形成異常、顔面頸部形成異常、また DiGeorge 症候群など、ヒトでよく見られる症状を誘発する可能性が極めて高い。Hes1<sup>-/-</sup>マウスにおける頭頸部間葉性神経堤細胞の解析は上記のような臨床症状の原因解明と治療の方向性を示し得ると確信している。

## 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 6 件）

- (1) Kameda, Y.: Hoxa3 and signaling molecules involved in aortic arch patterning and remodeling. *Cell Tissue Res.*, 336 (2): 165-178, 2009. (査読あり)
- (2) Kameda, Y., M. Ito, T. Nishimaki, and N. Gotoh: *FRS2 $\alpha$*  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. (査読あり)
- (3) Kameda, Y., M. Ito, T. Nishimaki, and N. Gotoh: *FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>* mice lack carotid body and exhibit abnormalities of the superior cervical sympathetic ganglion and carotid sinus nerve. *Dev. Biol.*, 314(1): 236-247, 2008. (査読あり)
- (4) Kameda, Y., T. Nishimaki, M. Miura, S. Jiang and F. Guillemot : *Mash1* regulates the development of C cells in mouse thyroid glands. *Dev. Dyn.*, 236(1): 262-270, 2007. (査読あり)
- (5) Kameda, Y., T. Nishimaki, O. Chisaka, S. Iseki and H.M. Sucov: Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. *J. Histochem. Cytochem.*, 55(10): 1075-1088, 2007. (査読あり)
- (6) Kameda, Y.: Expression of glial progenitor markers p75<sup>NTR</sup> and S100 protein in the developing mouse parathyroid gland. *Cell Tissue Res.*, 327(1):15-23, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)  
シンポジウム

- (1) Kameda, Y., Ito, M., Gotoh, N.: Sympathetic ganglion origin of the carotid body glomus cells revealed by *Mash1* and *FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>* null mutant mice. 5<sup>th</sup> Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience. 2007 10/15, Kyoto (Autonomic Neurosci., 135:33, 2007.)

一般口演

- (2) 亀田 英子, 西槇俊之、伊藤正孝、後藤典子: *FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>* マウスにおける甲状腺、鰓後体、上皮小体および胸腺の形成・分化の解析。第114回日本解剖学会全国学

術集会、2009年3月30日、岡山。(解剖学雑誌, 84:131, 2009.)

- (3) 秋本峰克、西槇俊之、武田啓、内沼栄樹、亀田 英子: マウス頭蓋冠、頭蓋底および口蓋形成に關与するHes1遺伝子。第114回日本解剖学会全国学術集会、2009年3月30日、岡山。(解剖学雑誌, 84:133, 2009.)
- (4) 三浦正明、亀田 英子: *Mash1*ノックアウトマウスを用いたDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析。第114回日本解剖学会全国学術集会、2009年3月30日、岡山。(解剖学雑誌, 84:229, 2009.)
- (5) 秋本峰克、山崎安晴、瀬崎晃一郎、曾根由美子、内沼栄樹、西槇俊之、亀田 英子: マウス頭蓋顎顔面の形成・分化におけるHes1 遺伝子の役割。第17回日本形成外科学会基礎学術集会、2008年10月2日、東京。(日本形成外科学会基礎学術集会プログラム・抄録集、17:116, 2008.)
- (6) 亀田 英子、伊藤正孝、西槇俊之、後藤典子: *FRS2 $\alpha$ <sup>2F/2F</sup>* マウスにおける頸動脈小体の欠損と交感神経上頸神経節および舌咽神経頸動脈洞枝の異常。第113回日本解剖学会全国学術集会、2008年3月28日、大分。(解剖学雑誌, 83:164, 2008.)
- (7) 秋本峰克、西槇俊之、内沼栄樹、亀田 英子: マウス下垂体隆起部の形成・分化におけるHes1遺伝子の役割。第113回日本解剖学会全国学術集会、2008年3月28日、大分。(解剖学雑誌, 83:163, 2008.)
- (8) 新井雄太、亀田 英子: Neurogenin 3 ノックアウトマウスの視床下部弓状核における Agouti-related Protein の発現。第113回日本解剖学会全国学術集会、2008年3月29日、大分。(解剖学雑誌, 83:233, 2008.)
- (9) 三浦正明、亀田 英子: レンチウイルスを用いたニワトリ鰓後体細胞分化に關与する遺伝子の細胞内遺伝子導入の試み。第113回日本解剖学会全国学術集会、2008年3月29日、大分。(解剖学雑誌, 83:233, 2008.)

[図書] (計 1 件)

- (1) 亀田 英子: 甲状腺、鰓後体、頸動脈小体。獣医組織学(日本獣医解剖学会編), 学窓社, 東京, 2008, 308-312 頁。

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
亀田 英子 (KAMEDA YOKO)  
北里大学・医学部・教授

研究者番号：10032898

(2)研究分担者

三浦 正明 (MIURA MASAACKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60276053

新井 雄太 (ARAI YUTA)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60329026

(3)連携研究者

秋本 峰克 (AKIMOTO MINEKATU)

北里大学大学院・医療系研究科・

大学院生

西槇 俊之 (NISHIMAKI TOSHIYUKI)

北里大学・医学部・技術員