

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591297

研究課題名 (和文) 神経管閉鎖障害における性差の分子メカニズム

研究課題名 (英文) **Molecular mechanism of gender dependent difference in the neural tube defect manifestation.**

研究代表者

成瀬一郎 (NARUSE ICHIRO)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：20113326

研究成果の概要 (和文)：

ヒト神経管閉鎖障害(NTDs)は女兒に多い。我々の系統維持している *Pdn* マウス (責任遺伝子は *Gli3*) のホモ型では、約 16% の確率で NTDs が発症し、雌のみである。ここに、カビ毒であるオクラトキシン A を曝露すると、雄に偏って NTDs が発症した。このことから、胎生 7.5 日にオクラトキシン A を曝露し、9 日に胚仔を摘出し、その遺伝子発現の変化を調べた。オクラトキシン A 曝露によって、*Daam*, *Hoxb1*, *Tbx*, *Hmx3*, *Dlx1*, *Tlxh* 遺伝子の発現が大幅に増加し、*Fgf8*, *Emx2* では異所性の発現を示した。これらの遺伝子発現の変動と *Gli3* 発現抑制の総合作用によって、オクラトキシン A による NTDs が雄に発症したものと考えた。

研究成果の概要 (英文)：

Prevalence of neural tube defects (NTDs) is larger in female in human. *Pdn/Pdn* mouse, whose responsible gene is *Gli3*, has a 16% risk of NTDs, and confines in female. When Ochratoxin A (OTA) was exposed to *Pdn/Pdn* mouse embryo, only male *Pdn/Pdn* manifested increased incidence of NTDs. After exposure to OTA on day 7.5 of gestation, *Daam*, *Hoxb1*, *Tbx*, *Hmx3*, *Dlx1*, *Tlxh* gene expressions were severely up-regulated in the +/+ and *Pdn/Pdn* embryos on day 9 of gestation. Ectopic expressions of *Fgf8* and *Emx2* were observed in the OTA-treated *Pdn/Pdn* embryos. From these investigations, it was speculated that NTDs manifestation is induced by the altered multiple gene expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
2009 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2010 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：先天異常

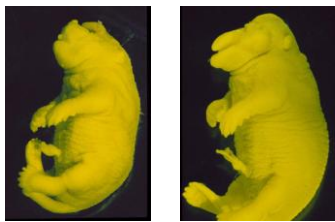
## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの神経管閉鎖障害(Neural Tube Defects; NTDs)には、二分脊椎、脊髄髄膜瘤、無脳症

などの重篤な先天異常が含まれる。1974～1998 年の発症推定数の年次推移をみると、日本での NTDs の発症率は低下してきているも

の、欧米に比較すれば高くなっている。NTDs は染色体異常、突然変異、環境因子などの多くの発症要因が複雑に関与して発症していると考えられている。また、ヒト神経管閉鎖障害 (NTDs) は女兒に多いことも知られている。

我々が系統維持している *Pdn* マウスのホモ型では、約 16% の確率で NTDs が発症し、雌のみである。また、環境要因に対して感受性が高く、OTA を曝露すると神経管閉鎖障害を高率 (51.6%) に発症したので、*Gli3* 発現抑制と OTA の毒性の相乗効果が、感受性の差として現れていると考えてきた。その後の実験により、OTA 処理による神経管閉鎖障害は雄に偏っており、雄 *Pdn/Pdn* の 70% が発症していることが判明してきた。



*Pdn/Pdn* マウスに OTA を曝露して発症した胎生 18 日の外脳症 (左) と無頭症 (右)

このことから、*Gli3* 遺伝子発現抑制とオクラトキシン A の毒性が性に関連する遺伝子発現の変動を起こし、その相乗効果で、雄 *Pdn/Pdn* に NTDs を惹起していると想定した。この仮定に基づいて、*Gli3* 関連遺伝子、性に関連する遺伝子、オクラトキシン A の影響を受ける遺伝子などの発現変動を DNA マイクロアレイ、real time PCR、whole mount in situ hybridization (WISH) で調べることにした。

## 2. 研究の目的

我々が系統維持している遺伝性多指症/無嗅脳症マウス (*Pdn*) のホモ型 (*Pdn/Pdn*) は、多彩な脳発生異常を現わし、その約 16% は

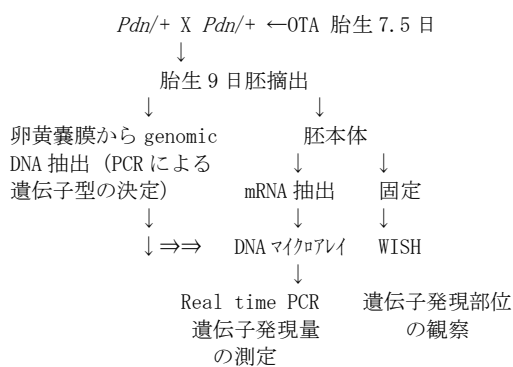
NTDs である外脳症を発症する。*Pdn* マウスの責任遺伝子は *Gli3* で、他の遺伝子発現を調節する転写調節因子であり、*Pdn/Pdn* では極端な発現抑制が認められる。この *Gli3* 発現抑制が、NTDs 発症の分子機構に重要な役割を果たしていると推察できる。そこで神経管閉鎖異常の遺伝素因を持つ *Pdn* マウスを用いて、NTDs の発症メカニズムを分子遺伝学的に調べることにした。

これまでの研究で、カビ毒の一種であるオクラトキシン A (OTA) を *Pdn* マウス母体に投与すると NTDs が 45% まで増加した。特に、*Pdn/Pdn* 雄マウス胚仔に偏って NTDs が発症した。OTA の毒性が性関連遺伝子発現に影響を及ぼし、これと *Gli3* 発現抑制との相乗効果によって多くの遺伝子群の発現に大きな発現変動が起き、最終的に NTDs が起きたと予測した。*Pdn/Pdn* 雌マウス胚仔では、*Gli3* 発現抑制はあるものの、OTA 曝露による性関連遺伝子発現に影響を受けないために、相乗効果が現れず、NTDs が増加しないと推察した。また、+/+雄では、OTA の影響を受ける性関連遺伝子発現の変動はあるものの、*Gli3* 発現が正常であるために、相乗効果が現れないと考えた。このような仮説のもとで、OTA が影響を及ぼす性関連遺伝子を特定し、神経管閉鎖障害における感受性の差と性差の問題を明らかにしたいと考えてきた。このような研究によって、ヒトの NTDs が女子に多いと言う謎を解明する手掛かりを得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

*Gli3* は zinc finger を持つ調節遺伝子であることから、*Pdn/Pdn* 胚仔では、*Gli3* の発現抑制が多数の遺伝子発現に影響を及ぼしている。*Gli3* 発現抑制の影響によって、*Fgf8* や *Emx2* 遺伝子発現が変動することが明らかになってきた。

この結果をもとに、OTA を投与された *Pdn/Pdn* マウスの胚仔において、大幅な発現変動がある性に関連する遺伝子をスクリーニングするために、以下のように実験計画を建てた。*Pdn*/+どうしを交配し、胎生 7.5 日に OTA を投与し、その 2 日後の胎生 9 日胚を摘出し、その卵黄囊膜から genomic DNA を抽出し、遺伝子型および性別を PCR で決定する。その後、胚仔本体から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイによって、無処理の雄 *Pdn/Pdn* と OTA 曝露されて神経管が閉じていない雄 *Pdn/Pdn* の間で遺伝子発現量を網羅的に比較する。顕著に発現が変動している遺伝子の中から、性に関連する遺伝子を選択し、リアルタイム PCR 法により、これらの遺伝子発現量の増減を確認する。発現量が大幅に変動している遺伝子発現と *Gli3* 発現抑制の相乗効果によって、最終的責任遺伝子群が大幅に変動し、神経管閉鎖障害を発症するものと考えている。この未特定の性関連遺伝子と変動した遺伝子群について、whole mount in situ hybridization (WISH) 法を用いて、異所性発現箇所を特定する。



#### 4. 研究成果

遺伝性多指症 / 無嗅脳症 マウス (*Pdn/Pdn*) の胎生 7.5 日にカビ毒であるオクラトキシン A を曝露し、胎生 18 日に胎仔を外形観察すると、雄 *Pdn/Pdn* に

NTDs を多発していた。このことから、オクラトキシン A は性に関連する遺伝子発現に影響を与え、この発現変動と *Gli3* 発現抑制の相乗効果で NTDs が発症したと考えた。

	Non-treated control		2 mg/kg of OTA on day 7.5	
	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)
+/+	0/20 (0)	0/11 (0)	3/15 (20.0)	0/20 (0)
<i>Pdn</i> /+	0/21 (0)	0/31 (0)	5/23 (21.7)	0/29 (0)
<i>Pdn/Pdn</i>	0/14 (0)	6/24 (25.0)	10/14 (71.4)	6/17 (35.3)

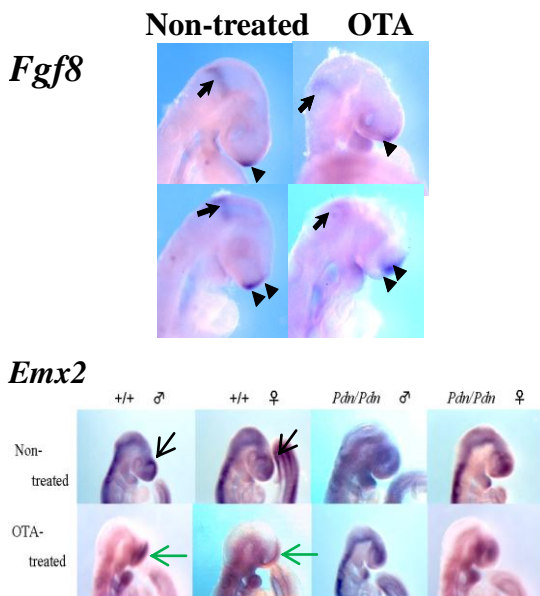
胚本体から抽出した mRNA を用いて、DNA マイクロアレイによって、*Gli3* の影響下にある遺伝子群を探索し、その中から、*Gli3* 以外に、*Wnt7b* と *Dmrt3* 遺伝子発現を real time PCR 法で発現量を調べた。*Gli3* では、*Pdn/Pdn* で発現抑制が認められ、オクラトキシン A 曝露によっても発現抑制が認められたが、+/+ でも *Pdn/Pdn* でも雌雄差は認められなかった。*Wnt7b* は、*Pdn/Pdn* で発現抑制が認められ、オクラトキシン A 曝露によっても発現抑制が認められ、+/+ では雌雄差も認められたが、*Pdn/Pdn* では雌雄差が認められなかった。*Dmrt3* では、*Pdn/Pdn* で発現抑制が認められ、オクラトキシン A 曝露でも発現抑制が認められたが、雌雄差は+/+ でも *Pdn/Pdn* でも認められなかった。

次に、DNA マイクロアレイによって決定してきた *Gli3* の影響下にある遺伝子として、*Fgf8*, *Wnt7b*, *Wnt8b*, *Fez1*, *Barx1* や性関連遺伝子として *Wt1*, *Emx2*, *Ad4BP*, *Lhx9*, *Lim1*, *Sry*, *Igf1*, *Gata4*, *Fog2*, *Dax1*, *Wnt4*, *Sox9*, *Dmrt1*, *Dmrt3* の発現を調べた。その結果、オクラトキシン A を曝露された

*Pdn/Pdn* で、*Barx1* と *Sox9* 遺伝子発現が、性に関連した発現を示した。

ついで、Real-time PCR法で遺伝子発現量に差が認められた以下の遺伝子の発現部位をWISH(whole mount in situ hybridization)法で調べた。*Gli3*の影響下にある遺伝子として、*Fgf8*, *Wnt7b*, *Wnt8b*, *Fez1*, *Barx1*, 性に関連する遺伝子として、*Wt1*, *Emx2*, *Ad4BP*, *Lhx9*, *Lim1*, *Igf1*, *Fog2*, *Wnt4*, *Sox9*, *Dmrt1*, *Dmrt3*の遺伝子発現部位を調べた。

その結果、オクラトキシンAを曝露された*Pdn/Pdn*で、*Barx1*と*Sox9*遺伝子が性差を持った発現量の変化を示し、*Fgf8*と*Emx2*は異所性発現を示した。これらの遺伝子発現量の変化や異所性発現の総合作用によって、オクラトキシンAによるNTDsが雄に発症したものと考えた。

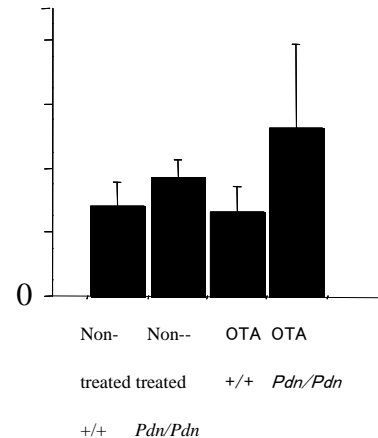


*Fgf8*の発現は、anterior neural ridge (ANR) (矢頭)、dorsal isthmal neuroepithelium (矢印) に認められた。ANRでの発現は、+/+に比べ*Pdn/Pdn*で発現領域が広がっていた。OTA曝露された*Pdn/Pdn*ではさらに広がっていた。

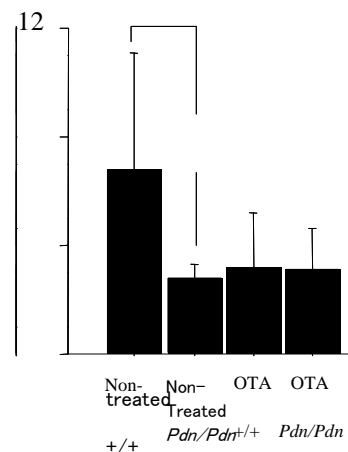
*Emx2*の発現は、+/+では dorsal

telencephalon (黒矢印) に発現したが、OTA曝露された+/+では雌雄とも ventral telencephalon (緑矢印) に発現した。無処理、OTA処理群とも、*Pdn/Pdn*では雌雄とも発現が弱かった。

**Fgf8**



**Emx2**



Real time PCRの結果。*Fgf8*は、無処理、OTA処理に関わらず、*Pdn/Pdn*で発現量に差は認められなかった。*Emx2*は、無処理群の*Pdn/Pdn*で発現抑制が認められ、OTA処理群では、+/+、*Pdn/Pdn*とも発現量の抑制が認められた。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kimura S, Yamada S and Naruse I. Normal

location of thumb/big toe may be related to programmed cell death (PCD) in the preaxial area of embryonic limb. The Anatomical Record, 293: (in press), 2011.

- ② Naruse I, Ueta E, Sumino Y, Ogawa M. Syndromes caused by the mutations in *GLI3* gene. Current Pediatric Reviews, 6 (4): 219-225, 2010.
- ③ Naruse I, Ueta E, Sumino Y, Ogawa M and Ishikiriya S. Birth defects caused by the mutations in human *GLI3* and mouse *Gli3* genes. Congenit. Anom., 50(1): 1-7, 2010.
- ④ Ueta E, Kodama M, Sumino Y, Kurome M, Ohta K, Katagiri R and Naruse I. Gender-dependent differences in the incidence of ochratoxin A-induced neural tube defects in *Pdn/Pdn* mouse. Congenit Anom., 50 (1): 29-39, 2010.
- ⑤ Ueta E, Kurome M, Teshima Y, Kodama M, Otsuka Y and Naruse I. Altered signaling pathway in the dysmorphogenesis of telencephalon in the *Gli3* depressed mouse embryo, *Pdn/Pdn*. Congenit. Anom., 48(2): 74-80, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 角野良紀、上田悦子、小川将也、成瀬一郎 2010 遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおける Ochratoxin A による神経管閉鎖障害発症の性差。第 50 回日本先天異常学会学術集会 (淡路)。
- ② 上田悦子、角野良紀、小川将也、成瀬一

郎 2010 オクラトキシシン A 曝露による神経管閉鎖障害と性関連遺伝子の変動。第 50 回日本先天異常学会学術集会 (淡路)。

- ③ 上田悦子、兒玉真実、角野良紀、成瀬一郎 2009 オクラトキシシン A による神経管閉鎖障害—*Gli3* 発現抑制と性差との関連—。第 49 回日本先天異常学会学術集会 (鹿児島)。
- ④ 上田悦子、兒玉真実、黒目万帆、手嶋優子、大塚譲、成瀬一郎 2008 遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおいて *Gli3* 発現抑制を受ける遺伝子群の探索。第 48 回日本先天異常学会学術集会 (東京)。
- ⑤ 兒玉真実、上田悦子、成瀬一郎 2008 遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおける Ochratoxin A による神経管閉鎖障害発症の性差 -第 2 報- 第 48 回日本先天異常学会学術集会 (東京)。

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/bioreg/327/648.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成瀬 一郎 (NARUSE ICHIRO)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：20113326

### (2) 研究分担者

上田 悦子 (UETA ETSUKO)  
鳥取大学・医学部・講師  
研究者番号：40335526