

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 野生型および顔面裂モデルラット初期胚発生における
HNK-1 糖鎖の局在と機能に関する研究
-頭部神経堤細胞を中心として-

指導教官 波利井 清紀 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 10 年 4 月入学

医学博士課程
外科学専攻

氏名 長瀬 敬

(1) 序論

脊椎動物の初期発生において、神経堤細胞(neural crest cells; NCCs)は神経堤より生じて胚内を広く遊走し、極めて多様な組織に分化する細胞集団である。NCCs は背側外胚葉が中胚葉に誘導されて神経上皮を形成するのに引き続き、神経上皮と表皮外胚葉の境界に誘導される。NCCs は腹内側・腹外側・背外側の 3 種類の経路をへて遊走後、末梢神経とその支持細胞、副腎髄質、色素細胞や、さらに頭部顔面骨格などに分化する。特に頭部 NCCs は骨・軟骨などの骨格系細胞への分化能を持つ点で、体幹部 NCCs に比し際立った特異性がある。つまり体幹部の骨格は発生上は中胚葉由来であるのに対し、頭部顔面部の骨格の大半は外胚葉由来の NCCs が分化したものである。このことは、唇顎口蓋裂や顔面裂などの、形成外科の重要な治療対象となる頭部顔面部の骨格系の先天奇形の発症が、頭部 NCCs の異常と密接に関係することを意味する。従って頭部 NCCs の遊走や分化のメカニズム、あるいは体幹部 NCCs と比較した頭部 NCCs の特異性を規定するメカニズムを分子レベルで研究することは、上記疾患群の発症機構解明への有効なアプローチとなるものと考えら

れる。

以上の背景に基づき、本研究は頭部 NCCs の遊走や特異性を制御する分子の一つと考えられる HNK-1 糖鎖とその合成酵素遺伝子に特に着眼し、正常および顔面裂モデルラット胚におけるこれらの発現と機能について検討することを通じて、顔面形態形成およびその異常の分子メカニズムの理解の手がかりをうることを目的とする。

(2)研究1. 正常ラット胚における HNK-1 糖鎖とその合成酵素遺伝子 GlcAT-P, GlcAT-D の発現と機能

HNK-1 糖鎖は接着分子や細胞外マトリックス分子上に存在し、細胞運動などの細胞間相互作用に関与する。トリ胚では HNK-1 糖鎖は NCCs の表面に存在し、そのため NCCs の特異的マーカーとして頻用される。NCCs 上の HNK-1 糖鎖はその正常な遊走に必須とされる一方、脊索周囲など NCCs 外に局在する場合は逆に NCCs 遊走を阻害しうることもトリ胚で報告されている。しかし哺乳類胚での HNK-1 糖鎖の局在に関する詳細な報告は少ない。最近ラットで HNK-1 糖鎖の合成に係わるグルクロン酸転移酵素 (glucuronyltransferase; GlcAT) の遺伝子サブタイプ GlcAT-P および GlcAT-D がクローニングされた。両者は *in vitro* では基質特異性が異なるが、*in vivo* における機能的差異に関しては不明である。そこで本研究では正常ラット胚における HNK-1 糖鎖の局在と GlcAT サブタイプ遺伝子発現の分布パターンを調べ、さらに HNK-1 糖鎖と GlcAT 遺伝子の機能解析を試みた。

まず NCCs の遊走時期に相当する胎齢 11.5 日 (E11.5) 胚で HNK-1 の免疫染色、GlcAT-P および GlcAT-D の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、頭部 NCCs では遊走を終えた脳神経節 NCCs に HNK-1 糖鎖は局在し、GlcAT-D 遺伝子の発現を認めた。これに対し体幹 NCCs では、遊走開始直後の NCCs に HNK-1 糖鎖は局在し、GlcAT-P 遺伝子の発現を認めた。これらの発現パターンの相違は頭部・体幹 NCCs の特異性と関連する可能性が示唆された。

さらに、GlcAT-P が遊走の継続に、GlcAT-D が遊走の終止にそれぞれ関与する可能性が考えられた。この仮説を検証する目的で、ラット胚頭部 NCCs に GlcAT-P および GlcAT-D 遺伝子を電気穿孔法にて導入し、HNK-1 糖鎖の合成を人為的に促進させた状態で全胚培養系に移し、その後の第 2 咽頭弓領域の NCCs 遊走の変化を追跡した。この結果、GlcAT-P 導入により遊走距離が延びる一方、GlcAT-D 導入により NCCs が耳胞周囲の神経節近傍に集まる傾向が観察され、先の仮説を支持するものと考えられた。

なお上記の観察の過程で、NCCs 以外にも HNK-1 を発現する細胞群が見出された。まず E11.5 の肢芽付近に認められた HNK-1 陽性の細胞群は、全胚培養における NCCs の標識実験および Pax3 や Myf5 などの筋芽細胞マーカーの染色により筋芽細胞であることが判明した。体節内筋芽細胞では GlcAT-P が、肢芽内筋芽細胞では GlcAT-D が発現することも示された。体節内筋芽細胞はまさに遊走開始～遊走中であり、肢芽内筋芽細胞は遊走を終えつつある細胞群であることを考えると、この結果は上記の NCCs における遊走能の差による両 GlcAT 遺伝子の発現の相違と一致しており、照らし合わせて興味深い。さらに E13.5 の脳でも HNK-1 糖鎖は大脳皮質や基底核原基に広範に局在したが、ここでも GlcAT-P および GlcAT-D の発現分布間には明らかな相違が見られ、NCCs 以外の細胞・器官でも GlcAT-P と GlcAT-D が何らかの機能分担をすることを反映すると考えられた。

(3) 研究 2. 顔面裂モデルラットにおける NCCs 遊走異常と HNK-1 糖鎖の関与

Pax6 は眼、鼻、腭臓および中枢神経系の発生を制御する転写因子としてよく知られている。そのホモ変異ラット胚では上記器官の異常にくわえ、中脳から鼻部への NCCs の遊走が阻害される結果、ヒトの顔面裂に類似した奇形を呈する。NCCs 自身は Pax6 を発現しないこと、また野生型 NCCs を Pax6 変異ラット胚中脳部に移植すると遊走が阻害されることから、この遊走阻害は遊走経路における環境要因の変化と考えられてきたが、その分子の実体は不明であった。上述の通り NCCs 外における HNK-1 糖鎖は NCCs の遊走を阻害する作用があるため、本研究では HNK-1 糖鎖が Pax6 変異ラットでの NCCs 遊走異常の原因と考え、この仮説の検証のため以下の各実験を行った。

まず中脳から外側鼻隆起へ向かう NCCs のマーカーである Pax7 の免疫染色を野生型胚と変異胚で行った。E11.5 野生型胚では Pax7 陽性の NCCs はすでに鼻部に達し、E12.5 では外側鼻隆起に選択的に集まる。一方変異胚では E11.5 の時点で Pax7 陽性 NCCs の遊走は三叉神経節付近で阻害され、E12.5 では外側鼻隆起が全く形成されないことが示された。

次に E11.5 の変異ラット胚で HNK-1 免疫染色、GlcAT-P および GlcAT-D 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、野生型胚と比較した。その結果、野生型胚では眼胞や脳神経節で HNK-1 糖鎖の局在および GlcAT-D 遺伝子の発現が見られた。一方 Pax6 変異ラット胚では野生型と同様の発現に加え、鼻部上皮に異所的に HNK-1 糖鎖の局在および GlcAT-P 遺伝子の発現が認められた。つまり Pax6 は GlcAT-P 遺伝子の発現を抑制するため、変異ラットにおいて HNK-1 糖鎖の合成が異常に促進するものと考えられた。ま

たこの異所性の HNK-1 糖鎖の局在部位は上記の中脳由来 NCCs の遊走阻害部位と近接しており、HNK-1 糖鎖が変異胚での NCCs 遊走阻害に関与する可能性を支持するものと思われた。

この可能性を直接検討する目的で、NCCs 初代培養において *in vitro* で遊走能をアッセイする系を確立し、培養ディッシュを HNK-1 糖鎖でコートした場合としない場合で遊走に差が生じるかを調べた。その結果、野生型ラット中脳 NCCs は HNK-1 コーティングにより遊走が阻害される傾向を認めた。対照として前脳 NCCs でもアッセイを行ったが、HNK-1 糖鎖による影響はなかった。これらの結果を合わせると、Pax6 変異ラットで鼻部上皮で異所的に発現する HNK-1 糖鎖が中脳 NCCs の遊走を選択的に阻害し、外側鼻隆起の欠損ひいては顔面裂奇形をもたらすものと考えられた。

(4) まとめ

研究 1 の結果、ラット胚では HNK-1 糖鎖は NCCs および肢芽筋芽細胞などに局在すること、GlcAT-P および GlcAT-D の発現パターンは各々異なっており生体内の機能的差異を反映する可能性があることが明らかになった。とくに重要な点として、頭部と体幹の NCCs の間に HNK-1 糖鎖による遊走の影響の仕方、あるいは GlcAT-P および GlcAT-D の発現分布などの点で差異が認められたことがあげられる。このことは冒頭で述べたような頭部 NCCs の特異性を反映する分子的基盤の一つとして、HNK-1 糖鎖およびその合成酵素遺伝子が重要な意義を持ちうることを示唆する。

一方研究 2 においては Pax6 変異ラットの顔面裂の原因である中脳 NCCs の遊走阻害が、HNK-1 糖鎖の異所的局在によって生じることが示唆された。この顔面裂は外側鼻隆起の欠損による点、また Pax6 の変異はヒトではヘテロで無虹彩症を引き起こすなどの点で、このラットの顔面裂はヒトの顔面裂とは厳密には異なる。しかしながら Pax6 の下流で制御される NCCs の遊走に関する遺伝子群の中に顔面裂の原因遺伝子が含まれる可能性が示唆される。ヒトの唇裂や顔面裂の発症が多因子遺伝で環境との相互作用も影響しうる複雑な系であり、分子レベルでの解析が困難なことを考えた場合、遺伝的バックグラウンドが明瞭で解析の容易な Pax6 変異ラットをモデルとして研究することは、顔面裂発症の分子メカニズムを探るアプローチとして極めて有意義なものと思われる。