

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 高部 智 哲

致死的な先天異常の多くが心血管流出路形成不全に起因することが知られている。本研究は胎生期心血管流出路形成異常をきたす *hdf* マウスをモデルとしてその分子機構の解明を試みたものであり、以下の結果を得ている。

- 1). *hdf* マウスにおいて野生型/ヘテロ型-ホモ接合体のサブトラクション法を行い、約 2000 個のクローンを抽出した。さらにドットブロット、リアルタイム PCR の結果、ホモ接合体における 17 遺伝子の発現低下を確認した。これら遺伝子のすべてについてプローブを作成し、胎齢 (E)9.5 の検体でホールマウント in situ ハイブリダイゼーション (WISH)を行ったところ、5つの遺伝子について野生型における再現性をもった特異的な発現パターンとホモ接合体における発現低下が確認された。
- 2). 上記5つの遺伝子に神経堤細胞のマーカー遺伝子が含まれており、神経堤細胞について解析を行った。神経堤細胞のマーカーである *Crabp1* の発現は E8.5 の野生型で後脳間充織に局限しており、ホモ接合体でも同様であった。E9.25-9.5 の野生型では後脳間充織から鰓弓へ向かう線状の発現が確認されたが、ホモ接合体では後脳間充織に局限しており線状の発現はほとんど確認されなかった。他の神経堤細胞マーカーである *ErbB3*、*Cdh6* も同様にホモ接合体で線状の発現が低下しており、ホモ接合体において何らかの神経堤細胞の異常が生じていることが示された。
- 3). 上記の 17 遺伝子には細胞周期の調節もしくは細胞死に関連した遺伝子が含まれており、細胞死について解析を行った。E8.5 ではホモ接合体は野生型と著変なかったが、E9.25 以降のホモ接合体では神経管を含む頭部間充織において細胞死が増加していた。*hdf* マウスはトランスジェニックマウス作成中に偶然生まれたストレインで、細胞外マトリックスタンパク質 versican をコードする *Cspg2* 遺伝子の正常な発現が障害されている事がわかっている。ホモ接合体における細胞死領域は、本来野生型において *Cspg2* が発現しておりホモ接合体でその発現が確認されない領域とほぼ合致していた。また細胞死領域は *Crabp1* 発現領域を含んでいた。*Cspg2* の発現障害が細胞死の増加に関与している可能性が示された。また *hdf* マウスにおける *Cspg2* の発現障害もしくは細胞死が神経堤細胞の異常に関与している可能性が示された。

4). 心血管流出路形成に関与する事が知られている第二次心臓形成領域について解析を行った。E9.5のホモ接合体において *Isl1*、*Tbx1* の発現低下を認めたと、*Tbx1* を介して神経堤細胞に作用する事が知られる *Fgf8* の発現は低下していなかった。*hdf* マウスのホモ接合体は、*Tbx1*、*Fgf8* のノックアウトマウスよりも *Isl1* のノックアウトマウスに表現型が類似していることも併せて考えると、*Isl1* の異常がより *hdf* マウスの異常に関与している可能性があると考えられた。また E8.5における *Cspg2* の発現は、野生型において第二次心臓形成領域と合致して認められ、E8.5で第二次心臓形成領域に発現している正常な *Cspg2* の発現がその後の心血管流出路のリモデリングにおいて重要である可能性が示された。

以上、本論文は心血管流出路形成不全を呈する *hdf* マウスにおいて *Cspg2* の正常な発現が障害される事で、1). 頭部間充織における細胞死の増加、2). 神経堤細胞異常、3). 第二次心臓形成領域の異常が引き起こされる事を明らかにした。本研究は新たな展開をみせる心血管発生に関連する分子機構の一端を解明することで、先天性心疾患の発症機序を解明する糸口となりうると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。