

論文の内容の要旨

論文題目 The role of endothelin-1/endothelin type-A receptor signaling in craniofacial development

和訳 頭部顔面の形態形成におけるエンドセリン-1 / エンドセリンA受容体シグナルの役割

氏名 佐藤 崇裕

要旨

エンドセリン(endothelin; ET)システムは ET-1、ET-2、ET-3 の3つのアイソフォームからなるリガンドと、7回膜貫通型の G タンパク質共役受容体に分類される2つの受容体、即ちエンドセリン A 受容体 (ETAR) およびエンドセリン B 受容体(ETBR)によって構成されている。中でも ET-1 は血管内皮細胞で産生され、強力な血管収縮因子として働くことが広く知られており、心不全や高血圧をはじめとする種々の心血管病や腫瘍など、多くの疾患の病態生理に関与すると考えられている。最近では特に、受容体拮抗薬の肺高血圧症に対する治療効果が注目され、世界各国で広く臨床に用いられている。

一方、胚発生においては、ET-1 と ET-3 はそれぞれ ETAR と ETBR を介して、前者は頭部・心臓神経堤細胞の、後者は体幹部神経堤細胞の発生分化および形態形成に重要な役割

を演じている。ET-3/ETBR シグナル欠損による腸管神経叢の形成不全は、ヒトにおいて Hirschsprung 病の原因となることが知られている。頭部神経堤細胞による顎顔面の形態形成においては、ET-1/ETAR シグナルは下顎の形成に重要な役割を果たしており、そのシグナル下流では脊椎動物でのショウジョウバエ *Distal-less* ホモログとして知られる *Dlx5/6* ホメオボックス遺伝子の転写誘導と、*Hand2*をはじめとする下流遺伝子の転写活性化によって鰓弓における背腹軸を制御すると考えられている。この時期、上顎および下顎の原基となる第1鰓弓内では主に頭部神経堤細胞から派生する外胚葉性間葉組織と鰓弓上皮との間で生じる上皮間葉相互作用によって、その腹側および背側領域がそれぞれ下顎弓と上顎弓へと分化し、後の顎を形成する骨格が形成されていくと考えられている。これまでの研究から、ET-1/ETAR シグナルは第1鰓弓の腹側に作用し、*Dlx5/6* の誘導によって下顎弓の領域特異性決定に寄与していると考えられているが、その分子メカニズムや領域決定に関わるシグナル間相互作用の中での位置づけについては、多くの点が明らかにされていない。本研究において、私は、頭蓋顔面の形成における ET-1/ETAR シグナルに関わる分子メカニズムを更に明らかにするために、ETAR 遺伝子座に効率よく遺伝子をノックインし、遺伝子機能の系統的な解析を可能にする系として Cre-変異 loxP システムによる遺伝子交換 (RMCE) の系を確立した。

まず始めに、私は変異 loxP 配列で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を ETAR 遺伝子座の翻訳開始コドンを含む領域と置換することにより ETAR 欠損マウスを作製した。その表現型として ET-1 欠損マウスと同様で既知のものであるホメオティック変異による下顎の上顎化を期待通り再現することが出来た。次に、ETAR 発現細胞において RMCE による遺伝子交換が機能することを確認するとともに、これらの細胞を可視化するために、最初の ETAR 遺伝子座のターゲティングによって得られた ES クローンを用いて RMCE による第2段階の相同組み換えを行い、得られた LacZ 遺伝子ノックイン ES 細胞から ETAR-LacZ ノックインマウスを作製した。ETAR-LacZ ノックイン胚の X-gal 染色により、頭部および心臓神経堤細胞に由来する細胞群と一部の中胚葉由来の頭部間葉細胞群が可視化できた。次に、LacZ 遺伝子のノックインと同様に RMCE によって ETAR 遺伝子の cDNA 全長をノックイ

ンし、作製された ETAR-ETAR ノックインマウスでは ETAR 欠損マウスで認められる頭部顔面奇形が完全に正常化されることを確認できた。これにより、この RMCE の系によって外来遺伝子を導入することにより、頭部顔面奇形を指標として遺伝子の機能解析を行うことが妥当であることが示された。ETAR ノックインとは対照的に、エンドセリンシステムのもう一つの受容体であり、リガンドである ET-1 との結合親和性も ETAR と同等なものとして考えられている ETBR cDNA 全長のノックインでは下顎領域の切歯に近い遠位部位の骨格形態がわずかに伸長し、部分的に正常化された以外は ETAR 欠損の表現型の正常化には至らなかった。この場合、Dlx5、Dlx6 およびそれらの下流遺伝子群の第 1 鰓弓領域での発現様式においては ETAR 欠損胚との違いは認められず、更に ETAR 欠損胚と同様に下顎弓領域の近位部から遠位部に広がるアポトーシス細胞の局在が確認された。ETAR-ETBR ノックインマウスにおける頭部顔面の骨格形態は、Offermanns のグループによって報告された神経堤特異的に G タンパク質の α サブユニット 2 つを欠損させた Gq/G11 ダブル欠損マウスと非常に良く似た骨格形態の表現型とほぼ同一であった。

これらの結果から、鰓弓領域の背腹軸形成は ETAR 特異的かつ Gq/G11 依存的なシグナルが制御し、鰓弓の遠位部には ETAR 特異的かつ Gq/G11 依存的なシグナルが制御する領域があり、この遠位部の形成に必要な ETAR シグナルは Gq/G11 非依存的であり、そのシグナルは ETBR によって代償され得るということが示唆された。これによって、ETAR と ETBR が、頭部神経堤細胞においては異なるシグナル伝達機能を示すことが明らかになった。

頭部鰓弓領域においては、ET-1 発現が鰓弓腹側の上皮および一部の中胚葉由来間葉に局限するのに対して、ETAR 陽性細胞は頭部神経堤由来細胞を中心に頭部・鰓弓の間葉に広く発現する。ETAR 陽性細胞の ET-1 に対する反応性は領域によって異なるのか、鰓弓領域では ETAR シグナルの活性化が下顎の領域特異性を決定する必要十分条件となりうるかどうかを検証するために、ETAR-ET-1 ノックインマウスを作製し、オートクリン機構による ETAR の恒常的な活性化を試みた。驚くべきことに、ET-1 cDNA のノックインによる ETAR の恒常的な活性化は上顎構造を下顎構造へと変異させ、結果として下顎の特徴であるメッ

ケル軟骨の上顎領域への重複形成と、それに伴う左右上下合わせて4つの下顎骨の形成をもたらした。E10.5日胚を用いて実施した whole-mount in situ hybridization の結果から、ET-1 ノックインによって上顎弓における *Dlx5*, *Dlx6* および *Hand2* をはじめとする下顎マーカー遺伝子の異所性発現誘導が認められた。また、ETAR-ET-1 ノックインマウスでは上顎領域に異所的な咬筋の形成が認められ、加えて三叉神経のうち下顎神経では上顎へ向かう過剰分岐が認められたことから、上顎の下顎化は骨格形態のみならず頭部顔面における神経系および筋肉系の再構築も伴っていることが示唆された。更に、*Hand2* の cDNA 全長のノックインによって引き起こされた同遺伝子の ETAR 陽性細胞での異所的発現は ET-1 ノックインマウスで認められた上顎の下顎化と非常に良く似た表現型を呈し、上顎領域でのメッケル様軟骨の形成も認められた。したがって、上顎領域で異所的に働いた ET-1/ETAR シグナル下流では正常発生における下顎形成のシグナルと同様に *Hand2* の関与を介して上顎の下顎化が生じることが示唆された。一方、器官形成期において ETAR は多くの頭部神経堤細胞に発現するものの、ET-1 ノックインによるその恒常的な活性化は第1鰓弓領域に限定して認められた。第2鰓弓においても背側領域の変化が認められたが、その他の頭部間葉領域では明らかな表現型は認められず、ET-1 シグナルに対する ETAR の反応性は一様でなく、領域特異的に決定されていると考えられた。

今回の私の研究から、顔面の形成過程において、頭部神経堤細胞のシグナル応答性は必ずしも全て均等ではなく、遊走に伴って段階的に決定されていくものであることが示唆された。さらに、第1鰓弓内における頭部神経堤細胞は下顎構造と上顎構造の両方を形成しうる分化能を併せ持ち、ET-1 スイッチがそのいずれかの形態形成を選択するために重要な役割を果たすことが示された。また、これらの結果を通して、本研究で樹立した RMCE による遺伝子交換システムが、本研究において私が当初目的とした「頭蓋顔面の形成における ET-1/ETAR シグナルに関わる分子メカニズム解明」に有用であることが実証された。今後、このシステムを用いて、ETAR サブタイプ特異的なシグナル機構や *Dlx5/6* の誘導機構、さらには形態形成に関わる分子メカニズムの解明をさらに進めていく予定である。