

4. 周生期学部

研究の概況

東 雄二郎

脳形成過程において、出生前後の時期（周生期あるいは周産期と呼ぶ）はその機能的構築において複雑な神経回路網を形成する重要な時期であり、この時期に何らかのダメージを受けるとその後に脳性麻痺などの障害をもたらすことになる。周生期学部では、特に周生期特有の原因によって起こる脳損傷を克服することや、その基礎となる周生期を含めた脳の形成過程と機能構築の分子的理解を目標にして研究を行っている。新生児仮死などに起因する低酸素虚血性脳症は新生児医療の進んだ現在でも一定の頻度で発生し、脳性麻痺に代表される周生期脳障害の主要な一因となっている。この低酸素虚血性脳症は最終的に脳神経細胞死を引き起こし、結果として運動機能や脳の高次機能に障害をもたらすことになる。この低酸素虚血性脳症の分子メカニズムを明らかにすることは、周生期脳障害の予防や治療への手がかりを得るための今日の重要な課題である。これまでの研究から様々な分子が関与していることが明らかとなってきた。

最近、*zfhl1* 転写制御因子ファミリーの一つである δ EF1 が、低酸素虚血性脳症 (HIE) における細胞死に対して細胞保護的な機能を果たしているという知見が得られた。これに関して、ノックアウトマウス等を用いた解析を行うために、そのコンディショナルノックアウトマウスの作製に必要な δ EF1 遺伝子の flox allele の作製を継続中である。実際にこのようなモデルマウスを用いることで低酸素虚血性脳症の分子的理解が進むことが期待できる。また、このファミリーに属するもう一方の因子である SIP1 は、本研究所遺伝学部において Mowat-Wilson 症の原因遺伝子であることが明らかにされてきた。Mowat-Wilson 症患者のほぼ全員において知的障害や小頭症を伴うこと等から、SIP1 および δ EF1 の出生後の脳における機能に関して、コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析も始められている。またそれら遺伝子の機能を知る上で、出生後も含めた脳内における発現パターンの情報は必須であり、その解析も行っている。

さらに当学部では、従来からプロテオグリカンの脳における機能に関する研究が精力的にすすめられてきた。特に当部門で発見されたニューログリカン C (以下、NGC と略す) と呼ばれるプロテオグリカンについては、今年度も種々の側面からその脳における機能について研究が行われた。その一つは、NGC ノックアウトマウスやコンドロイチン硫酸鎖が付加されない変異 NGC を持つマウスに関してその行動解析を行い、やはり行動を司る脳の機能に対して NGC の何らかの寄与が示唆された。一方

in vitro の解析ではニューログリカン C と FGF が結合する可能性について、生化学的・細胞生物学的に解析した。その結果、NGC の神経細胞上での局在と FGF の局在が一致することや、高硫酸化コンドロイチン硫酸と FGF が結合することにより、トリプシンを初めとした複数のプロテアーゼによる FGF の分解が抑制されることを見出した。神経組織における FGF の生理機能は、神経幹細胞の増殖をはじめとして、神経細胞の生存や突起の伸展・分枝に関与することが報告されているが、その際 NGC との相互作用が重要な役割を担っている可能性を示している。

周生期学部では、新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) などの周生期脳障害に対する新規治療法の開発をめざして、HIE モデルラットを用いて研究を進めている。臨床応用へのより現実的な可能性を考え、臍帯血細胞の移植を行ない、その後の行動学的な評価に改善がみられるかどうかの検討を行っている。仮に臍帯血細胞によって、組織学的、行動学的改善が観察されるのであれば、臨床応用的価値は高く、またそのメカニズムは基礎医学的に大変興味深い。

愛知学院大学歯学部との共同研究として行われている先天性歯牙異常の研究においては、歯の形成の初期に重要な役割を担っている *MSX1* 転写制御因子の遺伝子に幾つかの新規の変異を見出しており、それらの変異と *MSX1* の機能との関連性は興味深い。本研究は脳障害や脳形成の研究とは異なるが、先天性遺伝性疾患の発症機序の理解という点で周生期学部の研究に幅を持たせるものとなっている。

以上本年度の研究成果を概説したが、さらに詳細な結果に関しては以下の個別研究を参照されたい。尚、外部研究資金は、文部科学省科学研究費補助金の基盤研究 (C) 3 件、および民間より 3 件の研究助成を受けた。

レポーターノックインマウスを用いたモワット-ウィルソン症候群の原因遺伝子 SIP1 の発現解析

西崎有利子、松井ふみ子、東雄二郎

モワット-ウィルソン症候群の原因遺伝子である Smad Interacting Protein (SIP1) は、zinc finger とホメオドメインをもつ転写因子である。SIP1 は、TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達を担う Smad と相互作用し、その転写機能を調節すると考えられている。SIP1 は、発生過程における前脳、中脳、終脳の神経板及び神経堤由来の末梢神経、海馬や大脳皮質に発現し、そのノックアウトマウスでは、神経管の閉鎖障害、神経堤細胞の移動の停止、海馬や脳梁の欠損が見られるなど、神経系の形成に必須の遺伝子である。モワット-ウィルソン症候群における精神発達遅滞の病因の解明と治療にむけて、SIP1 の

脳内における機能的役割についての解析は必要不可欠である。そこで当学部では、SIP1発現細胞の特性や細胞内局在について明らかにする目的で、SIP1の遺伝子座に in-frame で GFP を挿入し、SIP1の C 末端側に GFP を融合タンパクとして発現するレポーターノックインマウスを、標的遺伝子組み換えにより作成し、解析を行っている。このマウスを用いて抗 GFP 抗体による免疫組織化学染色を行ったところ、GFP によってモニターされる SIP1 の発現は、新生仔の海馬、大脳皮質において核内に観察された。今年度得られたこの結果を基にして、今後さらに、SIP1 を発現している細胞の特性について解析すると共に、SIP1 の核局在を誘起するシグナルや、SIP1 の機能とそれらの関連性について、このレポーターノックインマウスを用いて解析する予定である。

低酸素性虚血性脳症モデルマウスにおける δ EF1 の機能解析へ向けて

東雄二郎、松井ふみ子、時田義人、中西圭子

周生期の仮死は、低酸素性虚血性脳症 (HIE : hypoxic-ischemic encephalopathy) を引き起こし、脳性麻痺の原因となる。HIE の *in vitro* 実験系において、転写制御因子 δ EF1 ノックアウトマウスの胎生後期大脳皮質ニューロンは、野生型と比較し細胞死を引き起こしやすいことが報告されている。また、新生仔7日齢ラットの脳では、低酸素虚血処理約90分後から δ EF1 の発現が上昇し、 δ EF1 は低酸素虚血による細胞死から神経細胞を保護するシグナルを誘発していることが示唆されている。

本研究では、*in vivo* での HIE に δ EF1 が実際に関与しているのかを、遺伝子改変マウスを用いて解析する。 δ EF1 ノックアウトマウスは生後死亡してしまうため、新生仔における機能の解析は不可能である。そこで本研究では、低酸素性虚血性脳症を始め、周生期から成体において特に中枢神経系における δ EF1 機能を知るべく、同時期中枢神経系における詳細な発現パターンの解析、および δ EF1 コンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行うことで、その機能解明に迫ることを計画している。本年度は、 δ EF1 のコンディショナルノックアウトマウスの構築に必要な δ EF1 flox アレルの作製に関して、そのターゲティングベクターを作製し、C57BL/6由来の ES 細胞を用いて、相同組換えを起こした細胞のクローニングを試みた。その結果、正常な核型を維持した independent ES クローン単離することに成功した。現在はそのキメラマウスを作製し、標的 δ EF1 flox アレルが生殖系列細胞に入っているキメラマウスを同定中である。

低酸素性虚血性脳症モデルラットに対する臍帯血幹細胞投与の試み

中西圭子、伊藤美香¹

新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) などの周生期脳障害に対する新規治療法の開発をめざして、当学部では HIE モデルラットを用いて研究を進めている。これまでに、HIE モデルラットに、神経幹細胞 (NSPC) 移植とともに、脳の微小環境分子であるコンドロイチン硫酸糖鎖を切断する酵素 (コンドロイチナーゼ、ChABC) を脳室内投与すると、HIE による脳梗塞が軽減されることを報告した。しかしながら、神経幹細胞の脳室内投与は、治療への応用を考えると非現実的である。一方、臍帯血は本来胎児の血液であり、出生時に採取しておけば自家移植が可能なこと、ES 細胞や iPS 細胞のようにガン化しないこと、静脈内投与でも脳内へ移行できることから、骨髄採取が困難な新生児にとって、最も安全で臨床に応用しやすい幹細胞源である。そこで、周生期脳障害に対する臍帯血幹細胞投与の効果について検討した。

胎生19日齢のラット胎仔より臍帯血を採取し有核細胞層を分離、凍結保存した。そして、生後7日齢に右総頸動脈結紮および低酸素負荷をした HIE モデルラットに、解凍したラット臍帯血有核細胞を腹腔内投与した。3週間後に行動的評価を行ったところ、臍帯血有核細胞を投与したラットでは対照群に比較して活動性が高い傾向が観察された。現在、さらに例数を増やして、検討中である。

¹中央病院

ニューログリカン C ノックアウトマウスはヒトの多動性症候群モデル動物となりうる

青野幸子、時田義人、松井ふみ子

神経系に特異的に発現しているニューログリカン C (NGC) は、膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、神経回路網形成や神経伝達、あるいは行動に密接に関連した分子である。NGC の脳における機能を解明するために、この数年、3種類の NGC 遺伝子改変マウス (NGC 完全ノックアウトマウス (NGC-KO マウス)、NGC の発現が数%に落ちている NGC ノックダウンマウス、CS 鎖を持たない NGC を発現するマウス) の作製・解析を行ってきた。3種類の遺伝子改変マウスのうち NGC ノックアウトマウスは、覚醒剤の一つであるメタンフェタミンに対して野生型マウスと異なる反応を示すことを昨年度報告した。オープンフィールドテストにおける活動量 (NGC-KO マウスは野生型マウスの約2倍の行動量を示す。) から考えて、NGC-KO マウスは多動性症候群のモデ

ル動物となる可能性が考えられた。今年度は、多動性症候群の治療薬として用いられているメチルフェニデートをNGC-KOマウスに投与して、行動がどのように変化するか調べた。メチルフェニデートを投与したNGC-KOマウスは、メタンフェタミンを投与した場合とほぼ同様の行動を示した。この結果は、NGC-KOマウスが多動性症候群のモデル動物となることを強く支持するものであった。現在、多動性症候群発症機構を解明するため、NGC-KOマウスの脳タンパクについて検討を行っている。

繊維芽細胞増殖因子 FGF と神経特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカン C (NGC) の結合

山内 忍¹、中西圭子、青野幸子、時田義人

自閉症の原因として同定された遺伝子の多くがシナプス形成に関与する分子であることから、自閉症の発症機構とシナプスの形成、維持に関する機能不全との関係が議論されている。FGFは多種の遺伝子 (FGF-1~FGF-23) により構成される分子ファミリーであり、繊維芽細胞やグリア細胞、血管内皮細胞など多くの細胞の増殖を促進するヘパリン結合性増殖因子である。これまでに幾つかのFGF (FGF-9, -10, -22など) が軸索終末にシナプス構造の形成を誘導するが報告されていることから、FGFやその受容体が自閉症の発症に関与する可能性が示唆されている。また、神経組織におけるFGFは、シナプス形成のみならず神経幹細胞の増殖や、神経細胞の生存や突起の伸展・分枝に関与する。

昨年は可溶性分子であるFGFをシナプス部での作用に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるニューログリカンC (NGC) が関与する可能性を生化学的・細胞生物学的に示した。そこで本年度は、コンドロイチン硫酸とFGFとの結合の生理的意義の一端を明らかにする目的で実験を行った。その結果、高硫酸化コンドロイチン硫酸とFGFが結合することにより、トリプシンを初めとした複数のプロテアーゼによるFGFの分解が抑制されることを見出した。この結果から、NGCのコンドロイチン硫酸鎖はFGFと結合し、FGFの生体内での安定性に寄与していると示唆される。

¹獨協医大・医

先天性に永久歯を欠損する家系の遺伝学的解析

山口聖士¹、釜本宗史¹、町田純一郎¹、下郷和雄¹、時田義人

永久歯の一部を先天的に欠く部分性無歯症は発症頻度

の高い先天性疾患の一つである。部分性無歯症は、幾つかの疾患で見られる症候群の一症状のみならず、他の症状を伴わない非症候群性も知られている。ヒトの非症候群性の部分性無歯症は一般に常染色体優性遺伝であり、これまでにMSX1やPAX9などのホメオティック遺伝子等が原因遺伝子として明らかにされている。

本年度は、昨年度に引き続き、先天性の非症候群性部分性無歯症の患者サンプルを用いて、MSX1とPAX9の遺伝子解析を継続して行った。その結果、孤発性の5本の永久歯の欠損を呈する患者からMSX1のホメオドメインのN-末端に新規なアミノ酸置換を伴う変異を発見した。ホメオドメインは種を超えて高度に保存されている機能ドメインであることから、MSX1の転写制御機能の低下を引き起こす原因となることが強く示唆される。そこで、この新規変異を導入したMSX1蛋白質の機能解析を、MyoDのプロモーターに対する抑制活性を指標として計測した。その結果、この変異によりMSX1の転写制御活性が減弱することが明らかになった。以上の結果は、MSX1の活性と形成される永久歯の歯胚の数に相関があることを示す。また、本年度の研究により発見した遺伝子変異により、永久歯の歯胚の発生が障害されている可能性が示された。

¹愛知学院大・院・歯

研究業績

原著論文

- Jin JZ¹, Tan M¹, Warner DR¹, Darling DS¹, Higashi Y, Gridley T², Ding J¹ (¹Univ Louisville, ²Jackson Lab) : Mesenchymal cell remodeling during mouse secondary palate reorientation. *Dev Dyn* 239 : 2110-2117, 2010.
- Kamamoto M¹, Machida J¹, Miyachi H¹, Ono T², Nakayama A, Shimozato K¹, Tokita Y (¹Aichi Gakuin Univ, ²Riken) : A novel mutation in the C-terminal region of RUNX2/CBFA1 distal to the DNA-binding runt domain in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40 : 434-437, 2010.
- Nakanishi K, Tokita Y, Aono S, Ida M¹, Matsui F, Higashi Y, Oohira A² (¹Mie Univ, ²Aichi Med Univ) : Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochem Res* 35 : 1131-1137, 2010.
- Yamada K, Miura K¹, Hara K², Suzuki M¹, Nakanishi K, Kumagai T¹, Ishihara N, Yamada, Kuwano R², Tsuji S³, Wakamatsu N (¹Ctrl Hosp, ²Niigata Univ, ³Tokyo Univ) : A wide spectrum of clinical and brain MRI

findings in patients with *SLC19A3* mutations. *BMC Med Genet* 11 : 171, 2010.

学会発表

佐藤義朗¹, 中西圭子, 大平敦彦², Blomgren Klas³, 服部哲夫¹, 早川昌弘¹ (¹名古屋大, ²愛知医大, ³Univ Gothenburg): 中枢神経疾患に対する幹細胞療法—周産期脳障害の救世主となりうるか?. 日本小児神経学会総会(福岡) 2010.5.20.

山田恭聖¹, 中西圭子, 孫田みゆき¹, 垣田博樹¹, 伊藤美春¹, 立花貴史¹, 寺澤かずみ¹, 鈴木基正¹, 丸山幸一¹, 井口敏之², 瀬尾智子² (¹中央病院, ²星ヶ丘マタニティ病院): NICU退院児の非定型的な社会性発達(12ヶ月齢におけるMCHAT評価の試み). 日本周産期・新生児医学会学術集会(神戸) 2010.7.13.

中西圭子, 時田義人, 青野幸子, 松井ふみ子, 東雄二郎, 大平敦彦¹ (¹愛知医大): 脳特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカンはプレイオトロフィンと結合する. Neuro2010(日本神経科学大会・日本神経化学学会大会・日本神経回路学会大会合同大会)(神戸) 2010.9.4.

Jezewski PA¹, Houseman EA², Kamamoto M³, Machida J³, Yamaguchi S³, Ono T⁴, Higashi Y, Nakayama A, Shimozato K³, Tokita Y (¹Univ Alabama, ²Harvard Univ, ³Aichi Gakuin Univ, ⁴Riken): Variable Penetrance, Expressivity and Pleiotropy of *MSX1* Alleles. 31st Annual David W. Smith Workshop on malformations and morphogenesis. (Washington, USA) 2010.8.28.

青野幸子, 時田義人, 松井ふみ子, 大平敦彦¹, 渡辺英治² (¹愛知医大, ²基生研): 脳に特異的に発現するニューログリカンの遺伝子改変マウスに対する向精神薬の影響. 日本神経化学学会(神戸) 2010.9.4.

Yamauchi S¹, Nakanishi K, Aono S, Matsui F, Tokutome S¹, Higashi Y, Oohira A², Tokita Y (¹Dokkyo Univ, ²Aichi Med Univ): Molecular interaction between FGF and brain specific chondroitin sulfate proteoglycan. 日本分子生物学会大会(神戸) 2010.12.7.

Yamaguchi S¹, Machida J¹, Kamamoto M¹, Nakayama A, Higashi Y, Miyachi H¹, Shimozato K¹, Tokita Y (¹Aichi Gakuin Univ): Molecular genetics of non-syndromic Oligodontia Families. 日本分子生物学会大会(神戸) 2010.12.10.

山田憲一郎, 三浦清邦¹, 原賢寿², 鈴木基正¹, 中西圭子, 熊谷俊幸¹, 石原尚子, 山田裕一, 桑野良三², 辻省次³, 若松延昭 (¹中央病院, ²新潟大, ³東京大): 多様な臨床症状と脳MRI画像を呈するSLC19A3異常症. 東海臨床遺伝・代謝懇話会(名古屋) 2011.2.1.

講演など

東雄二郎: 神経組織形成過程におけるSIP1転写制御因子の機能. 発達障害研究所公開セミナー(春日井) 2010.12.22.

その他の研究活動

海外活動

時田義人: 第31回デービッド・W・スミス・ワークショップにて発表(アメリカ合衆国) 2010.8.27.~9.1.

教育活動

中西圭子: 神経科学(名古屋市立大医学部) 2010.4.1.~2011.3.31.