

松尾 勲

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター研究所

病因病態部門

ヘパラン硫酸鎖欠損マウスを用いた細胞レベルでの先天異常発症機構の解明

1. 目的

現在、ヒト新生児の10%以上が、神経管の閉鎖不全（二分脊椎や水頭症）、心（臓）奇形、骨形成異常など、多様な先天性の奇形を持って生まれてくる。実際、乳児の死亡原因の第一位が、先天異常（先天奇形）であり、その20%以上を占めている。このような先天奇形は、エピジェネティクスを含めた正常な発生遺伝学的機構の破綻によって発症すると考えられているが、そのメカニズムは、ほとんど明らかにされていない。本研究課題では、ヘパラン硫酸鎖異常によって胚体外外胚葉及び中胚葉の形成不全を示す*Ext2*ホモ変異胚と多発性外骨腫を発症する*Ext2*ヘテロ変異マウスの表現型を詳細に解析することによって、先天異常発症機構を明らかにする。具体的には、i) ヘパラン硫酸鎖は、分泌性シグナル因子の共受容体等としてリガンドの安定性や正常な分布に働いていることが示唆されているが、*Ext2*ホモ変異胚で見られる初期胚形成異常がどのようなシグナル経路の異常に起因するのか、詳細に表現型を解析することで明らかにする。ii) *Ext2*ヘテロ変異体で見られる軟骨性の腫瘍が、いつどのように成長するのか、詳細に軟骨成長過程を解析することで明らかにする。

2. 方法

i) 発現解析は、既に記載された文献に沿って（文献1）胚性6～7日目の野生型及び*Ext2*ホモ変異マウス胚を用いて、ホールマウントin situ hybridization法又は、免疫染色法を行った。遺伝子型の決定は染色後の胚からDNAを抽出し、PCR法で決定した。胚のin vitro培養は、既に記載した文献に沿って（文献2）、胚性7日目の野生型及び変異型マウスを用いて、行った。

ii) 組織解析は、生後0週齢～4週齢のヘテロ個体を用いて、肋骨、大腿骨を取り出し、脱灰後、6ミクロンメートルでパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

3. 結果

i) *Ext2*ホモ変異胚において、Fgfシグナルに関連する遺伝子の発現を解析した。Fgfリガンド(Fgf4, 8)や受容体(Fgfr1, 2, 4)の発現は正常に観察されたが、細胞内でのシグナル標的分子である*Sprouty4*, *Dusp6*やリン酸化Erkの発現が失われていた。つまり、*Ext2*ホモ変異胚においては、Fgfリガンドや受容体は正常に発現しているが、シグナルが細胞内に伝達されないことが分かった。次に、このFgfシグナル伝達異常がヘパラン硫酸鎖の欠失によるかどうか確認するため、ホモ変異胚を *in vitro* で培養し、Fgfリガンドやヘパリン存在下で、下流標的分子である*Sprouty4*の発現を検討した。その結果、変異体では、ヘパランの添加によって*Sprouty4*などの発現が回復することが分かった。つまり、*Ext2*ホモ変異体ヘパラン硫酸鎖の欠損によって、Fgfシグナルが細胞内に伝達されないことが示された。

ii) *Ext2*ヘテロ変異マウスは、生後半年程度でヒトと良く類似した外骨腫を高頻度で発症する。今回、0週齢から4週齢のヘテロ変異マウスの長管骨（主に肋骨）を用いて、組織切片を作成し、解析した。その結果、1週齢以降、外骨腫へ成長すると考えられる異常な細胞の凝集である軟骨性の小節 (nodule) が、ヘテロ変異マウスで高頻度に観察された。さらに、これらの小節は、週齢を経るごとに出現数及び含まれる細胞数も増加する傾向があることが分かった。また、小節の出現領域は、軟骨の成長帯周辺よりperichondrium周辺により限局する傾向がみられた。

4. 考察

i) 今回の発現解析から、*Ext2*ホモ変異胚において、ヘパラン硫酸鎖が欠損することによって、Fgfリガンドが細胞内にシグナルを伝達できなくなっていることが分かった。つまり、ヘパラン硫酸鎖が哺乳動物胚の発生過程において、Fgfシグナルの伝達に必須な分子であることを示している。この結果は、ヘパラン硫酸鎖がFgfリガンドの共受容体として機能しているという生化学的な報告ともよく合致する結果である。

ii) *Ext2*ヘテロ変異マウス個体において観察された、異常な細胞の凝集である軟骨性の小節が、どのように将来外骨腫へと成長するかどうかは、現時点では不明である。特に、観察された小節の出現頻度に比べて、外骨腫の出現頻度は一桁以上低いことが分かった。従って、軟骨性の小節がどのよう

に外骨腫にまで成長するかについて詳細な検討を進める必要が示唆された。また、現在までに、外骨腫の由来は、成長帯からか、perichondriumからか明らかになっていないが、今回、異常な細胞の凝集である軟骨性の小節が、軟骨の成長帯周辺よりperichondrium周辺により限局して出現する傾向がみられたことから、perichondrium由来であることがより強く示唆された。

5. 参考文献

- (文献1) C. Kimura-Yoshida, H. Nakano, D. Okamura, K. Nakao, S. Yonemura, J. A. Belo, S. Aizawa, Y. Matsui and I. Matsuo *Developmental Cell* 9, 639-650 (2005)
- (文献2) E Tian, C. Kimura, N. Takeda, S. Aizawa and I. Matsuo *Developmental Biology* 242, 204-223 (2002)