

原 著

神経堤細胞におけるバーシカンの意義

¹江東病院循環器内科²東京女子医科大学循環器小児科³東京女子医科大学総合研究所・心血管発生分化制御研究部門⁴東京大学医科学研究所先端診療部⁵東京女子医科大学東医療センター内科

タカベ	トモサト	ミヤガワ	トミタ	サチコ	イソ	ナオユキ	ナカニシ	トシオ
高部	智哲 ¹	宮川	富田	幸子 ^{2,3}	磯尾	直之 ⁴	中西	敏雄 ²
ヤマシタ	ナオヒデ	オオツカ	クニアキ	ナカオカ	タカシ			
山下	直秀 ⁴	大塚	邦明 ⁵	中岡	隆志 ^{2,5}			

(受理 平成24年4月23日)

Versican Is Required for Neural Crest Cells

Tomosato TAKABE¹, Sachiko MIYAGAWA-TOMITA^{2,3}, Naoyuki ISO-O⁴, Toshio NAKANISHI²,
Naohide YAMASHITA⁴, Kuniaki OTSUKA⁵ and Takashi NAKAOKA^{2,5}

¹Department of Cardiology, Koto Hospital²Department of Pediatric Cardiology, Tokyo Women's Medical University³Division of Regulation of Cardiovascular Development and Differentiation, Tokyo Women's Medical University⁴Department of Advanced Medical Science, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo⁵Department of Internal Medicine, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

The embryonic heart is formed through the dynamic recruitment of cells from the second heart field and neural crest in addition to the primary heart field. The expression of versican, an extracellular matrix protein, is disrupted in the heart defect (*hdf*) mouse by the insertion of the transgene into the *Cspg2* locus. Therefore, the *hdf* mouse is a good model to examine the function of versican. Homozygous *hdf* (*hdf/hdf*) embryos display several cardiac anomalies, including an immature cardiac outflow tract. In this study, subtractive hybridization revealed a decreased mRNA expression of several genes associated with cell survival and a normal development of the neural crest, including *Mdk*, *Cdk4*, *Skp2*, *Hspa8* and *Crabp1* in *hdf/hdf* embryos. The initial delamination of the neural crest from the neural tube epithelium appeared to be normal in the *hdf/hdf* embryos, however, no streams of the neural crest cells towards the pharyngeal arches were observed at E9.5. Moreover, LysoTracker and TUNEL staining showed that massive apoptosis occurred in the cephalic mesenchyme of the *hdf/hdf* embryos, thus indicating that versican may thus promote the survival of the cephalic mesenchymal cells, contributing to the neural crest cells at the early embryonic stages.

Key Words: versican, *Cspg2*, *Crabp1*, heart development, neural crest

緒 言

心臓は、胚発生において最初に形成される非常に重要な臓器の一つである。先天性心疾患は出生1,000人に対し約4~10人の割合で生じるが¹⁾、ヒトの先天異常による胎生致死の多くは心血管奇形が原因であり、この中でも特に流出路異常に関連するものが多

い²⁾。また様々な実験的操作によりもたらされた脊椎動物の心臓発達異常の多くも心臓流出路異常であることが報告されている³⁾。したがって胎生期心臓流出路形成の分子機構を理解することは、先天性心疾患の発症機序を解明する糸口となり、重症心奇形の発症予防、早期治療などへ道を開くためにも重要であ

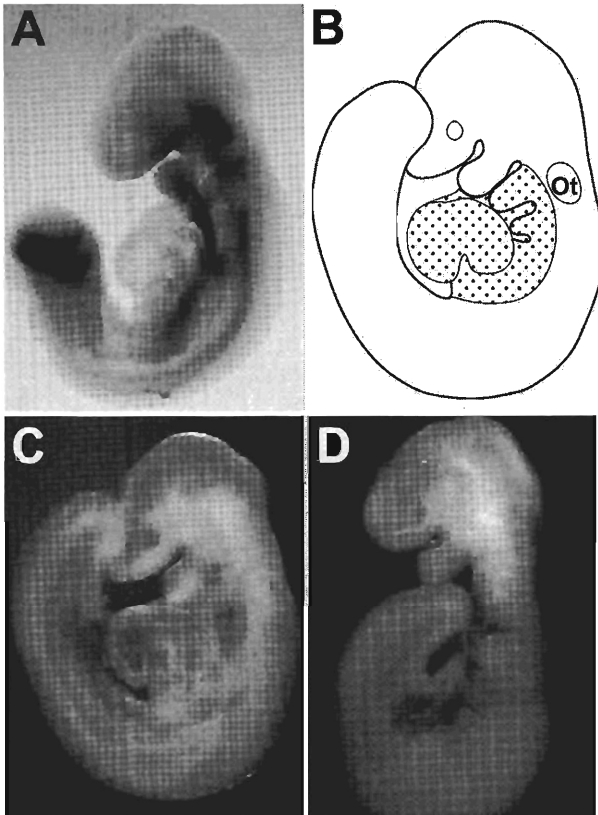


Fig. 1 The representation of the heart field

A: E9.5 wild-type embryo (18 somite pairs) was whole-mount stained with digoxigenin-labeled riboprobe for *Isl-1*. B: The stippled area represents the tissue dissected for this study, which consisted of the heart tube and associated pharyngeal tissue, including parts expressing *Isl-1*; anteriorly, the second pharyngeal, and posteriorly, the dorsal mesocardium which is continuous to the distal end of the heart. C & D: E9.5 embryos before (C) and after (D) dissection of the heart field. Ot, Otic vesicle.

ると考えられる。

近年、従来言われてきた原始心臓前駆細胞以外の領域が心臓形成に重要であることが明らかにされ、ここ10数年のうちに哺乳類における胎生期の心臓形成に関する理解は大きな発展を遂げた。一次心臓形成領域（従来言われてきた原始心臓前駆細胞）に加えて二次心臓形成領域^{4)~6)}、さらには神経堤細胞⁷⁾、心外膜前駆細胞などこれまで心臓とはあまり関係がないと考えられていた細胞群が心血管形成にダイナミックに関与していることが明らかになってきている^{8)~10)}。またmicroRNA (miRNAs) のような noncoding RNAs の心臓形成への関与についても報告されている¹¹⁾。

Heart defect (*hdf*) マウスは劣性の致死的異常を呈し、ホモ接合体は主に心臓流出路の低形成および左

室の拡大形態異常を呈しE11.5までに死亡する¹²⁾。*hdf* マウスはトランスジェニックマウス作製中に偶然生まれた系統で、トランスジーンが13番染色体中の *Cspg2* 遺伝子領域に挿入され、その結果 *Cspg2* 遺伝子がコードする細胞外マトリックスタンパク質であるパーシカン versican の発現が障害されている¹³⁾。*hdf* マウスは心臓流出路形成不全のため胎生致死に至るため、胎生期心臓流出路形成の分子機構を検討するのに良いモデルである。本研究では、正常マウスに比べて *hdf* マウス胎仔の心臓流出路で、発現の低下している遺伝子群が心臓流出路形成不全の原因であると考え、その機序を明らかにする目的で解析を行った。

対象および方法

hdf マウスはサウス・カロライナ医科大学細胞生化学 Roger R. Markwald 博士より供与され、C57BL/6 の背景で維持した。胎仔の胎齢は交配を確認した日の正午を E0.5 として示し、さらに正確な胎齢は Kaufman の基準に従い体節数から判断した¹⁴⁾。ジェノタイプングは F1 : ccataaagcctgtgtgaaatgcc, B1 : cagggttactgacagtccaagctc および B2 : aactcctttctggaataccatcc の3種類のプライマーを用いて PCR 法によって行った。ホモのマウスは胎生 9.5 日で形態学的にヘテロあるいは野生型と容易に区別できたが、確認のため 6/8-F : gcgactgttgagaactcagg と 6/8-R : ttcaaatgagtctgtaactcggg のプライマーを用いた RT-PCR も施行した。

本研究では、E9.5 の胎仔より Fig. 1B に示す点描領域を心臓領域として採取し用いた。この領域は主に一次心臓形成領域、*Isl-1* が発現している二次心臓形成領域¹⁵⁾を含む。検体は TRIzol Reagent (Invitrogen) に溶解し、使用時まで -80°C で保存し、その後 RNA を調整し、iScript (Bio-Rad) を使用して cDNA を作製した。

遺伝子発現解析は PCR-SelectTM cDNA Kit (Clontech), PCR-SelectTM Differential Screening Kit (Clontech) を使用してサブトラクション法を行った。トランスジェニック操作による LacZ リポーター遺伝子挿入のサブトラクション法への影響を除去するために、野生型にヘテロ接合体を加えたサンプルから抽出した RNA 群 (野生型・ヘテロ群) とホモ接合体の RNA 群 (ホモ群) との比較を行った。サブトラクション法によって得られたホモ接合体で発現が低下している可能性のある遺伝子は pCR4-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。

Table 1 The seventeen genes down-regulated in *hdf/hdf* heart field

GenBank	Gene	Relative Quantity of mRNA		p-value
		<i>Wild-type</i>	<i>hdf/hdf</i>	
Neural crest marker				
BC065787	<i>Crabp1*</i>	11.8 ± 1.2	2.2 ± 2.0	<0.01
Apoptosis, cell cycle regulation				
NM_020558	<i>C1d</i>	9.2 ± 0.8	4.7 ± 0.4	<0.01
NM_009870	<i>Cdk4*</i>	71.2 ± 20.1	21.7 ± 5.5	<0.01
BC098371	<i>Skp2</i>	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	<0.001
Secreted factors				
NM_001012335	<i>Mdk*</i>	4.4 ± 1.6	1.0 ± 0.6	0.01
BC008695	<i>Meteorin*</i>	8.3 ± 3.2	2.1 ± 0.3	0.01
Dynein complex				
AB010297	<i>Arp1α</i>	1.9 ± 0.7	0.7 ± 0.2	0.02
M25825	<i>Dynlt-1</i>	0.1 ± 0.03	0.05 ± 0.01	<0.001
Expression in undifferentiated cells				
BC106193	<i>Hspa8*</i>	169.2 ± 10.7	77.3 ± 9.9	<0.01
BC001994	<i>Act16a</i>	2.2 ± 0.5	0.4 ± 0.1	<0.01
Others				
BC034602	<i>Ccdc72</i>	16.6 ± 7.9	6.4 ± 1.2	0.05
NM_007971	<i>Ezh2</i>	5.5 ± 2.3	1.7 ± 1.2	0.03
BC003429	<i>Atp6v1g1</i>	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.04
BC058769	<i>Srp72</i>	1.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.03
BC031544	<i>Acs15</i>	1.0 ± 0.3	0.5 ± 0.02	0.01
NM_023203	<i>RIKEN 2410015N17</i>	4.0 ± 0.4	0.8 ± 0.2	<0.01
NM_029639	<i>RIKEN 1600029D21</i>	0.1 ± 0.04	0.01 ± 0.005	0.05

The Relative Quantity of each mRNA was normalized to that of *gapdh* and expressed as percentage of *gapdh* (mean ± SD). *Acs15*, acyl-CoA synthetase long-chain family member5; *Act16a*, actin-like 6A; *Arp1α*, actin-related protein 1 alpha-isoform; *Atp6v1g1*, ATPase H⁺ transporting lysosomal V1 subunit G1; *Ccdc72*, coiled-coil domain containing 72; *Cdk4*, cyclin-dependent kinase 4; *Crabp1*, cellular retinoic acid binding protein I; *C1d*, nuclear DNA binding protein; *Dynlt-1*, dynein light chain; *Ezh2*, enhancer of zeste homolog 2; *Hspa8*, heat shock protein 8α; *Mdk*, midkine; *Skp2*, S-phase kinase-associated protein 2; *Srp72*, signal recognition particle 72. *The genes whose WISH patterns were presented in Figure 2.

サブトラクション法で抽出された両群で発現量の異なる各候補遺伝子に対してPCR産物が150~300 bpの長さになるようにPCRプライマーを設計しreal-time PCR法を施行した。PCR反応はQuantitect SYBR Master Mix (QIAGEN)を使用し、熱変性95°C 15分間1サイクルの後、熱変性94°C 30秒間、アニーリング60°C 30秒間、伸長反応72°C 30秒間を45サイクルの条件で施行した。補正のためのglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*)プライマーの他に心臓領域の陽性コントロールとしてMyosin light chain 2v (*Mlc2v*)プライマー、ホモ接合体確認目的に*Cspg2*プライマーを使用した。

ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション (whole mount in situ hybridization : WISH) は Moormanらによるプロトコールに従いジゴキシゲニン標識リボプローブを用いて行った¹⁶⁾。胎仔の固定は4% Paraformaldehydeを使用し4°Cで一晩

静置した。ホールマウントでジゴキシゲニン標識UTPリボプローブを反応させた後Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche)とNBT/BCIP stock solution (Roche)を用いて室温で青く発色させた。ジゴキシゲニン標識リボプローブと反応させた凍結マウス胚はすべてTissue-Tek OCT compound (Sakura Finetechnical Co. Ltd.)を使用し、厚さ14μmの凍結切片を作製した。

胎仔全体のアポトーシスについてはLysoTracker[®] Red DND-99 (Invitrogen)¹⁷⁾および、ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon)を用いたTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling technique)法¹⁸⁾を行い、細胞増殖はanti-phospho histone H3抗体 (Upstate)を用いた免疫染色を行った。凍結切片のアポトーシスに対しては、TUNEL法によりApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis

Detection Kit (Chemicon) を使用し行った。発色には DAB Peroxidase Substrate を使用し、室温で茶色に発色させた。

統計

リアルタイム PCR で得られた相対的 mRNA 量は、*gapdh* で補正しパーセント表示した(平均値 ± 標準偏差)。野生型、ヘテロ接合体と、ホモ接合体の相対的 mRNA 量における有意差検定には Student t-test を行い $p < 0.05$ で統計学的に有意とした。

結果

サブトラクション法の結果、ホモ接合体の心臓領域で発現が低下している遺伝子の候補として約 2,000 個のクローンを抽出した。次にハイブリダイゼーションを行い、ホモ群と野生型・ヘテロ群でシグナルに差が認められた 120 個のクローンについてリアルタイム PCR を行ったところ、17 遺伝子に関してホモ接合体における発現低下が示唆された (Table 1)。

これら 17 個の遺伝子の発現パターンを確認するために、それぞれの遺伝子に特異的なリボプローブを作製し E9.5 (15~21 体節) の野生型マウスで WISH を試みた。その結果 heat shock protein 8a (*Hsp8*), cyclin-dependent kinase 4 (*Cdk4*), S-phase kinase-associated protein 2 (*Skp2*), midkine (*Mdk*), cellular retinoic acid binding protein I (*Crabp1*) の 5 個の遺伝子に関して野生型、ホモ接合体双方の E9.5 マウス胎仔における発現の違いを確認できた。*Mdk* は野生型で特に第 1 鰓弓に強く発現していたが、ホモ接合体ではほとんど発現が認められなかった (Fig. 2C, D)。*Hsp8*, *Cdk4*, *Skp2* はいずれも野生型においては鰓弓と体幹部腹側で発現が認められたが (Fig. 2E, G, I), ホモ接合体では明らかに発現が低下していた (Fig. 2F, H, J)。神経堤細胞のマーカとして知られる *Crabp1* は既に報告されているように¹⁹⁾、野生型で頭部、体幹部背側(第 4, 第 6 菱脳節: rhombomere) から第 2 鰓弓と第 3~6 鰓弓原基へ向かう線状の発現として確認された (Fig. 2K)。ホモ接合体ではその発現は減弱しており、頭部、体幹部背側のみに限局して認められた (Fig. 2L)。

神経堤細胞についてさらに検討する目的で E9.5 より若い検体でも WISH を行った。E8.5 の野生型で *Crabp1* の発現は頭部、体幹部背側に限局しており、ホモ接合体と野生型とで差は認めなかった (Fig. 3A, B)。ところが E9.25 では、野生型では *Crabp1* は菱脳から鰓弓へ向かう線状の発現が認められたの

に対し、ホモ接合体では鰓弓へ向かう線状の発現パターンは認められなかった (Fig. 3C, D)。

Crabp1 以外の神経堤細胞マーカーである *ErbB3* は既に報告されているように²⁰⁾野生型で *Crabp1* よりも頭側の神経堤細胞に発現が認められた。E9.25 の野生型で認められた鰓弓に向かう線状の発現パターンはホモ接合体では消失していた (Fig. 3E, F)。

Cdk4, *Hsp8*, *Skp2* および *Mdk* は細胞周期やアポトーシスに関連していることが知られているため、E8.5~9.5 の胎仔を用いて細胞死の解析を行った。TUNEL 法による検討でホモ接合体において E8.5 から E9.5 にかけて頭部間充織における細胞死の増加が認められた (Fig. 4A-D)。LysoTracker 染色は胎生初期のマウスにおいてアポトーシスを反映することが報告されている¹⁷⁾²¹⁾。LysoTracker 法による検討においても野生型に比べホモ接合体において頭部から体幹部にかけて著明な細胞死の増加が認められた (Fig. 4E, F)。細胞増殖に関してはリン酸化ヒストン H3 抗体を用いた染色を行い、ホモ接合体において増殖細胞の減少を認めた (Fig. 4G, H)。TUNEL 染色した切片像でも同様に E9.5 の野生型と比較してホモ接合体において神経管を含む頭部間充織でシグナルの増強が認められた (Fig. 4I, J)。ホモ接合体における頭部間充織の細胞死が多く認められた領域は、本来野生型において *Cspg2* が発現している領域 (Fig. 4K, L) とほぼ一致していた。また野生型で *Crabp1* 遺伝子が発現している領域も細胞死が増加している領域に含まれていたが、細胞死は *Crabp1* 発現領域に限局せず神経管を含む頭部間充織の広い範囲に認められた。

考察

発生の過程で一次心臓形成領域が形成する原始心筒に、二次心臓形成領域、神経堤細胞、心外膜前駆細胞由来の細胞群が加わり統合されてはじめて成熟した心臓が形成される。

本研究において、神経堤細胞の代表的なマーカーの一つである *Crabp1* がサブトラクション法によって抽出され、その発現が E9.5 の *hdf* ホモ接合体で著明に減少していることが明らかとなった。野生型の E8.5 では神経管と表皮外胚葉の接合部に限局した *Crabp1* の発現が E9.25 以降では腹側へ向かう線状の延長として認められるため、これは神経堤細胞の遊走を示していると考えられる。これに対しホモ接合体の E8.5 では野生型と同様に神経管と表皮外胚葉の接合部の *Crabp1* の発現が認められたが、E9.25

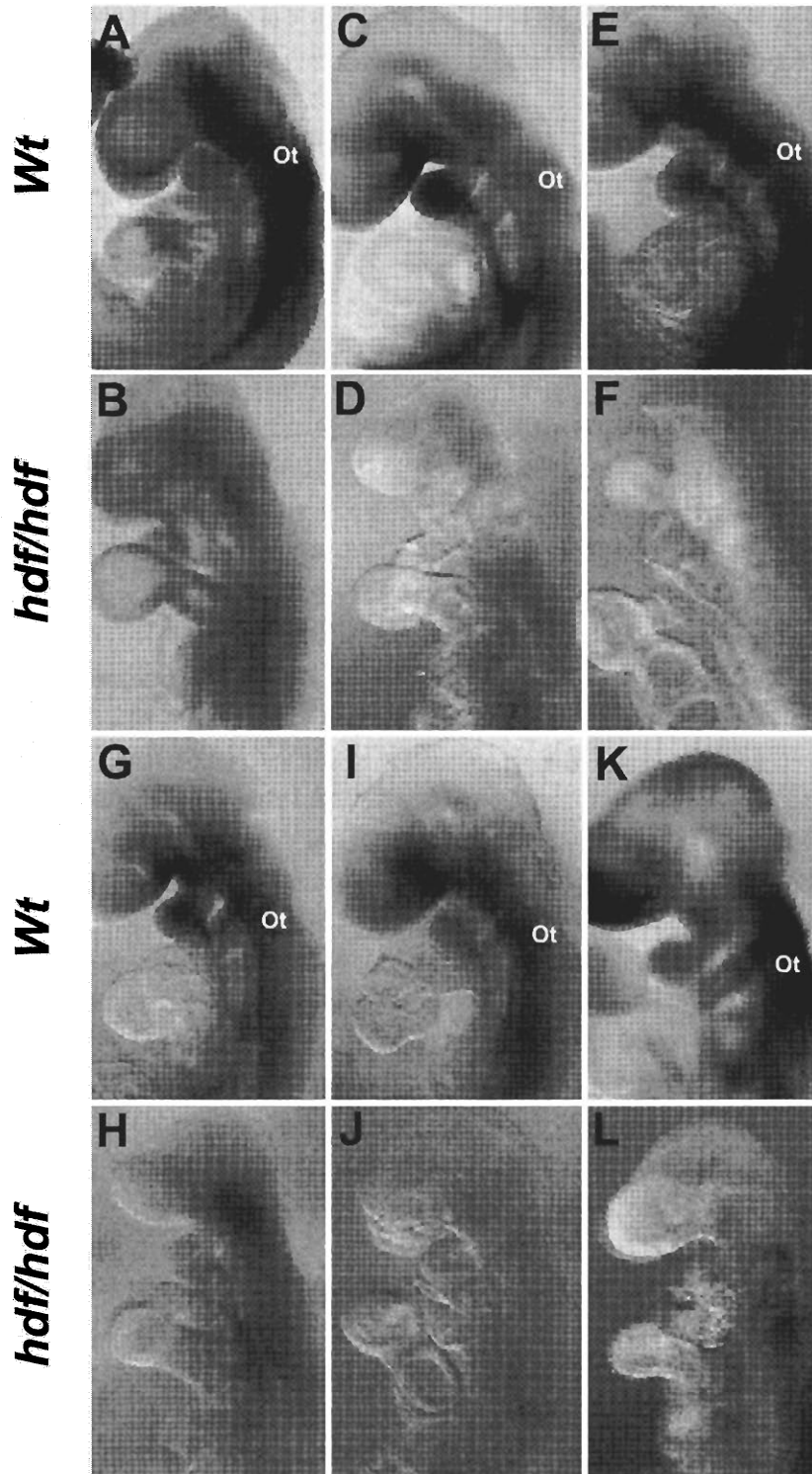


Fig. 2 WISH of the genes down-regulated in *hdf/hdf* embryos

E9.5 wild-type (*Wt*: A, C, E, G, I and K) and *hdf/hdf* (B, D, F, H, J and L) embryos (18-21 somite pairs) were whole-mount hybridized with digoxigenin-labeled riboprobes for *Cspg2* (A and B), *Mdk* (C and D), *Hspa8* (E and F), *Cdk4* (G and H), *Skp2* (I and J) and *Crabp1* (K and L). *Cspg2* expression was observed in the trunk mesenchyme in the wild-type embryo (A), but not in the *hdf/hdf* embryo (B). *Mdk* was expressed in the pharyngeal arches of the wild-type embryos (C). The expressions of *Hspa8* (E), *Cdk4* (G) and *Skp2* (I) were observed in the pharyngeal arches and on the medial side of the body trunk in wild-type embryos. The expression of *Crabp1* was abundantly observed in the mesoderm of the wild-type embryo (K), but it was faint and restricted to the dorsal part adjacent to the neural tube in the *hdf/hdf* embryo (L). Ot, Otic vesicle.

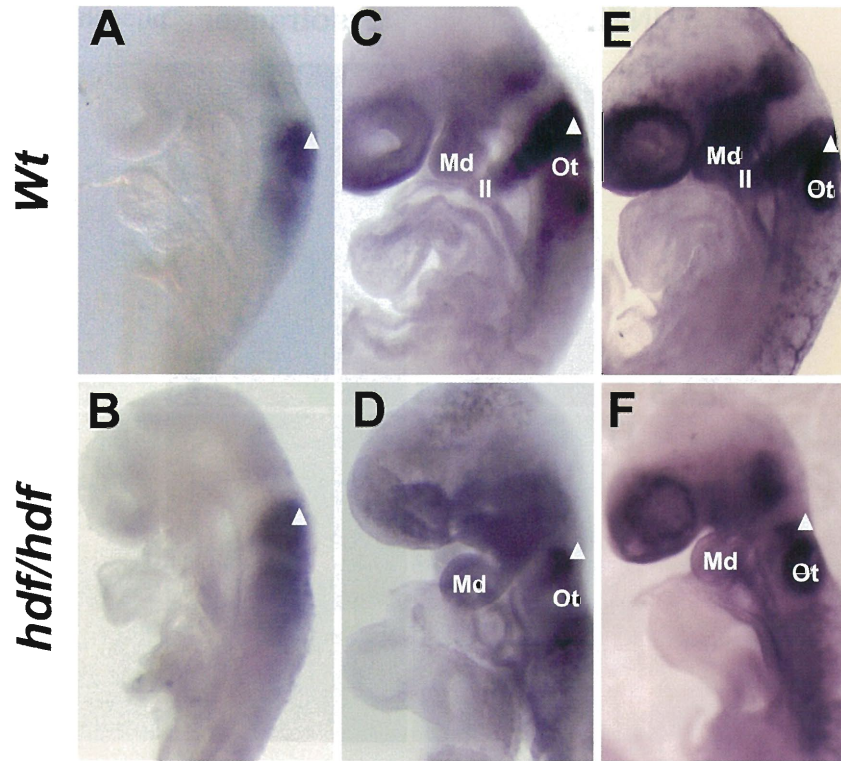


Fig. 3 WISH of the NC markers

At E8.5 (8 somite pairs, A and B) or E9.25 (15 somite pairs, C-F), wild-type (*Wt*: A, C and E) and *hdf/hdf* (B, D and F) embryos were whole-mount stained with digoxigenin-labeled riboprobes for *Crabp1* (A-D) and *ErbB3* (E, F). At E8.5, the expression of *Crabp1* (arrowhead) was restricted to the hindbrain mesenchyme in a manner similar to that seen in wild-type and *hdf/hdf* embryos (A, B). However, at E9.25, a stream emanating from the preotic hindbrain mesenchymal portion of *Crabp1* expression was observed in wild-type, but it was missing in the *hdf/hdf* embryos (arrowheads in panel C vs panel D). At E9.25, *ErbB3* was expressed in migrating NC cells as streams from the hindbrain mesenchyme towards the pharyngeal arches and nasal process in wild-type embryos, but the stream of *ErbB3* expression was disrupted in the *hdf/hdf* embryos (E, F). Ot, otic vesicle; Md, mandibular prominence; II, second pharyngeal arch.

以降では腹側へ向かう線状構造が失われていた。このことから、上皮-間葉転換における神経堤細胞への分化はホモ接合体においても正常に起こっているが、一旦分化した神経堤細胞の維持あるいは遊走が障害されていることが示唆された。*Crabp1* は神経管でも神経堤細胞よりも低いレベルでの発現が認められるが、Fig. 4Mの神経管における比較的強いシグナル強度は染色時間が長い等の問題である可能性がある。*ErbB3* は*Crabp1* とは少し分布の異なった神経堤細胞のマーカであるが、*ErbB3* の発現に関して背側から腹側へ向かう線状の発現パターンが消失していた。この結果も細胞内での単なる遺伝子発現の低下というよりもむしろ神経堤細胞そのものが障害されている可能性を支持すると考えられる。

マウス 13 番染色体にある *Cspg2* 遺伝子は 15 個

のエクソンから構成されており、エクソン 2 の途中からエクソン 6 までが G1 ドメイン、エクソン 7, 8 が GAG- α , GAG- β ドメイン、エクソン 9 からエクソン 15 の途中までが G3 ドメインにそれぞれ対応する²²⁾。パーシカンは *Cspg2* によりコードされる細胞外マトリックスタンパクであるが、その正常な splicing variant として V0, V1, V2, V3 が報告されており、G1, GAG- α , GAG- β , G3 の各ドメインの組み合わせにより各アイソフォームが形成される。*hdf* マウスはトランスジェニック作製過程で偶然生まれた系統であるが、*Cspg2* 遺伝子エクソン 6-7 間のイントロンとエクソン 7-8 間のイントロンの間に *Hoxa-1/LacZ* トランスジーンが挿入されゲノム遺伝子の再構築が起こり、GAG- α , β の一方あるいは双方を含むパーシカンアイソフォームの正常な発現が障害さ

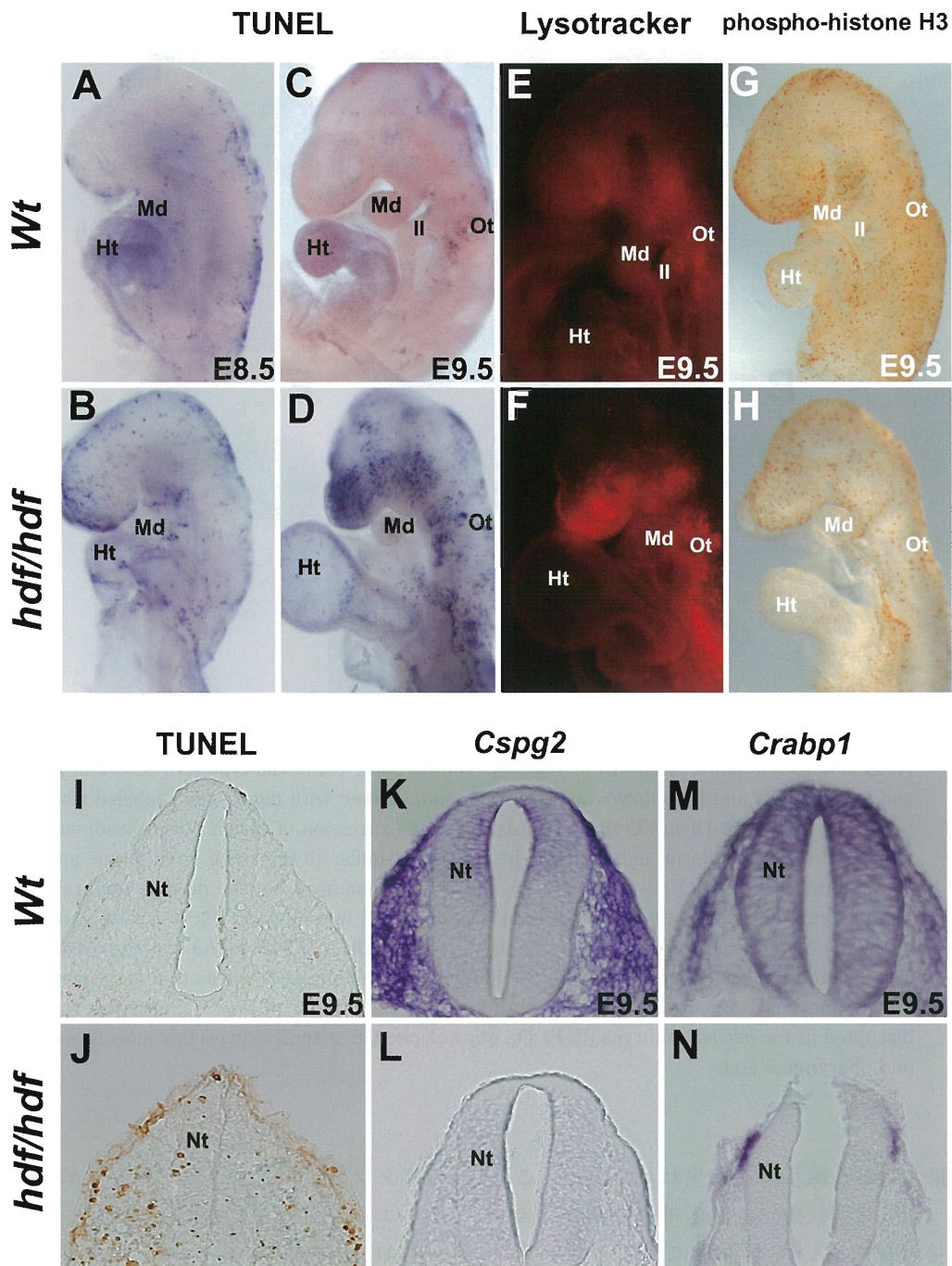


Fig. 4 Massive apoptosis was observed in the cephalic mesenchyme of the *hdf/hdf* embryos

A-D: TUNEL staining of E8.5 (A, B) or E9.5 (C, D) wild-type (*Wt*: A and C) and *hdf/hdf* (B and D) embryos showed increased apoptosis in *hdf/hdf* embryos. E, F: E9.5 wild-type (E) and *hdf/hdf* (F) embryos were reacted with LysoTracker™ Red. The wild-type embryo demonstrated minimal apoptosis (E), whereas the *hdf/hdf* embryos showed extensive apoptosis (F). G, H: Anti-phospho histone H3 staining of E9.5 wild-type (G) and *hdf/hdf* (H) embryos showed decreased mitotic activity in *hdf/hdf* (H) embryos. I, J: TUNEL staining for transverse sections from E9.0 wild-type (*Wt*: I) and *hdf/hdf* (J) embryos showed increased apoptosis in the mesoderm of the *hdf/hdf* embryos. K-N: Transverse sections from E9.5 wild-type (*Wt*: K and M) and *hdf/hdf* (L and N) embryos were hybridized with digoxigenin-labeled riboprobes for *Cspg2* (K, L) and *Crabp1* (M, N). The area of apoptosis detected in the *hdf/hdf* embryos mostly overlapped with the area of *Cspg2* expression in the wild-type embryos. Ht, heart tube; Md, mandibular prominence; Nt, neural tube; Ot, otic vesicle; II, second pharyngeal arch.

れている¹³⁾²³⁾²⁴⁾。したがって *hdf* マウスで生じた異常の多くはパーシカンの発現障害の結果もたらされたものであると考えられる。

パーシカンは神経堤細胞の遊走経路に多く存在するプロテオグリカンである。パーシカンは神経堤細胞が目標地点へ遊走する経路を規定するのに役立っているという報告があるが²⁵⁾、本研究の結果はむしろパーシカンは神経堤細胞に必要であるという報告に一致する²⁶⁾。 *Mdk* がパーシカんに結合するという報告があり²⁷⁾、液性因子である *Mdk* がパーシカンと神経堤細胞の間で何らかの役割を果たしている可能性も考えられる。

ホモ接合体で細胞死が認められたのは、野生型マウスで本来発現すべき *Cspg2* の発現がホモ接合体で低下している部位であった。この結果は、*in vivo* でパーシカンの V1 アイソフォームが細胞を細胞死から防ぐ働きをするという報告²⁸⁾を支持するものと考えられる。

サブトラクション法で発現が低下していた *Cdk4*, *Skp2*, *C1d*, *Mdk* の中で、*Cdk4* は *CyclinD* と複合体を形成し G1/S 移行期の調節や神経細胞死にも関与している²⁹⁾。 *Skp2* は、サイクリン E や p27Kip1 のような多くの細胞周期調節タンパク量の調整に関与し³⁰⁾、*Mdk* は抗細胞死作用を持ち、様々な細胞の成長、生存や遊走を支持する³¹⁾。また *C1d* が過剰発現すると細胞死につながるという報告もある³²⁾。しかしながら、これらの遺伝子はホモ接合体で細胞死が増加している頭部間充織等の領域にはあまり発現が認められなかったため、リン酸化ヒストン H3 の減少に反映されるホモ接合体での細胞増殖の減少がこれら遺伝子の発現低下によるものかどうかは評価が難しい。

発生初期の神経管の背側に位置する神経堤は、神経板と表皮外胚葉の境界部から極めて遊走性が高い神経堤細胞を派生する。耳胞原基後方 1/2 から第 3 体節の神経軸上に位置する神経堤は心臓神経堤と呼ばれ、ここから派生した細胞群は鰓弓動脈の中膜を形成し、さらに遊走して流出路中隔形成に寄与する。ニワトリ胚の神経堤細胞焼灼操作により、①総動脈幹遺残、②大動脈パターン異常(鰓弓動脈異常)、③心筋機能異常の 3 つの心血管系異常を呈する³³⁾。 *Endothelin-1* やその受容体である *endothelin-A* の欠損により心臓神経堤細胞の異常が起こることが報告されている³⁴⁾。また神経堤細胞が心筋機能そのもの

に影響をあたえるといった報告もある³⁵⁾。 *Spotch* マウスは *Pax3* 遺伝子の欠損で生じたマウスであるが、神経堤除去したニワトリ胚の表現型と同様に神経堤細胞の遊走および機能が障害され総動脈幹遺残および心筋機能障害が認められる。 *Spotch* のホモ接合体は E13.5-14.5 に胎生致死に至るが、*hdf* ホモ接合体が胎生致死に至る時期 (E10.5) を超えて長生きする³⁶⁾。神経堤細胞を焼灼除去したニワトリ胚も、E11.5 のマウスと同時期と想定されるニワトリ胚よりも長生きである。 *Spotch* マウスの心血管異常には神経堤細胞が密接に関連していると考えられるが、*hdf* の胎生致死に関して神経堤細胞に関連した異常のみで説明することは難しいと考えられる。一方で二次心臓形成領域に発現する *Tbx1* のノックアウトマウスにおいて *Crabp1* の発現低下が起こることが報告されている³⁷⁾。また神経堤除去したニワトリ胚で二次心臓形成領域の発達が障害されることも報告されており³⁸⁾、*hdf* マウスの胎生致死に関して二次心臓形成領域と神経堤細胞との相互作用が関与している可能性も考えられる。

hdf ホモ接合体においてはパーシカンの正常な発現が障害された結果 E9.0-E9.5 の間に頭部間充織において細胞死が起こり、このことが直接的あるいは間接的に神経堤細胞の障害に関与していると考えられる。正常の発生過程ではパーシカン自体は胎生期に神経堤細胞の遊走のための足場を提供している他に、頭部間充織において細胞を細胞死から保護する役割を担っている可能性も考えられる。*hdf* のホモ接合体において認められた神経堤細胞の障害はこのマウスモデルにおける心臓流出路の形成不全に直接的あるいは間接的に関与していると考えられる。

結 論

本研究では E9.5 マウス胎仔における遺伝子発現解析を行い、*hdf* マウスにおいて神経堤細胞のマーカーの一つである *Crabp1* 遺伝子の発現が著明に減少していることが明らかとなった。*hdf* ホモ接合体においても神経管上皮から神経堤細胞への形質転換は野生型と同様に起こっているが、形質転換した神経堤細胞の鰓弓への遊走が障害されていると考えられた。神経堤細胞の遊走の障害の結果から胎生初期にパーシカン自体は胎生期に神経堤細胞の遊走のための足場を提供している他に頭部間充織において細胞を細胞死から保護していると考えられ神経堤細胞の遊走におけるパーシカンの意義が示唆された。今後、胎生初期における神経堤細胞の遊走がいに二

次心臓形成領域と相互関連し、心血管流出路形成に関与しているかさらなる検討が必要であると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は科学研究費補助金(基盤研究(C)課題番号21591383,研究代表者:中岡隆志 課題名:CSPG2遺伝子の胎生期心臓血管形成における役割)によって行った。実験の技術補佐に関して日下弘道氏に感謝する。またシーケンスサービスとマウスの飼育に関して東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターと動物実験施設に感謝する。

開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) **Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M et al:** Heart disease and stroke statistics—2009 update: A report from the american heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation* **119**: e21-e181, 2009
- 2) **Ferencz C:** On the birth prevalence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* **16**: 1701-1702, 1990
- 3) **Fishman MC, Olson EN:** Parsing the heart: Genetic modules for organ assembly. *Cell* **91**: 153-156, 1997
- 4) **Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME:** The arterial pole of the mouse heart forms from fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* **1**: 435-440, 2001
- 5) **Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R et al:** The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* **238**: 97-109, 2001
- 6) **Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT et al:** Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* **128**: 3179-3188, 2001
- 7) **Hutson MR, Kirby ML:** Neural crest and cardiovascular development: A 20-year perspective. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**: 2-13, 2003
- 8) **Markwald RR, Trusk T, Moreno-Rodriguez R:** Formation and septation of the tubular heart: Integrating the dynamics of morphology with emerging molecular concepts. *In Living Morphogenesis of the Heart* (De la Cruz MV ed), pp43-84, Birkhäuser, Mexico (1998)
- 9) **Harvey RP:** Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* **3**: 544-556, 2002
- 10) **Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S:** Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* **6**: 826-835, 2005
- 11) **Kwon C, Han Z, Olson EN et al:** MicroRNA1 influences cardiac differentiation in drosophila and regulates notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18986-18991, 2005
- 12) **Yamamura H, Zhang M, Markwald RR et al:** A heart segmental defect in the anterior-posterior axis of a transgenic mutant mouse. *Dev Biol* **186**: 58-72, 1997
- 13) **Mjaatvedt CH, Yamamura H, Capelhart AA et al:** The *cspg2* gene, disrupted in the *hdf* mutant, is required for right cardiac chamber and endocardial cushion formation. *Dev Biol* **202**: 56-66, 1998
- 14) **Kaufman MH:** The atlas of mouse development. Academic Press (1995)
- 15) **Cai CL, Liang X, Shi Y et al:** *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* **5**: 877-889, 2003
- 16) **Moorman AF, Houweling AC, de Boer PA et al:** Sensitive nonradioactive detection of mrna in tissue sections: Novel application of the whole-mount in situ hybridization protocol. *J Histochem Cytochem* **49**: 1-8, 2001
- 17) **Zucker RM, Hunter S, Rogers JM:** Confocal laser scanning microscopy of apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Cytometry* **33**: 348-354, 1998
- 18) **Smith SM, Cartwright MM:** Spatial visualization of apoptosis using a whole-mount in situ DNA end-labeling technique. *Biotechniques* **22**: 832-834, 1997
- 19) **Leonard L, Horton C, Maden M et al:** Anteriorization of *crabp-i* expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. *Dev Biol* **168**: 514-528, 1995
- 20) **Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM et al:** Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**: 1109-1113, 1997
- 21) **Schaefer KS, Doughman YQ, Fisher SA et al:** Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn* **229**: 489-499, 2004
- 22) **Zhang Y, Cao L, Kiani C et al:** Promotion of chondrocyte proliferation by versican mediated by *gl* domain and *egf*-like motifs. *J Cell Biochem* **73**: 445-457, 1999
- 23) **Shinomura T, Zako M, Ito K et al:** The gene structure and organization of mouse *pg-m*, a large chondroitin sulfate proteoglycan. Genomic background for the generation of multiple *pg-m* transcripts. *J Biol Chem* **270**: 10328-10333, 1995
- 24) **Zimmermann DR, Ruoslahti E:** Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *Embo J* **8**: 2975-2981, 1989
- 25) **Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH et al:** Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* **121**: 2303-2312, 1995
- 26) **Perris R, Perissinotto D:** Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech Dev* **95**: 3-21, 2000
- 27) **Zou K, Muramatsu H, Ikematsu S et al:** A heparin-binding growth factor, midkine, binds to a chondroitin sulfate proteoglycan, *pg-m*/versican. *Eur J Biochem* **267**: 4046-4053, 2000
- 28) **Sheng W, Wang G, Wang Y et al:** The roles of versican v1 and v2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Mol Biol Cell* **16**: 1330-1340, 2005

- 29) **Copani A, Uberti D, Sortino MA et al:** Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: A mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* **24**: 25–31, 2001
- 30) **Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA et al:** Targeted disruption of *skp2* results in accumulation of cyclin e and p27 (kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* **19**: 2069–2081, 2000
- 31) **Muramatsu T:** Midkine and pleiotrophin: Two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem (Tokyo)* **132**: 359–371, 2002
- 32) **Rothbarth K, Spiess E, Juodka B et al:** Induction of apoptosis by overexpression of the DNA-binding and DNA-pk-activating protein c1d. *J Cell Sci* **112** (Pt 13): 2223–2232, 1999
- 33) **Hutson MR, Kirby ML:** Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 101–110, 2007
- 34) **Kurihara Y, Kurihara H, Oda H et al:** Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* **96**: 293–300, 1995
- 35) **Farrell MJ, Burch JL, Wallis K et al:** Fgf-8 in the ventral pharynx alters development of myocardial calcium transients after neural crest ablation. *J Clin Invest* **107**: 1509–1517, 2001
- 36) **Epstein JA, Li J, Lang D et al:** Migration of cardiac neural crest cells in *splotch* embryos. *Development* **127**: 1869–1878, 2000
- 37) **Vitelli F, Morishima M, Taddei I et al:** *Tbx1* mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. *Hum Mol Genet* **11**: 915–922, 2002
- 38) **Hutson MR, Zhang P, Stadt HA et al:** Cardiac arterial pole alignment is sensitive to *fgf8* signaling in the pharynx. *Dev Biol* **295**: 486–497, 2006