

Title	CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse
Author(s)	上原, 雅行
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47530
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 うえ はら まさ ゆき
上 原 雅 行

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 9 2 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior
patterning of the developing brain and the production of migratory
cranial neural crest cells in the mouse
(CYP26A1 と CYP26C1 は協調的に機能することで、マウス胚における中枢
神経系の前後軸に沿った形態形成および神経堤細胞由来組織の形態形成
に重要な役割を担う)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 浜 田 博 司

(副査)

教 授 近 藤 寿 人 教 授 八 木 健

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

活性型ビタミン A であるレチノイン酸 (以下、RA) が、脊椎動物の中枢神経系の形態形成において、頭尾軸方向の位置情報における後方化因子としての役割を担うと想定されてきたが、この局面における RA 活性制御機構の詳細は不明である。しかし、P450 スーパーファミリーに属する RA 代謝酵素 CYP26A1 と CYP26C1 の中心的役割が、その後脳領域における発現様式から予測されていた。

そこで、本研究では *Cyp26a1* (以下、*a1*) と *Cyp26c1* (以下、*c1*) の各々の単独欠損マウスと二重欠損マウスを作成し解析することで、*a1* および *c1* の頭部形態形成における役割について検討した。

[方法ならびに成績]

a1 と *c1* 遺伝子の発現領域を Whole mount *in situ* hybridization 法を用いて詳細に解析した結果、7.5 日胚から頭部の間充織で、8.5 日胚から後脳領域および頭部神経堤細胞に、共発現していた。また、この時期、RA 合成酵素である *Raldh2* は体幹部で発現していた。したがって、体幹部で合成され頭側へ拡散する RA を頭部で代謝・不活化することにより、*a1* と *c1* は頭部形態形成に関与していることが予測された。

これらの可能性を検証するために *a1* と *c1* の各々の単独欠損マウスの作成および解析を行った。*a1* 欠損マウスの約 20%にのみ、RA の催奇形性に感受性の高い前脳・中脳の低形成と後脳に分化すべく運命決定された領域の前方への拡大が認められ、*a1* は頭部形態形成に部分的に必要であることが明らかになった。一方、*c1* 欠損マウスは発生初期胚および新生仔に顕著な異常は認められず、*c1* は胚発生に単独では必要ではないことが明らかになった。*c1* 欠損マウスが異常を示さないのは、*a1* の機能的重複によるものだと考えられた。

以上の結果は、いずれも過剰の RA を妊娠母体に投与した場合の胎児の表現型よりも軽症であり、特に *c1* の生理的機能を知る上で *a1* と *c1* (以下、*a1/c1*) の二重欠損マウスを解析する必要があると考えられたため、その作成を行っ

た。その結果、*a1/c1* 二重欠損マウスは、胎生 10.5 日までに胚性致死であった。ほぼすべての二重変異マウスにおいて、9.5 日胚では *a1* 単独欠損マウスの 20% に観察されたものよりも重度の前脳・中脳の低形成と後脳領域の前方への拡大や、鰓弓の低形成および頭部神経管閉鎖不全を認めた。生体内で RA がホルモンとしての活性（以下、RA シグナル）を発揮する領域を可視化できる *RARE-lacZ* レポーター遺伝子の発現を、7.5 日胚および 8.5 日胚にて観察した結果、正常では体幹部および後部後脳に局限している RA シグナルの局在が、*a1/c1* 二重欠損マウスでは頭部側に拡大していた。上述したように、*Raldh2* は体幹部で発現し、*a1* と *c1* は頭部側で発現している。したがって、RA は胚の後方で高く前方で低いという、前後軸に沿った濃度勾配を形成していると考えられる。*a1/c1* 二重欠損マウスでは、この濃度勾配が前方に偏った結果、前後軸に沿ったパターンニングが異常になり、後脳領域が前方方向にまで拡張した結果、特に前脳・中脳が形成不全となったと考えられる。事実、後脳に発現する *Hoxb1* 遺伝子の発現は前方へ拡大し、前脳・中脳に発現する *Otx2* 遺伝子は抑制されていた。以上の解析から、体幹部で合成され頭部側へ拡散する後方化因子 RA を代謝することにより、*a1* および *c1* は正しい前後軸情報に基づいた頭部形態形成を担うこと、および代謝酵素としては A1 の機能がドミナントであり、C1 は A1 が機能する状況下でのみ機能できることも判明した。

一方、8.5 日胚の *a1/c1* 二重欠損マウスの組織学的解析から、頭部間充織を構成する細胞の顕著な減少が見いだされた。そこで、次に我々は頭部間充織を構成する神経堤細胞（以下、NCC）に着目し解析した。その結果、*a1/c1* 二重欠損マウスでは、前脳・中脳領域において *Snail* 遺伝子で標識される遊走中の頭部 NCC の数が顕著に減少しており、組織学的な解析から NCC の上皮-間充織転換（EMT: epithelial-mesenchymal transition）が障害されている事が示唆された。実際に、蛍光色素である DiI を用いて頭部 NCC を標識し、全胚培養を行い、これらの NCC の挙動を追跡したところ、中脳領域から遊走している NCC の産生が顕著に抑制されていた。また、正常胚の NCC の脱上皮化領域において産生が抑制されている E-cadherin 蛋白が、*a1/c1* 二重欠損マウスにおいて蛋白量が維持されていたことも、NCC の EMT が障害されていることを強く支持している。これらの結果から、RA 濃度が適切に抑制されていることが頭部 NCC の正常な EMT に必要であり、また頭部 NCC の EMT の異常も前後軸情報の攪乱に加えて頭部低形成の主要な一因であることが示唆された。

[総 括]

今回の解析は、RA 胎児症（RA embryopathy）の臨床的知見と、過剰な RA 投与の影響を解析した古典的な実験発生学的手法により示唆されていた頭部領域への RA の果たす役割が、薬理学的な範疇にとどまらず生理的にも重要であること、すなわち、頭部領域で RA 濃度を低く保つ内在機構が存在していることを明らかにした。これは、発生生物学的にも非常に重要な研究結果である。また、RA が頭部 NCC の EMT による脱上皮化を抑制するという研究結果は、今後の解析の結果が悪性腫瘍の転移の抑制などへの応用が期待できるなど、非常に重要なものである。

論文審査の結果の要旨

脂溶性ホルモンであるレチノイン酸（以下、RA）が、脊椎動物の前後軸に沿った中枢神経系の形態形成に重要な役割を担うことが知られているが、この局面における RA 活性制御の詳細は不明である。しかし、この過程における RA 代謝酵素 CYP26A1 と CYP26C1 の中心的役割が、その発現様式から予測されてきた。

そこで、私はこれら酵素の果たす役割を明らかにするため、*Cyp26a1* と *Cyp26c1* の各々の単独欠損マウスと二重欠損マウスを作成し解析することで、以下のことを明らかにした。1) CYP26C1 は、正常胚発生には単独で必要ではないが、A1 は部分的に必要である。2) CYP26A1 と C1 には機能重複がある。3) *Cyp26a1/c1* 二重欠損マウスでは重度の前脳・中脳の低形成を示し、これは代謝されずに胚内で過剰になった RA による前脳・中脳領域の後脳への形質転換による。4) 過剰な RA は中脳・後脳領域の神経堤細胞の上皮・間充織転換を阻害する。

本論文は、中枢神経系の発生を担う厳密な RA 制御の内在機構を明らかにしただけではなく、RA が悪性腫瘍の転移抑制にも効果がある可能性を示唆し、重要な知見であるため、学位の授与に値すると思われる。