OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression
Author(s)	中野, まゆみ
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59717
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、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

【22】

氏　　名	中野（永島田）まゆみ
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　２５６５４　号
学位授与年月日	平成24年９月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科病態制御医学専攻
学位論文名	Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression （自律神経堤症関連 PHOX2B 遺伝子変異は Sox10 発現制御を障害する）
論文審査委員	（主査） 教　授　榎本　秀樹 （副査） 教　授　島田　昌一　　教　授　山下　俊英

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

ヒルシュスプルング病（HSCR：先天性の腸管神経節欠損）と神経芽腫（NB：交感神経由来の悪性腫瘍）は自律神経節の神経堤症（神経堤細胞の発生異常による疾患）である。先天性中枢性低換気症候群(CCHS：自律神経障害による呼吸不全)の患者は、自律神経節細胞への細胞運命決定を制御する転写因子*PHOX2B*に遺伝子変異を持ち、自律神経堤症を発症する確率が数百倍高い。特にフレームシフト遺伝子変異を持つCCHS患者はHSCRとNBを同時発症する。本研究では、*PHOX2B*フレームシフト遺伝子変異の自律神経節発生への影響を解明し、HSCRとNB発症の分子機構の理解を目指した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

マウスの*Phox2b*遺伝子座にヒトの*PHOX2B*フレームシフト遺伝子変異をgene targetingで導入した。変異マウスは延髄の呼吸制御神経核を欠如し、自発呼吸せず生直後に死亡した。アセチルコリンエステラーゼ染色の結果、大腸の神経細胞の欠損・減少が認められた。交感神経節においては、神経節サイズ及び神経線維の減少と異所性発生を認めた。しかし、生下時までに腫瘍形成は認められなかった。以上の解析から変異を導入したマウスでは、少なくともヒトと同一の神経系に異常を呈する事が明らかとなった。

変異型*PHOX2B*の腸管及び交感神経節発生に与える影響を明らかにするために変異マウス胎児の解析を行った。

腸管神経系を形成する神経前駆細胞は、前腸から後腸へ細胞移動しながら網目状に神経節を形成する。変異マウスの神経前駆細胞は前腸に侵入する時期に増殖が低下し、分化を制御する転写因子であるSox10の発現上昇を呈した。さらに変異マウスの神経前駆細胞は後腸への侵入が遅れ、分化過程でSox10を発現する細胞集団が増加し、神経へ運命決定された細胞が著しく減少した。また神経分化に伴って起こるSox10の発現減少が障害され、Sox10陽性の神経細胞が多数認められた。

交感神経節では、神経節形成直後にPhox2bとSox10の発現制御により神経−グリアの運命決定が起こるが、変異マウスではこの段階でグリアに運命づけられた細胞(Sox10陽性)が増加していた。さらに神経に運命づけられた前駆細胞(Phox2b陽性)において、交感神経に特徴づけられる神経分化遺伝子群の発現が減少し増殖低下が認められた。発生が進んだ神経節内ではSox10陽性細胞の異所的な局在が認められ、最終的に神経細胞数に比してグリアの割合が高い神経節が形成された。以上、変異マウス胎児の腸管及び交感神経節の発生において、早期からSox10の異常な発現上昇があり、神経前駆細胞の増殖・分化の低下ならびにグリアに傾いた分化異常があることが共通に観察された。

神経前駆細胞に対する変異型*PHOX2B*の影響を細胞レベルで調べるため、腸管及び交感神経系の前駆細胞からニューロスフェアを作製し解析を行った。変異マウス由来のニューロスフェアは、自己複製能及び細胞増殖が低下した。また、Sox10を発現する細胞集団が増加しPhox2b陽性細胞が減少した。さらにSox10の発現を維持した異常な神経細胞を認めた。これらの結果から、変異型*PHOX2B*は、前駆細胞の未分化性の維持を障害しSox10の発現抑制の障害により分化異常を引き起こすことが示唆された。

変異型*PHOX2B*の転写活性を調べるため、Phox2bが転写活性を制御する*DBH*プロモーターと神経堤細胞特異的な*Sox10U3*エンハンサーによるluciferase assayを行った。野生型*PHOX2B*は*DBH*プロモーターを活性化させるが、変異型では認められず、更に野生型の活性を阻害した。また、野生型*PHOX2B*は*Sox10U3*エンハンサーの活性を抑制するのに対し、変異型は活性を上昇させることが明らかとなった。

〔総　括(Conclusion)〕

*PHOX2B*のフレームシフト変異による病態誘発効果はヒト-マウス間で高度に保存されていることが示された。変異マウス胎児ではSox10の異常な発現上昇や遷延があり、神経-グリアの分化がグリアに傾いて起こった。変異型*PHOX2B*は優性阻害変異体として野生型のPhox2bの機能を抑制するとともに、機能獲得変異体としてSox10の発現を上昇させた。以上より変異型*PHOX2B*によるSox10の発現制御の障害が自律神経堤症誘導の中核にあると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究において、永島田氏は自律神経系の神経堤症であるヒルシュスプルング病（先天性の腸管神経節欠損）及び神経芽腫（交感神経由来の悪性腫瘍）の発症機序解明に取り組んだ。転写因子*PHOX2B*のフレームシフト遺伝子変異を持つ先天性中枢性低換気症候群（自律神経障害による呼吸不全）患者が両疾患を同時発症することに着目し、マウスにこの遺伝子変異を導入して自律神経系の発生に共通に認められる異常を探索した。

*PHOX2B*遺伝子変異を導入したマウスは、ヒト疾患と類似した表現型を呈し、モデルマウスとして有用であった。このマウスの組織解析および分子生物学的解析により、変異型PHOX2Bは優性阻害変異体および機能獲得変異体であり、神経前駆細胞の分化過程を障害して神経提症を誘導していることを明らかにした。

本研究の成果はJournal of Clinical Investigationに掲載され、Michael Gershon (コロンビア大学)によるcommentaryによっても神経堤症の発症機序解明に貢献する重要な研究であると高い評価を受けた。以上の業績は学位の授与に値すると考えられる。