

氏名	稲谷 大
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1870号
学位授与の日付	平成17年1月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Heparan sulfate is essential for morphogenesis and axon guidance in central nervous system. (ヘパラン硫酸は中枢神経系の形態形成と軸索誘導に不可欠である。)
論文調査委員	(主査) 教授 塩田 浩平 教授 金子 武嗣 教授 井出 千東

### 論文内容の要旨

ヘパラン硫酸(HS)やヘパラン硫酸型プロテオグリカン(HSPG)は、中枢神経系の発達に重要な役割を担っているはずだと以前から考察され続けられてきた。発生過程の中枢神経組織に発現するHSPGであるN-シンデカンのコアタンパクに対する抗体でラット網膜を免疫染色すると生後0日から14日の神経線維の豊富な層に強い免疫染色性を認め、特に神経線維層では、網膜神経節細胞の軸索(視神経)の染色性を確認した。このようなN-シンデカンの発生網膜における発現上昇は、中枢神経組織の発生過程におけるN-シンデカンの関わりを反映していると考えたが、これまでのところN-シンデカンだけでなく他のHSPGのノックアウトマウスにおいても、著しい中枢神経組織の奇形は報告されていない。その理由として、一つのHSPGをノックアウトしても他のHSPGが代償しているからという可能性と、HSPGと結合が報告されている分子の多くはコアタンパクよりもむしろHSに結合するからという可能性とを考え、むしろHSをノックアウトしなければ、HSPGの役割を解析することは難しいと考えた。そこで、HS合成に不可欠な酵素であるEXT1のゲノムをLoxPで修飾したゲノムに組み替えたマウスを作成し、Nestinプロモータを持つCreトランスジェニックマウスを掛け合わせることで、神経組織特異的にEXT1をノックアウトした。得られた変異マウスは生直後に死亡し、異常に小さな大脳皮質、嗅球の欠損、小脳の形成異常を全例で認めた。その形態異常は、HS結合能を持つ8型線維芽細胞成長因子(FGF8)の変異マウスの脳形態異常と酷似していた。また小脳形態形成のシグナル経路においてFGF8のシグナル下流にある分子Wnt1の変異マウスとEngrailed-1のノックアウトマウスとも小脳奇形が酷似していた。HSがFGF8による小脳形態形成に関わっていると考え、whole mount in situ hybridizationで、FGF8の下流分子であるWnt1、Engrailed-1、Engrailed-2の発現を解析したところ、変異マウスではその局在に乱れが生じていた。また抗FGF8抗体にて免疫染色をおこなったところ、中脳小脳境界領域でのFGF8タンパクの局在が変異マウスでは消失していた。これらのことからHSがFGF8の局在に重要であり、その下流の分子群の適切な発現分布を促していることが示唆された。また、FGF8の変異マウスやFGF2のノックアウトマウスにも大脳皮質が小さいという表現型があることから、EXT1変異マウスの大脳皮質細胞ではFGF依存性細胞増殖が阻害されていると仮定し、胎仔大脳皮質細胞を培養し、FGF2またはFGF8を投与したところ、変異マウスの細胞分裂は著しく低下していた。さらに、変異マウスには、脳梁、海馬交連、前交連の欠損を認め、視神経は、視交叉を通過した後、対側の上丘へ向かわず、対側眼へ向かって異常な走行を示した。視交叉での異常は、HS結合能をもつ軸索伸長抑制因子であるSlit1とSlit2とのダブルノックアウトマウスの異常と酷似しており、Slit2ノックアウトマウスとEXT1コンディショナルノックアウトマウスとの掛け合わせによって、SlitとHSとの生体内での相互作用があきらかとなった。以上の結果より、HSの中枢神経組織発生への関わりは、長年示唆され続けられてきたが、今回の研究で、小脳および大脳の形成、視神経の正常な軸索誘導に不可欠な分子であることが決定的となった。

### 論文審査の結果の要旨

神経組織に豊富に発現するヘパラン硫酸型プロテオグリカン(HSPG)であるN-シンデカンのラット発生網膜における

発現パターンを解析し、それが発生段階の視神経や神経線維に富んだ領域に発現していることを示した。このことから N-シンデカンをはじめとした HSPG が発生段階において軸索誘導や神経回路形成に関わっていると予想したが、その予想には、さまざまな研究グループから報告された HSPG のノックアウトマウスにおいて、網膜をはじめとした中枢神経組織に著しい形態異常は報告されていないという矛盾が存在する。そこで、HSPG の本質がヘパラン硫酸 (HS) にあることに着目し、EXT1 を神経組織でノックアウトした点が、HSPG の役割を解析する上でブレイクスルーになったといえる。得られたマウスの形態異常から、HS に結合する分子の生理活性についても解析し、単に網膜組織での HS の役割に留まらず、FGF のシグナルメカニズムや小脳の器官発生の研究分野にも影響を与える研究内容となった。今回は N-シンデカンのように生後早期の網膜に豊富に発現する HSPG の役割まで解析することは生直後にマウスが死亡することにより困難であったが、今後 Cre トランスジェニックマウスを変更することによって、検討すべき課題である。このように以上の研究は、HS/HSPG の中枢神経系での役割の解明に貢献し、医学、神経科学、発生学、糖鎖研究に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年11月5日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。