

胎児後部領域の協調した発生の遺伝学的研究

～前腹壁部、骨盤の正常発生と発生異常へのヘッジホッグシグナル経路の関与～

分子機能薬学専攻 病態遺伝子解析学分野 松丸 大輔

前腹壁部を中心とした胎児後部領域の形成は、生理的ヘルニア（腹部内臓の体外への一時的突出）の形成と回復といったダイナミックな過程を含んでいる。このような形態形成は、支持組織である骨盤、体壁を構成する筋肉群、腹腔内容積と腹部臓器の体積、泌尿生殖系器官など、様々な発生要因が協調的に作用する基盤の上で成り立っていると考えられる。

前腹壁部の協調的発生過程の破綻の一つとして、臍帯ヘルニアが挙げられる。臍帯ヘルニアは、異常に広がった臍輪から内臓が腹腔外へ突出した状態となる先天性疾患であり、泌尿生殖系器官や四肢等の発生異常を伴うことが多い。その発症頻度は約 4,000 出産に 1 人の割合であり、臨床的にも重要な疾患であると言える。しかし、これまでの研究状況として、臍帯ヘルニアの病因や発症メカニズムはおろか、前腹壁部の正常発生への理解すら不十分であった。私は、四肢や泌尿生殖系器官の発生に重要な役割を果たす Hedgehog (Hh) シグナル経路に注目し、同シグナル経路と前腹壁部の正常な発生や臍帯ヘルニアとの関連を解析した。

本研究では、Hh シグナル経路関連遺伝子群の複合遺伝子改変マウス、tamoxifen (TM) 誘導型 Hh シグナル機能獲得型 (Hh-GOF) 変異マウス、Hh シグナル機能喪失型 (Hh-LOF) 変異マウス等の遺伝学的手法を用いて、Hh シグナルと前腹壁部を含む胎児後部領域の形態形成との関連を解析した。

まず、Hh シグナル関連因子である *Sonic hedgehog* (*Shh*), *GLI-Kruppel family member 3* (*Gli3*), *Aristaless-like homeobox 4* (*Alx4*) 遺伝子の複合遺伝子改変マウスを解析した。*Gli3*^{Xi/Xi} 遺伝的背景 (バックグラウンド) に *Alx4*^{Lst} 変異が付加的に導入されることで、変異マウス胎児の臍帯ヘルニアと骨盤の症状が重篤化することを示した。さらに、*Gli3*^{Xi/+}; *Alx4*^{Lst/Lst} バックグラウンドに *Shh* 遺伝子変異が付加されることで、*Gli3*^{Xi/+}; *Alx4*^{Lst/Lst}; *Shh*^{+/-} マウスでは臍帯ヘルニアを示さず、また恥骨結合が形成されることを示した。これらの結果から、臍帯ヘルニアと恥骨結合離解の発症に Hh シグナルが関連する可能性を示した。

次に、Hh シグナルを受容した細胞が前腹壁形成にどのように分布するかについて、*Gli1-CreER^{T2}; R26R* マウスを用いて検証した。胎齢 8.75 日 (E8.75) から E14.0 の期間に Hh シグナルを受容した細胞の分布を解析した結果、前腹壁部には殆ど分布していなかった。この結果より、Hh シグナルは正常な胎児前腹壁部形成プロセスに必須ではない可能性が示唆された。実際、TM 誘導型条件付き *Shh* 遺伝子改変マウス (*Shh-CreER^{T2}/flox*) 等を用いた Hh-LOF 解析では、胎児前腹壁は正常に形成されていた。一方、前腹壁部に異常を示す *Gli3^{Xt/Xt}* マウスでは、*del5-LacZ* Hh シグナルインジケーターマウスを用いた解析において、前腹壁部に異所的な Hh シグナル活性が検出された。以上の結果から、Hh シグナルは正常な胎児前腹壁部形成プロセスより、むしろ臍帯ヘルニアの発症等の胎児の異常な発生プロセスに関わっている可能性が示された。

次に、TM 誘導型全身性 Hh-GOF マウス (*CAGGS-CreERTM; R26-SmoM2*) を用いて、異所的な Hh シグナル導入がマウス胎児に与える影響を解析した。E9.5、E10.5 または E11.5 に TM を投与することによって、臍帯ヘルニア、恥骨結合離解、多指の表現型が誘導された。特に E10.5 における TM 投与では、投与量に依存して臍帯ヘルニアが発症した。しかし、E12.5 では、TM の投与量によらず臍帯ヘルニアは誘導されなかった。これらの結果により、臍帯ヘルニアは Hh シグナルの導入時期、導入量に依存して発症する可能性が示唆された。また、臍帯ヘルニアを発症する Hh-GOF マウスは、コントロールマウスに比べ前腹壁側部領域と四肢において、筋原細胞マーカーである *Myogenin* の発現が弱く、かつその分布が異常であった。アクリジンオレンジ染色を用いた細胞死の解析では、Hh-GOF マウスの前腹壁部臍輪周辺で異所的な細胞死が観察された。これらの結果から、Hh-GOF マウスにおける臍帯ヘルニアの発症原因が、腹壁部筋肉成分の形成異常、過剰な細胞死に関連した臍輪の拡張にある可能性が示唆された。

以上のように、本研究では協調的発生という概念に基づき、器官形成のメカニズムを遺伝学的アプローチを用いて包括的に解析することを試みた。一連の遺伝子改変マウスを用いた遺伝学的解析を元に、異所的に導入された Hh シグナルが多指、臍帯ヘルニア、恥骨結合離解等の先天性疾患の遺伝的要因の一つとなりうることを示した。本研究は、Hh シグナルが前腹壁部の形成異常に関わる可能性を示唆し、これらの先天性異常の遺伝学的症状回復を示した初めての知見である。