

称号及び氏名 博士（獣医学） 田中 夏樹

学位授与の日付 平成28年3月31日

論文名 **Functional analyses of *Ccdc85c*, a causative gene for genetic hydrocephalus**  
(遺伝性水頭症の原因遺伝子 *Ccdc85c* の機能解析)

論文審査委員 主査 山手 丈至  
副査 竹内 正吉  
副査 岡田 利也  
副査 桑村 充

## 論文要旨

### 緒言

神経の発生異常に起因する先天性疾患には、原因が不明で治療法が確立されていないものが多く存在する。これらの中には、異所性灰白質や水頭症などが含まれる。これらの疾患は、大脳の正常な発達に關与する遺伝子の変異に起因すると考えられているが、原因遺伝子が不明である疾患も多い。

水頭症は脳脊髄液が脳室内に貯留して脳内の圧力が高まり、脳室の拡張と脳の萎縮、それらに伴う脳の機能・発達障害を引き起こす疾患である。一方、異所性灰白質は大脳で産生される神経細胞の移動障害によって異常な位置に灰白質が構築される神経奇形で、てんかんの原因となる。これらの神経発生異常の研究には、患者数が少ない等の理由で困難を伴うが、水頭症や異所性灰白質のモデル動物が確立されており、病理発生の解明へ貢献すると期待されている。

**Hemorrhagic hydrocephalus (*hhy*)**マウスは、大阪府立大学理学部の動物施設にて発見された先天性水頭症を示すミュータントマウスである。*hhy*マウスは出血を伴う水頭症を発症し、頭部がドーム状に膨隆する。また組織学的に、側脳室周囲における異所性灰白質の形成もみられる。その原因はマウスの第12番染色体上に存在するcoiled-coil domain-containing 85C (*Ccdc85c*)遺伝子の欠損であることが明らかとなった。*hhy*マウスの病理発生が明らかになりつつある一方、

Ccdc85C蛋白の生物学的な機能、特にマウス以外の動物での役割については未だ不明な点が多い。

本研究では、Ccdc85C 蛋白の機能やマウス以外の動物における役割を明らかにすることを目的とし、Ccdc85c ノックアウトラットを作製してその病変を検討した。また、ラットやイヌ、ネコの腫瘍における Ccdc85C の役割についても検討した。

## 第1章 Ccdc85c ノックアウト(Ccdc85c KO)ラットの病変

### 第1節 Ccdc85c KO ラットの作製

Transcriptional activator-like effector nuclease (TALEN)を用いたゲノム編集によって F344 ラットの Ccdc85c をノックアウトした。その結果、Ccdc85c に変異を有する F0 ラットが 9 匹得られた。F2 ラットを作出したところ、1 系統の F2 ラットに頭部の腫大した個体が出現した。ゲノム DNA を用いた PCR の結果、このラットでは Ccdc85c に約 300 bp の欠失がみられ、Ccdc85c KO ラットと判定した。また、Ccdc85c KO ラットにおける Ccdc85C 蛋白の発現を調べた。ラットの Ccdc85C 蛋白に対する抗体を自作し、Ccdc85C 蛋白が高発現している十二指腸を用いて免疫組織化学法を実施した。その結果、Ccdc85c KO ラットでは Ccdc85C の発現がみられないことが確認された。

### 第2節 Ccdc85c KO ラットの病理組織学的解析

Ccdc85c KO ラットでは生後 14 日齢頃から頭部の腫大がみられ始め、その後頭部の腫大は顕著になっていった。また、一部の個体では頭蓋内出血がみられた。Ccdc85c KO ラットでは頭蓋骨が菲薄化し、脳脊髄液の貯留により側脳室が拡張して、水頭症を発症していた。HE 染色により中枢神経系および全身諸臓器を病理組織学的に解析したところ、Ccdc85c KO ラットでは側脳室背側面の上皮細胞が欠損していた。また、同部位の直上の脳実質に帯状の異所性灰白質の形成がみられた。眼球では、網膜の外顆粒層と内顆粒層の配列が一部で乱れていた。その他の臓器には組織学的な異常はみられなかった。

以上の結果から、Ccdc85c KO ラットは *hhy* マウスと類似したモデル動物と考えられた。しかしながら、異所性灰白質の大きさが *hhy* マウスに比べると大きい点や、網膜に明瞭な網膜異形成が存在しない点は、*hhy* マウスと異なっていた。以上より、Ccdc85C 蛋白は脳や眼球の形態形成に重要であるが、病変の程度には種差があることが示唆された。

## 第2章 正常ラットにおける Ccdc85C 蛋白の全身分布と機能の解析

### 第1節 ラットの全身臓器における Ccdc85C 蛋白の局在

SD ラットを用いて、Ccdc85C 蛋白に対する免疫組織化学法によって Ccdc85C の発現動態を解析した。その結果、生後 0 日齢の SD ラットの尿細管上皮細胞や消化管上皮細胞など、多くの上皮細胞で Ccdc85C 蛋白の発現がみられた。また、大脳や網膜の神経幹細胞でも Ccdc85C 蛋白の発現がみられた。単層上皮では Ccdc85C 蛋白の発現がみられたが、重層上皮ではみられなかった。さらに、Ccdc85C 蛋白の細胞内での局在を観察すると、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 と非常に類似した発現パターンを示しており、細胞間の頂端側に局在していることが明らかになった。

## 第 2 節 Ccdc85C 蛋白発現の経時的な変化

Ccdc85C 蛋白の発現が各臓器の発達に伴って経時的にどのように変化しているかを調べた。その結果、腎臓や大脳では Ccdc85C 蛋白の発現は胎仔期や生後直後に強くみられ、その後減弱し、成熟個体ではほとんど消失した。一方、精巣では 14 日齢までは Ccdc85C 蛋白の発現は弱かったが、21 日齢以降で発現が増強していった。さらに、腸管では、胎仔期から成体に至るまで Ccdc85C 蛋白の強い発現がみられた。そこで、腎臓と腸管に対して増殖細胞を標識する 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) と Ccdc85C 蛋白の二重染色を行い、増殖活性との関連を調べた。生後直後には、両臓器で Ccdc85C 蛋白の発現が強くみられ、EdU 陽性の増殖細胞も多かった。2 カ月齢になると、腎臓では Ccdc85C の発現がほぼ消失し、EdU 陽性細胞もほとんど存在しなくなったのに対し、腸管では Ccdc85C 蛋白の発現が強くみられ、EdU 陽性細胞も多くみられた。

以上の結果から、Ccdc85C 蛋白は増殖活性の高い単層上皮細胞の細胞間の頂端側に発現していると考えられた。Ccdc85C 蛋白は胎仔期から生後直後の細胞増殖の盛んな上皮細胞に加えて、成体の腸管上皮細胞のような増殖の盛んな上皮細胞で何らかの役割を担っていると考えられた。

## 第 3 章 乳腺腫瘍における Ccdc85C 蛋白の発現

### 第 1 節 乳腺腫瘍における Ccdc85C 蛋白の局在

ラット、イヌ、ネコの乳腺腫瘍を用いて Ccdc85C 蛋白に対する免疫組織化学法を行い、その発現を調べた。ラットの腫瘍において、Ccdc85C 蛋白は腺上皮細胞に発現しており、正常組織の上皮細胞と同様に細胞間の頂端側にシグナルがみられた。また、イヌとネコの正常乳腺と腫瘍の腺上皮細胞でも、ラットと同様に細胞間の頂端側にシグナルがみられた。イヌでは腫瘍と正常乳腺の一部の筋上皮細胞でも発現がみられた。

### 第 2 節 乳腺腫瘍の悪性度と Ccdc85C 蛋白発現の関連

乳腺腫瘍の悪性度と Ccdc85C 蛋白発現の関連を評価した。腫瘍とその周囲の

正常乳腺組織における *Ccdc85C* 蛋白の発現強度を比較し、以下のグループに分類した。*High*：正常乳腺より腫瘍のほうが *Ccdc85C* 蛋白の発現が強い、*Equal*：ほぼ同等の発現強度、*Low*：正常乳腺より腫瘍のほうが *Ccdc85C* 蛋白の発現が弱い。そして、良性腫瘍と悪性腫瘍で各グループの症例数を比較した。その結果、イヌの悪性腫瘍では *High* と *Low* の症例数がほぼ同数であった。一方、イヌの良性腫瘍では *High* の症例数が多かった。

以上の結果から、動物の乳腺腫瘍の腺上皮細胞においても *Ccdc85C* 蛋白の発現がみられることが明らかとなった。また、イヌの筋上皮細胞で *Ccdc85C* 蛋白が何らかの機能を有している可能性が示された。さらに、乳腺腫瘍の悪性度と *Ccdc85C* 蛋白の発現強度の関連性が示された。

## 総括

*hhy* マウスの原因遺伝子として同定された *Ccdc85c* の機能には未だ不明な点が多い。本研究では、*Ccdc85c* KO ラットや正常ラット組織、ラットやイヌ、ネコの乳腺腫瘍を用いて *Ccdc85C* 蛋白の機能や特性を解析し、以下の結論を得た。

1. *Ccdc85c* KO ラットは出血を伴う水頭症の発症や異所性灰白質の形成など *hhy* マウスと類似の病理組織学的特徴を有し、*Ccdc85C* 蛋白の機能がラットとマウスで類似していることを示した。
2. *Ccdc85C* 蛋白が正常ラット組織において、増殖活性の高い単層上皮細胞に発現しており、単層上皮細胞における細胞増殖に関連していることが示された。
3. *Ccdc85C* 蛋白が正常組織に加えて腫瘍でも発現していることを明らかにした。また、イヌの乳腺では、筋上皮細胞でも *Ccdc85C* 蛋白が発現していることを示した。
4. イヌの乳腺腫瘍において、悪性腫瘍での *Ccdc85C* 蛋白の発現が正常乳腺組織に比べて減弱する傾向があることを明らかにし、*Ccdc85C* 蛋白の発現強度が腫瘍の悪性度と関連する可能性を示した。

## 審査結果の要旨

水頭症や異所性灰白質などの神経の発生異常に起因する先天性疾患には、原因が不明で治療法が確立されていない疾患が多く存在する。原因である神経発生異常の研究は患者数が少ない等の理由で困難を伴っているが、疾患モデル動物を確立することが、その病理発生機序の解明へ貢献すると期待されている。

**Hemorrhagic hydrocephalus (*hhy*)** マウスは、出血を伴う水頭症と異所性灰白質

を特徴とする自然発生ミュータントマウスである。その原因は**coiled-coil domain-containing 85C (Ccdc85c)**遺伝子の欠損である。**hhy**マウスの病理発生が明らかになりつつある一方、**Ccdc85C**蛋白の生物学的な機能、特にマウス以外の動物での役割については未だ不明な点が多い。本研究では、**Ccdc85C**蛋白の機能やマウス以外の動物における役割を明らかにすることを目的とし、**Ccdc85c**ノックアウトラットを作製することでその病変を解析するとともに、ラットの正常組織、およびラット、イヌ、ネコの乳腺腫瘍における**Ccdc85C**蛋白の発現特性について検討している。

第1章では**Ccdc85c**ノックアウト(**Ccdc85c KO**)ラットを作製し、その病変を解析している。**Transcriptional activator-like effector nuclease (TALEN)**を用いたゲノム編集によって**F344**ラットの**Ccdc85c**をノックアウトした結果、**Ccdc85c**に約**300 bp**の欠失が確認され、**Ccdc85c KO**ラットであると判断された。**Ccdc85c KO**ラットでは、生後**14**日齢頃から頭部の腫大がみられ始め、その後徐々に顕著になっていった。また、一部の個体では頭蓋内出血が認められた。頭部の腫大は、脳脊髄液の貯留による側脳室の拡張によるもので、すなわち水頭症を発症していた。病理組織学的解析の結果、**Ccdc85c KO**ラットでは側脳室背側面の上皮細胞が欠損しており、また、同部位の直上の脳実質に帯状の異所性灰白質の形成がみられた。眼球では、網膜の一部で外顆粒層と内顆粒層の配列の乱れが認められた。**hhy**マウスとの比較により、**Ccdc85c KO**ラットは、**hhy**マウスと類似した病態を示すが、異所性灰白質の大きさや網膜の配列異常の程度は**hhy**マウスと異なっていたことから、大脳や眼球の形態形成における**Ccdc85C**蛋白の役割には種差があることが示唆された。

第2章では正常ラットにおける**Ccdc85C**蛋白の全身分布と機能の解析を行っている。**SD**ラットを用いて、**Ccdc85C**蛋白に対する免疫組織化学法によって**Ccdc85C**の発現動態を解析した結果、生後**0**日齢の**SD**ラットの尿細管上皮細胞や消化管上皮細胞など、多くの単層上皮細胞の細胞間の頂端側で**Ccdc85C**蛋白の発現がみられた。また、大脳や網膜の神経幹細胞でも**Ccdc85C**蛋白の発現が認められた。さらに、腎臓と腸管に対して増殖細胞を標識する**5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU)**と**Ccdc85C**蛋白の二重蛍光免疫染色を行い、増殖活性との関連を調べている。その結果、**EdU**陽性の増殖細胞が多くみられた生後直後の両臓器および**2**カ月齢の腸管で**Ccdc85C**蛋白の発現がみられ、**Ccdc85C**蛋白が細胞増殖の盛んな上皮細胞で何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

第3章ではラット、イヌ、ネコの乳腺腫瘍を用いて**Ccdc85C**蛋白に対する免疫組織化学法を行い、その発現分布を調べている。いずれの動物種の腫瘍でも、**Ccdc85C**蛋白は腺上皮細胞に発現しており、正常組織の上皮細胞と同様に細胞間の頂端側にシグナルがみられた。また、イヌでは腫瘍と正常乳腺の一部の筋上皮細胞でも発現がみられた。さらに、乳腺腫瘍の悪性度と**Ccdc85C**蛋白発現の関連を評価している。その結果、イヌの悪性乳腺腫瘍の組織では、正常乳腺

組織よりも **Ccdc85C** 蛋白の発現が減弱する傾向があることを明らかにし、乳腺腫瘍の悪性度と **Ccdc85C** 蛋白の発現強度に関連性がある可能性を示した。

本研究成果は、増殖活性のある単層上皮細胞に発現する **Ccdc85c** は、ラットの水頭症と異所性灰白質の発症に重要であること、また、ラット、イヌ、ネコの乳腺腫瘍でも悪性度に関連して発現している可能性を初めて明らかにした内容である。この成果は、獣医学・医学、さらには実験動物学の新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。