



Roles of the Foxj1 and Inv genes in the left-right determination of internal organs in mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 玉越, 智樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/301

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 7 1 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	玉 越 智 樹		
論文題目	Roles of the Foxj1 and Inv genes in the left-right determination of internal organs in mice (マウス内部臓器の左右決定における Foxj1 遺伝子と Inv 遺伝子の役割)		

博士(医学) 玉 越 智 樹

論文題目

Roles of the *Foxj1* and *Inv* genes in the left-right determination of internal organs in mice

(マウス内部臓器の左右決定における*Foxj1*遺伝子と*Inv*遺伝子の役割)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

脊椎動物における左右非対称な内部臓器の形成は、発生初期の結節(ノード)周辺での*Nodal*遺伝子の片側的な発現に起因する。マウスではこの左右軸の対称性が破られる最初のステップとして、結節腹側の一次繊毛が起こす左向きのノード流の重要性が、一次繊毛の形成不全、あるいはその運動性欠如をとともなう変異体の研究から強く示唆されている。一次繊毛に局在する*Inv*タンパクを欠損した*inv*ホモマウスは、ほぼ100%が内臓逆位を示す。一方で、forkheadドメインを持つ転写因子で、気道上皮などの繊毛上皮細胞に発現する*Foxj1*遺伝子をノックアウトした*Foxj1*ノックアウトマウスは、およそ半数が内臓逆位を示した。これらの二つの変異マウスは、ともに結節に一次繊毛を有していることが知られている。*Foxj1*は最近、結節腹側層において発現を示す報告がなされたが、その欠損マウスにおける一次繊毛の運動性については不明である。一方、*inv*ホモ変異マウスでは一次繊毛は野生型マウスと同じ向きに回転するものの、左へのノード流の速度が遅いことが報告されている。本研究では*Foxj1/inv*二重変異マウスを作成して、各遺伝子型胎仔における内臓の表現型、および*Pitx2*遺伝子の発現について解析を行い、*Foxj1*と*Inv*の左右軸決定における役割について検討した。

〔材料ならびに方法〕

*Foxj1*ノックアウトマウスはC57BL/6系統、*inv*変異マウスはFVB/N系統の遺伝的背景の元でそれぞれ維持した。この*Foxj1*^{+/-}マウスと*inv*^{+/+}マウスを交配し、*Foxj1/inv*二重ヘテロ変異マウスを作成した。さらにこの二重ヘテロ変異マウスの雌雄を交配して、*Foxj1/inv*二重ホモ変異体を含む各遺伝子型の胎仔を得た。このうち、胎生18.5日の胎仔について大動脈弓、肺、胃の表現型を調べた。また、胎生8.5日の胎仔について、マウス*Pitx2*に対するRNAプローブを用いたホールマウントin situ hybridizationを行い、*Pitx2*遺伝子の発現解析を行った。

〔結果〕

二重ヘテロマウス同士の交配の結果、胎生18.5日の胎仔282体を得た。各遺伝子型の個体数は、予測値のおよそ半数の*Foxj1*^{-/-}マウスを除くと、ほぼメンデル則に従っていた。大動脈弓は、*Foxj1*^{-/-}マウスでは全て正常な左向きなのに対して、*inv/inv*マウスでは1:2.5の割合で右向きが多く見られた。二重ホモ変異マウスでは、正逆の比率はほぼ1:1だった。肺は、*Foxj1*^{-/-}マウスでは左右ともに4つの肺葉をもつ右側相同が多く、*inv/inv*マウスでは肺葉数が左右で逆になるものが多数を占めた。二重ホモ変異マウスは、ほぼ全てが右側相同肺を呈した。胃は、*Foxj1*^{-/-}マウス、*inv/inv*マウス、二重ホモ変異マウスのいずれにも正位と逆位が見られ、それぞれの比率は1:1.3、1:1.7、1:1.6で逆位の方が少し多かった。胎生8.5日胚における*Pitx2*の発現は、野生型では左側の側板中胚葉(LPM)に確認されたが、多くの*Foxj1*^{-/-}マウス

では左右ともに欠如しており、また、ほとんどの*inv/inv*マウスでは右側LPMにおいて発現していた。ほとんどの二重ホモ変異マウスでは左右ともに発現が見られなかった。

〔考察〕

左右軸異常を示す変異マウスには、一次繊毛を欠くか否かで2つのタイプがある。後者のグループに属し、ともに一次繊毛を持つが、内臓逆位の発生様式において異なった表現型を示す*Foxj1*欠損マウスと*inv*変異マウスを用いることにより、本研究では両遺伝子の内部臓器の左右決定における役割を明らかにすることが出来た。大動脈弓では二重ホモ変異マウスは、両シングルホモマウスの中間の表現型を示した。しかし*Foxj1*^{-/-}マウスは約半数が胎生死したと考えられ、仮に異常な右向きの大動脈弓を持つものが多数死亡していたとすれば、二重ホモ変異マウスの表現型は*Foxj1*^{-/-}マウスと同等かそれに近くなる。肺では*Foxj1*^{-/-}マウスと二重ホモ変異マウスにおいて、右側相同が主に見られた。C57BL/6系統とFVB/N系統でそれぞれ別々に維持しているシングルホモマウスが、既報通りの表現型を示したことから、この結果は遺伝的背景が原因であると考えられた。胃を含めたこれら3つの臓器の観察結果から、左右軸の決定過程において、*Foxj1*が*Inv*よりも下流で機能しているか、あるいは同じレベルで働くが*Foxj1*の方がより強い影響力を持つ可能性が考えられる。*Pitx2*の発現が*Foxj1*^{-/-}マウスと二重ホモマウスのLPMで消失していることが見出されたが、これは*Pitx2*ノックアウトマウスの表現型として、右側相同肺と胃の配置の左右ランダム化が報告されていることと一致する結果である。

〔結論〕

*Foxj1/inv*二重変異マウスを作成し、*Foxj1*^{-/-}マウスと*Foxj1*^{-/-};*inv/inv*マウスにおいて右側相同肺が主な表現型として観察された。また左右軸の決定過程における*Foxj1*欠損の*Inv*欠損に対する優位性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物における形態形成においては、臓器の配置、個々の臓器の形状・機能、それに伴う、神経系、循環系等、多くの観点から明らかとなっており、左右・前後の非対称性が正常に実現されることが極めて重要である。申請者は、マウスにおける大動脈弓、肺、胃の左右非対称性を指標として、それらが正常に形成されるために、*Foxj1*と*Inv*の二遺伝子が果たす役割について、遺伝子ノックアウトの手法を用いて詳細な解析を行った。主論文の内容について以下の説明があった。

脊椎動物における左右非対称な内部臓器の形成は、発生初期のノード周辺での*Nodal*遺伝子の片側的な発現に起因する。マウスではこの左右軸の対称性が破られる最初のステップとして、ノード腹側の一次繊毛が起こす左向きのノード流の重要性が、一次繊毛の形成不全、あるいはその運動性欠如を伴う変異体の研究から強く示唆されている。一次繊毛に局在する*Inv*タンパクの遺伝子にホモに挿入変異のある*inv*ホモ変異マウスは、ほぼ100%が内臓逆位を示すこと、一方で、forkheadドメインを持つ転写因子で、気道上皮などの繊毛上皮細胞に発現する*Foxj1*遺伝子をノックアウトした*Foxj1*ノックアウトマウスは、およそ半数が内臓逆位を示すことが報告された。これらの二つの変異マウスは、ともにノードに一次繊毛を有していることが知られている。*Foxj1*は最近、ノード腹側層において発現を示す報告がなされたが、その欠損マウスにおける一次繊毛の運動性については不明である。一方、*inv*ホモ変異マウスでは一次繊毛

は野生型マウスと同じ向きに回転するものの、左へのノード流の速度が遅いことが報告されている。本研究では*Foxj1/inv*二重ホモ変異マウスを作成して、各遺伝子型胎仔における内臓の表現型、および*Pitx2*遺伝子の発現について解析を行い、*Foxj1*と*Inv*の左右軸決定における役割について検討した。なお、*Foxj1*^{+/-}ノックアウトマウスはC57BL/6系統、*inv*⁺変異マウスはFVB/N系統の遺伝的背景の下でそれぞれ維持した。この*Foxj1*^{+/-}マウスと*inv*⁺マウスを交配し、*Foxj1/inv*二重ヘテロ変異マウスを作成した。さらにこの二重ヘテロ変異マウスの雌雄を交配して、*Foxj1/inv*二重ホモ変異体を含む各遺伝子型の胎仔を得た。このうち、胎生18.5日の胎仔について大動脈弓、肺、胃の表現型を調べた。また、胎生8.5日の胎仔について、マウス*Pitx2*に対するRNAプローブを用いた全胚包埋*in situ* hybridizationを行い、*Pitx2*遺伝子の発現解析を行った。

二重ヘテロ変異マウス同士の交配の結果、胎生18.5日の胎仔282体を得た。各遺伝子型の個体数は、予測値のおよそ半数の*Foxj1*^{-/-}マウスを除くと、ほぼメンデル則に従っていた。大動脈弓は、*Foxj1*^{-/-}マウスでは全て正常な左向きなのに対して、*inv/inv*マウスでは1:2.5の割合で右向きが多く見られた。二重ホモ変異マウスでは、正逆の比率はほぼ1:1であった。肺は、*Foxj1*^{-/-}マウスでは左右ともに4つの肺葉をもつ右側相同が多く、*inv/inv*マウスでは肺葉数が左右で逆になるものが多数を占めた。二重ホモ変異マウスは、ほぼ全てが右側相同肺を呈した。胃は、*Foxj1*^{-/-}マウス、*inv/inv*マウス、二重ホモ変異マウスのいずれにも正位と逆位が見られ、それぞれの比率は1:1.3、1:1.7、1:1.6で逆位の方が若干多かった。胎生8.5日胚における*Pitx2*の発現は、野生型では左側の側板中胚葉(LPM)に確認されたが、多くの*Foxj1*^{-/-}マウスでは左右ともに欠如しており、また、ほとんどの*inv/inv*マウスでは右側LPMにおいて発現していた。殆どの二重ホモ変異マウスでは左右ともに発現が見られなかった。

上記の結果について以下のような考察がなされた。左右軸異常を示す変異マウスには、一次繊毛を欠くか否かで2つのタイプがある。後者のグループに属し、ともに一次繊毛を持つが、内臓逆位の発生様式において異なった表現型を示す*Foxj1*ノックアウトマウスと*inv*ホモ変異マウスを用いることにより、本研究では両遺伝子の内部臓器の左右決定における役割を明らかにすることが出来た。大動脈弓では二重ホモ変異マウスは、それぞれの遺伝子一方だけのホモ変異マウスの中間の表現型を示した。しかし*Foxj1*^{-/-}マウスは約半数が胎生死したと考えられ、仮に異常な右向きの大動脈弓を持つものが多数死亡していたとすれば、二重ホモ変異マウスの表現型は*Foxj1*^{-/-}マウスと同等かそれに近くなる。肺では*Foxj1*^{-/-}マウスと二重ホモ変異マウスにおいて、右側相同が主に見られた。二重ヘテロ変異マウスの交配によるのではなく、別々に維持している*Foxj1*^{+/-}(C57BL/6系統)と*inv*⁺(FVB/N系統)からそれぞれシングルホモ変異(またはノックアウト)マウスを作成したところ、それらは既報どおりの表現型を示したので、二重ヘテロ変異マウス由来の*Foxj1*^{+/+};*inv/inv*及び*Foxj1*^{-/-};*+/+*の表現型には遺伝的背景の混在が影響していると考えられた。胃を含めたこれら3つの臓器の観察結果から、左右軸の決定過程において、*Foxj1*が*Inv*よりも下流で機能しているか、あるいは同じレベルで働くが*Foxj1*の方がより強い影響力を持つ可能性が考えられる。*Pitx2*の発現が*Foxj1*^{-/-}マウスと二重ホモ変異マウスのLPMで消失していることが見出されたが、これは*Pitx2*ノックアウトマウスの表現型として、右側相同肺と胃の配置の左右ランダム化が報告されていることと一致する結果である。

本研究は、*Foxj1*と*Inv*の両遺伝子が内部臓器の非対称性、左右決定において極めて重要な役割を果たし、さらに*Foxj1*欠損の方が*Inv*欠損より優位であることを示したもので、これらの点を本審査委員会は高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) *Foxj1*^{-/-} ; *inv/inv* 個体が計算上6.25%となることの根拠
- 2) なぜ半数もの *Foxj1*^{-/-} ; *+/+* 個体が死んだと思われるのか
- 3) *Foxj1*^{+/-} ; *inv/inv* や *Foxj1*^{-/-} ; *+/inv* など、一方の遺伝子は変異ホモ、他方補遺伝子はヘテロという個体の表現型はどうであったか。データとして提示していないのはなぜか
- 4) 大動脈の表現型変化に比して静脈には変化はあったのか
- 5) 次の各遺伝子の機能の相互関係について
Inv、*Lrd*、*Foxj1*、*KIF3A*、*KIF3B*、*Polaris*
- 6) ヒトの疾患で 5) の各遺伝子に変異を持つ症例の報告はあるのか
- 7) 用いたマウスの遺伝的バックグラウンドの違いの詳細は何か
- 8) 単に単繊毛の回転だけでは右→左の“flow”が生じることを説明できないが、これについてのデータや解釈はあるのか
- 9) 内部臓器の配置の左右対称性に加えて、各臓器個々を見たときの左右対称性(例えば心臓の左右心房・心室など)は申請者の研究した遺伝子とはどういう関係にあると考えられるのか
- 10) 研究に用いた総個体数は統計学的に議論するにはまだ少ないのではないか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	蓑	島	伸	生	
	副査	大	関	武	彦	副査 梶 村 春 彦