

Foxc2CreERT2 knock-in mice mark stage-specific Foxc2-expressing cells during mouse organogenesis

| | |
|-----|---|
| 著者 | Amin Mohammed Badrul |
| 発行年 | 2017-03-13 |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/3197 |

doi: 10.1111/cga.12198

博士(医学) Amin Mohammed Badrul

論文題目

Foxc2^{CreERT2} knock-in mice mark stage-specific *Foxc2*-expressing cells during mouse organogenesis

(*Foxc2*^{CreERT2} ノックインマウスは、マウス器官形成期において時期特異的に *Foxc2* 発現細胞を標識する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ウングドヘリックス/フォークヘッドファミリーに属する *Foxc2* 遺伝子は、発生に重要な転写因子である。*Foxc2* 変異マウスは、角膜の神経血管障害、眼球異常、口蓋裂、心室中隔欠損、心筋異常、糸球体嚢胞と近位尿細管異常をもつ腎低形成といった様々な異常を呈し、出生前後に死亡することが報告されている。しかしながら、*Foxc2* 発現細胞やその子孫細胞が、*Foxc2* 変異マウスで見られた組織や器官異常にどのように寄与するのかははっきりしていない。そこで本研究では、*Foxc2* 遺伝子座に *CreERT2* 遺伝子をノックインしたマウスを作製し、*LacZ* レポーターマウスと交配することで、頭蓋冠、眼、心臓血管、腎臓形成過程における、時期特異的な *Foxc2* 発現細胞とその細胞系譜を明らかにすることを目的とした。

[材料ならびに方法]

時期特異的な *Foxc2* の発現解析のために、変異エストロゲン受容体と Cre リコンビナーゼの融合遺伝子である *CreERT2* 遺伝子を、相同組換えにより *Foxc2* の開始コドンの下流に挿入した (*Foxc2*^{CreERT2})。 *CreERT2* 遺伝子断片を含んだターゲティングベクターは胚性幹 (ES) 細胞に電気穿孔法で導入し、サザンブロット解析によって、480 個の ES クローンから *Foxc2*^{CreERT2} 遺伝子を含んだ 5 クローンを選別し、2 クローンを胚盤胞に注入しマウス個体にした。 *Foxc2* 発現細胞を標識するために、核での Cre リコンビナーゼの存在下で DNA 組換えを起こし、組換え後は *LacZ* 遺伝子発現が永続的に認められる *ROSA(R26)* レポーターマウスと交配した。異なった胚発生時期の妊娠マウスに対して、エストロゲン誘導体であるタモキシフェンを投与して Cre リコンビナーゼを核内へ移行させたところ、顎顔面の骨、眼、腎臓と心臓組織で *Foxc2* 発現細胞が *LacZ* 標識されることが確認された。その後、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)とホールマウント X-gal 染色によって、*Foxc2*^{CreERT2} と *ROSA(R26)* の複合ヘテロ接合性変異マウス胚 (*Foxc2*^{CreERT2}; *R26R*) を選別した。組織切片を用いて、*Foxc2* 抗体染色と X-gal 染色も行った。これらの実験は、浜松医科大学の組換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て行われた。

[結果]

作出した *Foxc2*^{CreERT2}; *R26R* マウス胚を用いて、胎生 6.5 から 13.5 日目でタモキシフェンを投与し、24 時間後に染色した結果、各発生段階における *LacZ* の発現は、これまで報告されていた *in situ* ハイブリダイゼーションによる mRNA の発現や、抗体染色による発現パターンの結果と同じであった。

頭蓋冠発生では、胎生 8.5 日目のタモキシフェン投与後、胎生 18.5 日目で染色した胚では、頭部中胚葉由来の上後頭骨と外後頭骨の *Foxc2* を発現した子孫細胞を標識したが、胎生 10.5 日目の投与胚では標識が見られなかった。

眼の発生では、胎生 8.5 から 10.5 日目の投与後の胚では、*Foxc2* を発現した子孫細胞は角膜の間葉に局限して観察された。さらに神経堤細胞を標識できる *Wnt1*^{Cre}; *R26R* の複合ヘテロ接合性変異マウスと比較することによって、標識された細胞は頭部神経堤細胞由来であることが示唆された。

心臓発生では、胎生 6.5 から 12.5 日目の投与で *Foxc2* を発現した子孫細胞は大動脈と肺動脈の幹と弁、心房を裏打ちする内皮細胞層、心内膜、心室心房の心内膜隆起に観察できた。心内膜隆起の細胞は *Wnt1*^{Cre}; *R26R* と比較することによって、心臓神経堤細胞由来と考えられた。

腎臓発生では、胎生 6.5 日目の投与で、胎生 14.5 日目胚の中間中胚葉由来の糸球体上皮細胞に観察できたことから、糸球体形成を維持する *Foxc2* を発現した子孫由来の腎臓の前駆細胞は初期発生の中に生じることが示された。

[考察]

Foxc2^{CreERT2} ノックインマウスを用いた今回の研究により、胚発生の様々な時期における *Foxc2* の発現パターンと *Foxc2* を発現した細胞系譜が明らかになった。

発生初期の胎生 8.5 日目のタモキシフェン投与の結果、頭部中胚葉由来の上後頭骨と、中間中胚葉由来の腎臓の糸球体上皮細胞が標識された。この観察結果は、*Foxc2* 変異マウスの表現型として現れる頭蓋冠異常と腎臓欠損を説明できる可能性がある。

Wnt1^{Cre}; *R26R* 胚における *LacZ* と *Foxc2* の免疫染色によって、胎生 10.5 日目の心臓流出路、胎生 14.5 日目の心内膜隆起での *Foxc2* 発現細胞の一部は、神経堤細胞由来であることが明らかになった。心臓神経堤細胞は、心臓流出路を移動して最終的に心室中隔を形成すると考えられていることから、発生初期の心臓神経堤細胞由来の *Foxc2* 発現細胞が心臓流出路中隔と心室中隔の形成に重要であると考えられた。これを裏付ける結果として、心臓神経堤細胞特異的に *Foxc2* 遺伝子欠損を示す *Wnt1*^{Cre} と *Foxc2*^{flx/flx} 複合体変異マウス胚では、心室中隔欠損を示すデータがある。

[結論]

胎生初期の胎生 6~8 日目における中胚葉由来あるいは神経堤細胞由来の *Foxc2* を発現する細胞が、*Foxc2* 変異マウスで異常の見られた頭蓋冠、眼、心臓血管、腎臓組織の形成に重要な役割を担うことが示唆された。