



The mouse forkhead gene Foxp2 plays distinct roles in the lung and the gut

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: 楊, 志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/376

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 508号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	楊 志		
論文題目	The mouse forkhead gene Foxp2 plays distinct roles in the lung and the gut (マウスフォークヘッド遺伝子 Foxp2 は肺と腸において異なった役割をしている)		

博士(医学) 楊 志

論文題目

The mouse forkhead gene *Foxp2* plays distinct roles in the lung and the gut

(マウスフォークヘッド遺伝子*Foxp2*は肺と腸において異なった役割をしている)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ヒト言語遺伝子*Foxp2*は3世代にわたる遺伝的に重度の会話言語と文法の使い方に異常を示す家系の原因遺伝子としてポジショナルクローニングされた。*Foxp2*は大脳皮質、基底核、小脳など多くの脳の部位に発現しており、言語機能を担っていることが推定される。しかし、言語をもたないとされるチンパンジーやマウスにも相同遺伝子*Foxp2*が見出されている。興味深いことに、*Foxp2*は脳だけでなく、肺や腸管にも発現しており、肺や腸管にもその役割があることが推定されている。そこで、申請者はマウスにおいて、発生期の肺形成や腸管形成における*Foxp2*の役割を明らかにするために、モノクロナル抗マウス*Foxp2*抗体を作製した。この抗体を用いて、胎児期の肺形成および腸管形成における発現パターンを詳細に検討した。また、当研究室では、以前に肺と腸管に発現する*Foxf2*遺伝子のノックアウトマウスを作製した経緯もあり、肺と腸管における*Foxp2*と*Foxf2*の発現領域の相互関係を観察した。そして、*Foxf2*ノックアウトマウスにおける*Foxp2*の発現についても検討した。

[材料ならびに方法]

- 1) ラット抗マウス*Foxp2*モノクロナル抗体の作製：マウス肺RNAからRT-PCRで*Foxp2* cDNAを合成し、その一部を用いてグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合*Foxp2*タンパク質を作った。融合タンパク質をラットの足に免疫注射し、ハイブリドーマ細胞を作って、抗マウス*Foxp2*モノクロナル抗体を得た。
- 2) 免疫組織化学染色：ICRマウスの雄と雌を交配させ、産褥を見られた日をE0.5とした。E9.5からE18.5まで各段階の胚と成年マウスの肺と腸をパラフィン切片にした。ラット抗マウス*Foxp2*モノクロナル抗体を一次抗体とし、HRP標識ウサギ抗ラットIgG抗体を二次抗体とし、3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB)を発色基質として免疫組織抗体法で*Foxp2*の発現を調べた。腸の筋層の確認にはアルカリホスファターゼ(ALP)標識抗 α -平滑筋アクチン抗体を一次抗体とし、BCIP/NBTを発色基質とした。
- 3) *In situ*ハイブリダイゼーション：*Foxf2*プローブは、T7 RNAポリメラーゼと ^{35}S [UTP]を用いて作製し、常法に従い、コダックNTB-2感光乳剤で現像した。
- 4) ルシフェラーゼアッセイ：*CC10*プロモーター(PCRにて作製)、*SPC*プロモーター(Jeffrey A. Whitsett 博士から提供)をレポーターpGL4.10につないで、*CC10-luc2*と*SPC-luc2*を作製した。ヒトクララ細胞由来の肺腺癌細胞H441とヒト肺胞上皮細胞由来のA549細胞にFuGENE HDを用いて遺伝子導入を行った。

[結果]

- 1) 胎生10.5日の気管支上皮に抗*Foxp2*抗体に対する反応性を認めた。発生が進むにつれ、肺は分枝を繰り返すが、*Foxp2*陽性細胞は伸長する気管支の遠位部に強い発現があり、近位部は弱い発現があるか、

あるいは発現が消失する。肺胞形成期になると、細気管支上皮の発現もなくなり、Ⅱ型肺胞上皮細胞がFoxp2陽性となる。

- 2) Foxp2が気管支上皮に発現せず、Ⅱ型肺胞細胞に発現していることから、転写因子であるFoxp2のクラ細胞マーカーCC10遺伝子、Ⅱ型肺胞細胞のマーカーであるSPC遺伝子に対する効果を検討した結果、Foxp2はH441細胞においてCC10-luc2の転写活性を抑制するが、A549細胞においてSPC-luc2の転写を活性化した。
- 3) 胎生10.5日の腸管から抗Foxp2抗体反応性が認められた。発生が進むにつれ、発現は腸管の平滑筋層に発現するようになった。連続切片をつくり一方は抗Foxp2抗体で、一方を抗平滑筋アクチン抗体で染色すると同じパターンを示した。
- 4) 胎児期の肺および腸管の連続切片の一方を抗Foxp2抗体で、もう一方をFoxf2 cRNAプローブでin situ ハイブリダイゼーションした。その結果、肺は補完的な発現をとり、腸管は内側平滑筋層がオーバーラップする発現関係を示した。また、Foxf2ノックアウトマウスでのFoxp2の発現も検討したが、野生型マウスの発現と同じであった。

[考察]

Foxp2はマウス肺形成では遠位の上皮に発現し、最終的にⅡ型肺胞細胞に発現する。CC10-luc2を遺伝子導入した場合、H441細胞では高値を、A549細胞では低値を示した。これは、H441細胞にはTTF-1/NKX2.1という正に働く転写因子が存在するためであり、Foxp2を強制発現するとTTF-1/NKX2.1の作用をFoxp2が阻害すると考えられる。一方、A549細胞にはTTF-1/NKX2.1のような因子はないので、CC10-luc2はずっと低値のままである。そして、SPC-luc2の場合、H441細胞でもA549細胞でも低値であるが、Foxp2強制発現によりA549細胞でだけSPC-luc2が活性化される。この細胞には、Foxp2とともにSPC遺伝子の活性化に働く別の因子があると考えられる。

Foxp2は肺では上皮、腸管では平滑筋層に発現していた。また、Foxf2は肺では間質に、腸管では上皮細胞下の間質と内側の平滑筋層に発現していた。このことは、Foxp2は肺と腸管において異なる役割を果たしていることが推測される。

[結論]

- 1) マウス肺形成と腸管形成におけるFoxp2の発現を観察した。いずれも、胎生10.5日から発現し始めるが、肺では気管支上皮からⅡ型肺胞上皮へ、腸管では平滑筋層に発現した。
- 2) Foxp2はH441細胞にてCC10遺伝子プロモーターを転写抑制するが、A549細胞においてSPC遺伝子プロモーターを活性化した。
- 3) Foxp2とFoxf2の発現ドメインは、肺では補完的であったが、腸管では一部重なっていた。

論文審査の結果の要旨

[はじめに]

ヒト言語遺伝子FOXP2は3世代にわたる遺伝的に重度の会話言語と文法の使い方に異常を示す家系の原因遺伝子としてポジショナルクローニングされた。FOXP2は脳皮質、基底核、小脳など多くの脳の部位に発現しており、言語機能を担っていることが推定される。しかし、言語をもたないとされるチンパ

ンジーやマウスにも相同遺伝子*Foxp2*が見出されている。興味深いことに、*Foxp2*は脳だけでなく、肺や腸管にも発現しており、肺や腸管にもその役割があることが推定されている。申請者は今回、マウスにおいて、発生期の肺形成や腸管形成における*Foxp2*の役割を明らかにするために、モノクロナル抗マウス*Foxp2*抗体を作製した。この抗体を用いて、胎児期の肺形成および腸管形成における発現パターンを詳細に検討した。また、当研究室では、以前に肺と腸管に発現する*Foxf2*遺伝子のノックアウトマウスを作製した経緯もあり、肺と腸管における*Foxp2*と*Foxf2*の発現領域の相互関係を観察した。そして、*Foxf2*ノックアウトマウスにおける*Foxp2*の発現についても検討した。

[材料ならびに方法]

- 1) ラット抗マウス*Foxp2*モノクロナル抗体の作製：マウス肺RNAからRT-PCRで*Foxp2* cDNAを合成し、その一部を用いてグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合*Foxp2*タンパク質を作った。融合タンパク質をラットの足に免疫注射し、ハイブリドーマ細胞を作って、抗マウス*Foxp2*モノクロナル抗体を得た。
- 2) 免疫組織化学染色：ICRマウスの雄と雌を交配させ、膣栓を見られた日をE0.5とした。E9.5からE18.5まで各段階の胚と成年マウスの肺と腸をパラフィン切片にした。ラット抗マウス*Foxp2*モノクロナル抗体を一次抗体とし、HRP標識ウサギ抗ラットIgG抗体を二次抗体とし、3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB)を発色基質として免疫組織抗体法で*Foxp2*の発現を調べた。腸の筋層の確認にはアルカリホスファターゼ(ALP)標識抗 α -平滑筋アクチン抗体を一次抗体とし、BCIP/NBTを発色基質とした。
- 3) *In situ* hybridization：*Foxf2*プローブは、T7 RNAポリメラーゼと³⁵S [UTP]を用いて作製し、常法に従い、コダックNTB-2感光乳剤で現像した。
- 4) ルシフェラーゼアッセイ：CC10プロモーター(PCRにて作製)、SPCプロモーター(Jeffrey A. Whitsett 博士から提供)をレポーターpGL4.10につないで、*CC10-luc2*と*SPC-luc2*を作製した。ヒトクララ細胞由来のH441細胞とヒト肺胞上皮細胞由来の肺腺癌A549細胞にFuGENE HDを用いて遺伝子導入を行った。

[結果]

- 1) 胎生10.5日の気管支上皮に*Foxp2*抗体に対する反応性を認めた。発生が進むにつれ、肺は分枝を繰り返すが、*Foxp2*陽性細胞は伸長する気管支の遠位部に強い発現がみられ、一方、近位部では弱い発現あるいは発現の消失をみとめた。肺胞形成期になると、細気管支上皮における発現もなくなり、II型肺胞上皮細胞が*Foxp2*陽性となった。
- 2) 転写因子である*Foxp2*は、クララ細胞マーカー*CC10*遺伝子、II型肺胞細胞のマーカーである*SPC*遺伝子に対し、H441細胞では*CC10-luc2*の転写活性を抑制し、A549細胞においては*SPC-luc2*の転写を活性化させた。
- 3) 胎生10.5日の腸管から抗*Foxp2*抗体反応性が認められ、発生が進むにつれ、発現が腸管の平滑筋層であることが明らかになり、抗平滑筋抗体染色でも確認した。
- 4) 胎児期の肺および腸管の連続切片の一方を抗*Foxp2*抗体で、もう一方を*Foxf2* cRNAプローブで*in situ* hybridizationした。その結果、肺では補完的な発現をとり、腸管は重複する発現関係を示した。また、*Foxf2*ノックアウトマウスでの*Foxp2*の発現は野生型マウスの発現と同じであった。

[考察]

これらの結果について申請者は以下のように考察した。*CC10-luc2*を遺伝子導入した場合、*H441*細胞では高値を、*A549*細胞では低値を示したが、これは、*H441*細胞には*TTF-1/NKX2.1*という正に働く転写因子が存在するためであり、*Foxp2*を強制発現すると*TTF-1/NKX2.1*の作用を*Foxp2*が阻害すると考えられる。一方、*A549*細胞には*TTF-1/NKX2.1*のような因子はないので、*CC10-luc2*はずっと低値のままである。そして、*SPC-luc2*の場合、*H441*細胞でも*A549*細胞でも低値であるが、*Foxp2*強制発現により*A549*細胞でだけ*SPC-luc2*が活性化される。この細胞には、*Foxp2*とともに*SPC*遺伝子の活性化に働く別の因子があると考えられる。*Foxp2*、*Foxf2*の、肺と腸管での発現パターンの異同からも、*Foxp2*は肺と腸管において異なる役割を果たしていることが推測される。

[結論]

申請者の結論は以下のものである。

- 1) マウス肺形成と腸管形成における*Foxp2*の発現は、胎生10.5日から発現し始め肺では気管支上皮からII型肺胞上皮へ、腸管では平滑筋層に発現する。
- 2) *Foxp2*は*H441*細胞にて*CC10*遺伝子プロモーターを転写抑制するが、*A549*細胞において*SPC*遺伝子プロモーターを活性化する。
- 3) *Foxp2*蛋白と*Foxf2* メッセージの発現部位は、肺では補完的であったが、腸管では重複していた。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) 抗FOXP2 抗体はどのようにして作製したか
- 2) 市販されている抗FOXP2抗体の比較はしたか
- 3) 実験につかった肺組織のRNAはadultのものをつかったのか
- 4) 細胞株H441の性格はどのようなものか
- 5) 導入時のDNA量の調整はどのようにしたか
- 6) 細胞へ導入する実験は何回やったか
- 7) *CC10*と*SPC*のプロモーター部位の違いはどのようなものか
- 8) どうして*Foxf2*のノックアウトマウスを使ったのか
- 9) *A549*細胞では*TTF1*が発現していないことを確認したか
- 10) FOXP2の結合部位というのは知られているか

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	梶 村 春 彦	
	副査	上 田 啓 次	副査 千 田 金 吾