

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年10月2日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591400

研究課題名（和文） 大血管発生に關与するハプロ不全遺伝子とその表現型に關与する因子

研究課題名（英文） A haploinsufficient gene and the modification factors - Spectrum changing of cardiovascular anomalies in the *Foxc2* mutant mouse by genetic backgrounds and maternal factors.

研究代表者

森島 正恵（MORISHIMA MASAE）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00241068

研究成果の概要（和文）：

心大血管形態形成に關与するハプロ不全遺伝子の一つである *Foxc2* ノックアウトマウスを用いて、遺伝子欠失個体の表現型を左右する因子について検討した。本遺伝子はバックグラウンドとするマウス胎仔の系統により、その心血管奇形の表現型が異なることが判明した。また、器官形成期のマウス胚解析から、関連遺伝子の発現以外の詳細な解析の必要性があると考えられ、さらに、母体の要因により奇形の重篤度が悪化する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Foxc2* is one of the haploinsufficient gene of which mutant causes cardiovascular anomalies. This project was done to analyze the cardiovascular anomalies in the *Foxc2* mutant mouse from different background strains and the modification factors. The phenotype of the cardiovascular anomaly was variational depending on the genetic background. Analysis of the mutant embryos indicated that not only the cascade genes of *Foxc2* but also the others, such as maternal hyperlipidemia, could affect to make the genetic anomaly severer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：循環器発生、遺伝子疾患、ハプロ不全遺伝子、microdeletion 症候群

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分子生物学・発生工学等の進歩により、心大血管形成のメカニズムの解明が急速に進んだ。心血管異常を伴う症候群の疾患候補遺伝子には *TBX1*, *NKX2.5*, *GATA4* 等の転写

因子があり、FGF ファミリーなどの成長因子とともに発生過程における複雑な遺伝子ネットワークを形成する。これらの遺伝子はハプロ不全 Haploinsufficiency のものがほとんどで、即ち野生型（正常）の表現型形成に相

同染色体双方の活性化を必要とする特徴がある。これらハプロ不全を示す遺伝子改変マウスを用いた解析では、使用するマウスの系統によりヘテロ個体における表現型の異常発生率や、ホモ個体（遺伝子欠損）における致死率に差があることが以前より報告されていた。また、これらの表現型は実際には上流遺伝子や下流遺伝子の多型などにより機能亢進（または機能低下）が、疾患候補遺伝子の変異と組み合わせさせて多様性を生み出していると考えられている。しかしながら、発現ネットワーク上の遺伝子多型やその他の付加的因子によりどのように同一の疾患候補遺伝子が心疾患の多様性に至るかを直接提示した報告は未だ限られていた。

*FOXC2* (*MFH-1*) は Lymphedema-Distichiasis 症候群の原因候補遺伝子の一つであり、この遺伝子のノックアウトマウス（以下 KO マウス）では、ホモ欠失個体（以下 *Foxc2*<sup>-/-</sup>）は胎性末期まで生存する個体は少数のみであることが報告されていた。Vandervilt 大学（米国）で作成された系と、それとは別個に日本において作成された *Foxc2* KO マウスと胎仔の心血管系異常に差があることは以前から作成者間で議論されていたが、今回、前者の系の分与を受けるに当たりマウスの系統を確認したところ、前者が 129 x Black Swiss に対して、後者は C57BL/6 系交雑種であった。このため、前者（Original-*Foxc2* KO）を C57BL/6（B6・F-*Foxc2*）と ICR（ICR・F-*Foxc2*）の 2 系統にそれぞれ戻し交配した系を作成し、胎仔を調べたところ ICR・F の系で心大血管系奇形の程度が軽度であることが判明した。この結果を踏まえ、遺伝的バックグラウンドが異なる系における心大血管の相違から、*Foxc2* 遺伝子に関連する下流遺伝子の発現動態および修飾因子を見つけるべく構想を練るに至った。

## 2. 研究の目的

予備の結果から、ハプロ不全を示す遺伝子（本プロジェクトでは *Foxc2*）は、同一の遺伝子異常による欠損において、遺伝的バックグラウンドが異なると表現型が著しく異なる可能性が示唆されていた。そこで、ミュータントラインをさらに戻し交配し継代、

(1) 心大血管奇形の表現型の相違、それら相互間の特徴とそのスペクトラムについて

(2) 器官形成期の鰓弓動脈などのリモデリング過程における異常部位の特定

(3) (2) に関与する心血管形成期における細胞群の特定

(4) 発生過程における下流遺伝子の発現動態の相違について考察

さらに、高脂肪食を給餌した雌ヘテロ個体を用いて、

(5) 母胎環境が胎仔の心大血管奇形の発生に

関与する可能性を検討

上記 (1)~(5) を明らかにすることにより、表現型を左右する因子について検討、候補因子を絞り込むことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 心血管奇形の表現型の検討：前述のように *Foxc2*<sup>-/-</sup> はそのほとんどが器官形成後期に致死となるため、生存した胎仔の心血管奇形の詳細が不明であった。また、KO マウスにおいてはしばしば繁殖適齢期後半になるほど胎齡致死の傾向があることが研究者間で知られていることから、若い個体を用いて胎齡 17-18 日の胎仔を採集し、1/2 カルノフスキーによる固定処理後、実体顕微鏡を用いて形態学的解析を行った。

(2) Ink injection 法による鰓弓動脈のパターン解析：胎齡 10.5 日胚の鰓弓動脈内にインデアンインクを注入し、固定透徹後、鰓弓動脈のパターンの解析を行った。

(3) 組織学的手法を用いた系統差の解析：定法に従い一般染色および免疫染色により、器官形成期マウス胚の解析を行った。胎齡 10.5 日胚の連続パラフィン切片を作成、ヘマトキシリン-エオジン染色標本作製し、鰓弓の形態を解析した。また、*Foxc2*<sup>-/-</sup> 胎仔ではどの系統においても全身性の浮腫が認められるため、リンパ管の系統差について、胎齡 15-16 日胎仔の矢状断切片標本を用い、リンパ管マーカーである LYVE-1 および Podoplanin の免疫染色を行い、皮下リンパ管を中心とする形態を解析した。

(4) 鰓弓の分化に関与する遺伝子の発現動態：胎齡 10.5 日胚の鰓弓部位を採集、RNA を抽出し、鰓弓動脈のリモデリングおよび *Foxc2* 遺伝子と複合的に発現することがわかっている *Foxc1* と、鰓弓動脈の形成に係る *Repply3* の発現量について RT-PCR で解析した。

(5) 心大血管奇形の重篤度と母胎環境の影響：高脂肪食（ウェスタン・ダイエット）を給餌した雌 ICR・F-*Foxc2*<sup>+/-</sup> マウスを用いて、ヘテロ個体間の交配を行い胎齡 17-18 日胎仔の心血管奇形の形態解析を (1) と同様に行った。

なお、実験に用いた胚仔および胎仔は、全てサンプリング時に採集した羊膜または尾の一部から DNA を抽出、PCR により Genotyping を行った。

## 4. 研究成果

(1) 心大血管異常の形態学的解析：戻し交配した B6・F と ICR・F それぞれのライン、および分与された 129xSwiss Black 交雑のオリジナル系（Original-*Foxc2*）の *Foxc2*<sup>-/-</sup> 胎仔の

心大血管奇形を解析したところ、下記の表の結果を得た。即ち、Original-*Foxc2*<sup>-/-</sup>においては動脈管遺残(大動脈-肺動脈中隔が欠損)もしくは大動脈離断が主だが、一方、B6-*Foxc2*<sup>-/-</sup>系においては大動脈離断もしくは大動脈弓の低形成と大血管の起始異常が主に認められた。ところが、ICR-*Foxc2*<sup>-/-</sup>胎仔においては、軽度の大動脈弓低形成が主な心血管奇形であることが明らかとなった。

*Cardiovascular Anomalies in Foxc2 null fetuses*

Genetic Background	Number of Fetuses	Anomalies
Original	6	TAC with hypoplastic Ao and VSD: 3 DORV, IAA (or hypoplastic Ao) and VSD: 3
B6-F	6	TAC with conal VSD: 1 IAA (B) with conal VSD: 1 IAA (C) with conal VSD: 1 TGA with conal VSD and hypoplastic right AA: 1 DORV, hypoplastic AA and Common AV canal: 1 Hypoplastic AA: 1
ICR-F	11	AS and Hypoplastic Ao: 9 Conal VSD: 1 Left Hepatic vein: 1

TAC; truncus arteriosus communis, Ao; aorta, VSD; ventricular septal defect, DORV; double outlet right ventricles, IAA; interrupted aortic arch, TGA; transposition of the great arteries, AA; aortic arch, AV canal; atrioventricular canal, AS; aortic stenosis

すなわち、大動脈弓の低形成はOriginal系とB6系で同様に認められるが、その程度および大血管中隔形成はOriginal系で重篤度が高かった。一方、ICR系ではこれらの異常がほとんど認められず、軽度の大動脈低形成が主な異常となっていた。以下に、まとめの表を示す。

	Aortic Arch Hypoplasia	A-P septum Hypoplasia	Defects of the RV component
Original- <i>Foxc2</i> <sup>-/-</sup>	+++ ~ +	+++ ~ +	Hypoplasia or aplasia of the distal conal septum
B6-F- <i>Foxc2</i> <sup>-/-</sup>	+++ ~ +	+	Defects of the conal component + ~ -
ICR-F- <i>Foxc2</i> <sup>-/-</sup>	+	-	Rare

この結果より、*Foxc2* 遺伝子により引き起こされる心血管奇形は、遺伝的背景により表現型の重篤度が異なることが明らかとなった。

*Anomalies of the pharyngeal arch (E10.5 embryos)*

	Persistent 2 <sup>nd</sup> PAA	Hypoplastic 4 <sup>th</sup> PAA	Deformed 4 <sup>th</sup> PP
Original- <i>Foxc2</i> <sup>-/-</sup>	+	+	+
B6-F- <i>Foxc2</i> <sup>-/-</sup>	+	+	+?
ICR-F- <i>Foxc2</i> <sup>-/-</sup>	±?	-?	-

(2) 器官形成期ミュータントマウス胚を用いた解析：大血管系の原基である鰓弓が形成される胎齢 10.5 日齢マウス胚のインク・インジェクションによる鰓弓動脈のパターン解析では、Original系およびB6-F系の*Foxc2*<sup>-/-</sup>胚仔において、第2鰓弓動脈消失の遅延、第4鰓弓の低形成が認められ、Original系においては第4鰓弓の様々な変形、さらに低形成ながら第5鰓弓動脈の存在する個体も見いだした。これに対し、ICR-F-*Foxc2*<sup>-/-</sup>胚仔ではこれらの異常が認められなかった。以下に、結果の総括を示す。

さらに、薄切連続標本を用いた解析から、Original-*Foxc2*<sup>-/-</sup>胚においては、鰓弓動脈のみならず第4咽頭嚢の拡張が顕著であることが判明した。一方、鰓弓部位における*Foxc1*と*Replay3*のRT-PCRによる発現量の解析では、Original系とB6-F系の*Foxc2*<sup>-/-</sup>胚仔では減少していたが*Foxc2*<sup>+/-</sup>胚仔との差は明らかでなく、ICR-F-*Foxc2*<sup>-/-</sup>胚仔では変化を認めなかった。これらの結果は、*Foxc2*欠失による大血管の異常が、従来報告されている鰓弓動脈のリモデリングに関与する遺伝子のみに限らず、第4鰓弓以降の形態形成における様々な要因における詳細な解析の必要性を示唆している。

(3) リンパ管の系統差：Original系においてpodoplaninの染色性がB6-FおよびICR-Fと比較し弱い傾向が認められた。また、originalおよびICR-Fでは、wild type (以下、WT)胎仔で皮下のpodoplanin陽性のcompact layerが存在し、*Foxc2*<sup>+/-</sup>においても明瞭に認めることができた。一方、B6-Fでは、WTおよび*Foxc2*<sup>+/-</sup>胎仔においてもpodoplaninのcompact layerが不明瞭で、皮下全体にわたり陽性を呈した。*Foxc2*ミュータント胎仔では、どの系統においても皮下の組織構造に乱れが認められた。系統差は奇形の表現型のみならず、まず、その系統の組織解剖学的特徴を吟味する必要があると考えられる。

(4) 母体環境と遺伝子変異の解析：心血管奇形の軽度のICR-F-*Foxc2*KO系を用いた。高脂肪食を給餌された*Foxc2*<sup>+/-</sup>母獣より得た*Foxc2*<sup>-/-</sup>胎仔では、動脈管遺残や大動脈弓離断などの重度の心大血管奇形が認められた。この結果から、母体の食性の偏りが心血管異常の原因遺伝子の表現型を重篤化する可能性が示唆された。

(1)~(4)までの解析結果より、*Foxc2*遺伝子の欠失により発現する心血管奇形は、遺伝的および母体の要因により表現型の重症度が異なることが明らかとなった。さらに、心大血管奇形のスペクトラムから、鰓弓動脈のリモデリングにおける神経堤細胞の遊走性のみならず、鰓弓の形態形成に関与する遺伝子の検討をそれぞれのマウスの系統において行う必要性が示唆された。今後、これらの項目についてさらに解析を進め、心血管系の発生に関与するハプロ不全の遺伝子の作用に影響を与える因子を具体的に絞り込み、修飾因子を明らかにしたい。これにより、臨床医学における遺伝子変異に起因する心血管奇形の軽度化と、そのリスクの軽減化への基礎を築くことを最終目標として考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. 森島正恵, 清水一彦, 久米努, 江崎太一, *Foxc2* 欠失マウス胎仔におけるリンパ管の形態形成, *リンパ学*, 35 巻, 掲載確定, 査読無.
2. Takashi Okubo, Akinori Kawamura, Jun Takahashi, Hisato Yagi, Masae Morishima, Rumiko Matsuoka, Shinji Takada, Reply3, a *Tbx1* repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice. *Development* 138, 229-348, 2011, 査読有.

[学会発表] (計6件)

1. Masae Morishima, Kazuhiko Shimizu, Shun-ichi Morikawa, Tsutomu Kume, Toshio Nakanishi, Taichi Ezki, Pharyngeal Arch Anomalies in *Foxc2* Null Mouse Embryos. Weinstein Cardiovascular Development Conference, Cincinnati, OH, USA, May 5, 2011.
2. 森島正恵, 清水一彦, 久米努, 江崎太一, *Foxc2* 欠失マウス胎仔におけるリンパ管の形態形成, 第35回日本リンパ学会総会シンポジウム, 2011.5.3, 東京.
3. 森島正恵, 江崎太一, *Foxc2* 欠失マウスにおける鰓弓異常の形態学的特徴, 第88回日本生理学会大会第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2011.3.29, 横浜.
4. Masae Morishima, Hisato Yagi, Tsutomu Kume, Rumiko Matsuoka, The genetic background and maternal intake of fat diet affect the risk of having offspring with congenital heart disease. International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences Symposium, 2010.2.8, Tokyo.
5. 森島正恵, 八木寿人, 久米努, 松岡留美子, *Foxc2* 欠損マウスにおける心血管奇形の系統差, 第8回心臓血管発生研究会, 2009.7.25, 郡山.
6. Masae Morishima, Hisato Yagi, Tsutomu Kume, Rumiko Matsuoka, Spectrum of the Cardiovascular Anomalies and the Background Strain in the *Foxc2* Deficient Mouse. Weinstein Cardiovascular Development Conference, San Francisco, USA, 2009.5.8.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島 正恵 (MORISHIMA MASAE)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00241068