

## 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 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22590176  
 研究課題名（和文） 脾臓形成を制御する遺伝子ネットワークの同定とその作用機序  
 研究課題名（英文） Identification of gene networks controlling spleen organogenesis  
 研究代表者  
 勝 賢二郎（KATSU KENJIRO）  
 熊本大学・発生医学研究所・助教  
 研究者番号：30363526

## 研究成果の概要（和文）：

脾臓は、免疫防御に加えて、造血・血球の濾過・貯蔵機能を併せ持つ器官である。我々は脾臓形成の解明を目指し、ニワトリ胚の脾臓原基における転写制御因子の発現解析を行った。その結果、脾臓原基の中皮または内部の細胞群により強い発現を示すものがあるなど、時間・空間的な制御を示唆する結果を得た。さらに、Fgf16 及び FGF 受容体 1、2 が、それぞれ脾臓原基の中皮と内部の細胞群に発現することを見いだした。以上の結果より、Fgf16 から FGF 受容体 1、2 を介したシグナルが、脾臓原基における転写制御因子の発現を制御するモデルを提唱した。

## 研究成果の概要（英文）：

The vertebrate spleen has important functions in immunity and haematopoiesis. We studied early spleen development using chicken embryo as a model animal. Gene expression patterns of seven transcription factors were examined by in situ hybridization. We found that expression of these transcription factors are temporally and spatially regulated during spleen development. We also found that Fgf16, Fgf receptor-1, and -2 were expressed in the spleen primordium. We proposed a model that FGF16-FGFR1/2 signaling controls expressions of transcription factors during spleen development.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：解剖学、発生・分化、臓器形成、脾臓

## 1. 研究開始当初の背景

脾臓は免疫の場である二次リンパ性器官として知られている（図 1）。その役割は、

免疫防御に加えて、造血・血球の濾過・貯蔵機能も併せ持つユニークな器官である。脾臓の形成は、背側胃間膜において、

背側脾臓原基に隣接した領域の間充織が凝集することから始まる (図 1 A)。その後、内部に血管網を発達させつつ脾臓間充織と分離し、胃間膜より膨出・独立する。ヒトの脾臓は、上腹部の左外側に位置する (図 1 B)。脾臓の表面は被膜で覆われ、内部は被膜から延長した脾柱、白脾髄、赤脾髄から構成される。白脾髄は脾柱から入り込んだ脾動脈の周囲を T 細胞・B 細胞・抗原提示細胞などが取り囲み、免疫の場を提供している。赤脾髄は内皮細胞に裏打ちされた非連続性の血管腔である脾洞が張り巡らされ、損傷を受けた赤血球や血液中の異物を濾過し、また赤血球の貯蔵の場となっている (図 1 C)。先天性奇形である無脾症・多脾症は、臓器の左右非対称性の障害に付随した症例として報告される。ヒト胎生期では造血の場であり、脾臓摘出により免疫力低下を生じることがある。また虚血性心筋疾患時には、損傷修復のために、貯蔵する単球を大量に放出する (Swirski *et al.*, Science 2009) など、生命の維持に重要な働きを持つ臓器である。

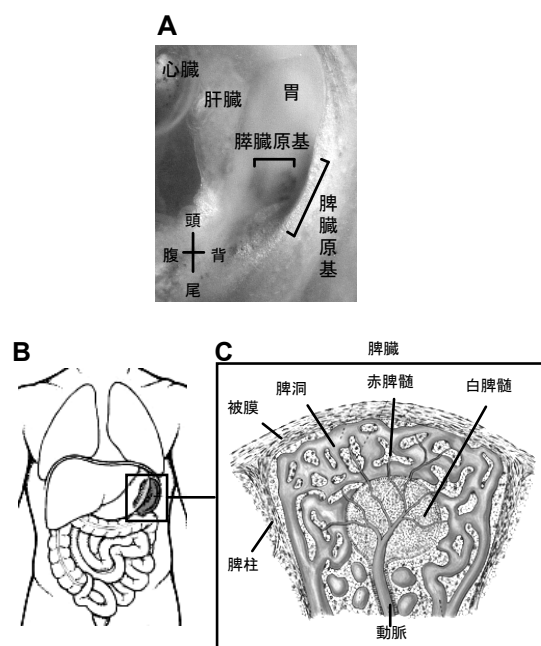


図 1. 脾臓の位置と脾臓組織の構造を表す模式図。

(A) 孵卵 4 日ニワトリ胚の脾臓原基。脾臓は背側脾臓原基に隣接する間充織に形成される。(B) ヒトの脾臓は上腹部の左外側に位置する。(C) 白脾髄は免疫機能を持つ。赤脾髄には脾洞が発達しており、赤血球の濾過や貯蔵の機能を持つ。

脾臓発生に着目した研究は主にマウスを用いてなされているが、まだ少ないのが現状である。脾臓の形成異常を示すノックアウトマウスが数例報告されており、脾臓発生に必要とされる遺伝子として Hox11、Nkx3.2 などの転写調節因子が挙げられている (Roberts *et al.*, Nature 1994; Lu *et al.*, PNAS 2000)。しかしながら、これらから得られる情報は極めて断片的であり、未解決の問題が多く残されている。これには、1) どの転写調節因子やシグナル因子が脾臓特異的な遺伝子プログラムを活性化するのか? 2) 脾臓特異的な遺伝子プログラムは、どのような階層構造から構成されるのか? 3) 血管形成機構との関連、4) 臓器の左右非対称性を決定する機構との関連、などが挙げられる。

## 2. 研究の目的

申請者らは実験手法の多様性、胚培養の簡便性から、ニワトリ胚を対象として研究を行っている。ニワトリ胚を用いた脾臓発生の分子生物学的な研究は、全く行われていないと断言していい状態である。本申請に関連した予備データとしては、肝臓発生における胆管形成と FGF シグナルの関連を調べた研究 (Yanai, Katsu *et al.*, Dev. Dyn. 2008) を進める過程で、脾臓形成予定域に FGF レセプター 1、2 (FGFR1、2) が強く発現することを発見し、脾臓発生の初期段階で FGF シグナルが働くことが予想された。現時点で脾臓発生と FGF シグナルとの関連性を示した報告は無い。このような研究状況が基となり、本研究を立案した。脾臓形成に関わる遺伝子ネットワークの同定と制御機構の解析により、免疫と血球濾

過・貯蔵の2つの機能を持つユニークな臓器である脾臓の発生メカニズムの解明を目指すのが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脾臓に発現する遺伝子の cDNA クローニング

ノックアウトマウスの解析により、脾臓発生への関与が示されている転写因子のニワトリ相同遺伝子を PCR によりクローニングする。これには、Hox11、Nkx2.3、Nkx2.5、Nkx3.2、Barx1、Pbx1、Pitx2、Tcf21、Sox11、WT1 の 10 遺伝子が挙げられる (Brendolan *et al.*, BioEssays 2007)。それぞれの遺伝子に対する PCR プライマーを設計して、孵卵 3～5 日目のニワトリ胚から合成した cDNA を用いて RT-PCR を行い、DNA 断片を増幅した。

#### (2) 脾臓に発現する遺伝子の発現パターン解析

(1) で得られた遺伝子と FGFR1、2 を用いて、孵卵 3～10 日目のニワトリ胚に対して whole-mount および凍結切片での *in situ* hybridization を行った。

#### (3) FGF シグナルは脾臓形成にどのように作用するのか？

脾臓の遺伝子マーカーを用いて、FGF シグナルを活性化または抑制したときの発現変化を調べた。孵卵 2 日 (Stage 12) に達した胚の予定脾臓形成域に、活性型・機能阻害型 FGFR を *in ovo* エレクトロポレーションで導入し、約 60 時間後 (Stage 24) に胚を固定し、脾臓遺伝子マーカーの発現変動を確認した。

#### (6) 脾臓形成を制御する FGF リガンドは何か？

FGF リガンドの候補を探索する。22 種ある FGF リガンドについて、*in situ* hybridization により、空間的な発現パターンを確認した。

#### (4) 転写因子群はどのような遺伝子ネットワークにより脾臓形成を制御するのか？

脾臓の遺伝子マーカーのうち、最も早い発生段階より発現する Nkx3.2 と Pitx2 の改変遺伝子を作成し、脾臓形成への影響を調べる。両遺伝子と VP16 または engrailed との融合コンストラクトを作製し、それぞれ転写活性化型、転写抑制型とした。これらを (5) の方法でニワトリ胚に導入し、脾臓遺伝子マーカーの発現変動を調べた。

#### (5) 脾臓原基の細胞増殖、細胞死、細胞骨格および細胞外マトリックスの動態にどのような影響を与えるか？

脾臓遺伝子マーカーの発現に加えて、脾臓原基細胞の細胞増殖、細胞死、細胞骨格、細胞外マトリックスおよび血管・血管内皮細胞の動態を免疫組織化学的手法により観察し、改変遺伝子がこれらに与える影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 脾臓に発現する遺伝子の cDNA クローニングとその発現パターン解析

脾臓発生への関与が示唆される転写因子のニワトリ相同遺伝子 (Hox11、Nkx3.2、Barx1、Pbx1、Tcf21、Sox11、WT1) の cDNA をクローニングした。得られた cDNA を用いて、孵卵 3～20 日目のニワトリ胚に対して凍結切片での *in situ* hybridization を行った。Hox11、Nkx3.2、Barx1、Tcf21 は 4 日目から、Pbx1、Sox11、WT1 は 5 日目から発現が見られ

た。このうち Hox11、Tcf21 は内部間充織に、Barx1 は mesothelium に発現するなど、時間・空間的な発現制御を示唆する結果が得られた。

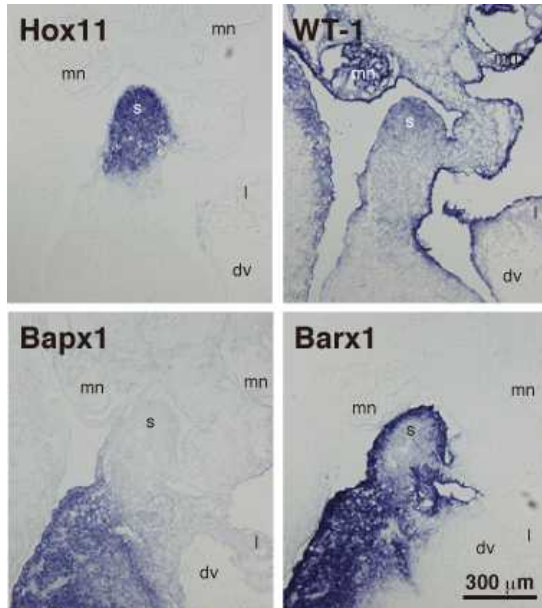


図2. 孵卵 5 日胚における Hox11, WT-1, Bapx1, Barx1 の発現パターン。dv, ductus venosus; l, liver; mn, mesonephros; s, spleen; vv vitelline vein.

### (2) 脾臓形成を制御する FGF リガンドは何か？

脾臓発生に関与するFGFリガンド候補を探索した。FGFリガンドに対するPCRプライマーを設計し、4日目のニワトリ胚より作製したcDNAを用いてRT-PCRを行った結果、15種のFGF cDNAを得た。これらを用いて *in situ* hybridizationにより発現パターンを確認したところ、FGF16が脾臓領域に発現することを見出した。FGF16は3.5日胚より脾臓領域のmesotheliumに発現を開始し、8日目までに消失した。FGF16の発現期間は脾臓が腸管より膨出する時期に相当するため、脾臓原基の増殖にはmesotheliumがシグナル源となり、この増殖にはFGF16シグナルが関与する可能性が示唆された。

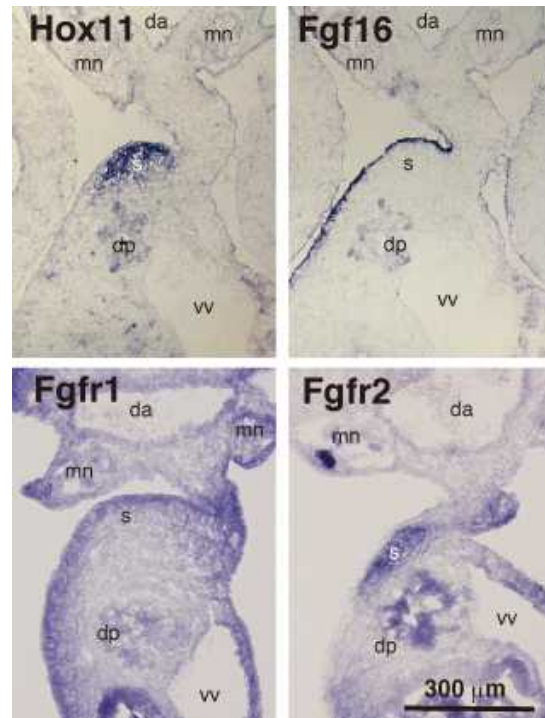


図3. 孵卵 4 日胚における Hox11, Fgf16, Fgfr-1, Fgfr-2 の発現パターン。dv, ductus venosus; l, liver; mn, mesonephros; s, spleen; vv, vitelline vein.

### (3) FGF シグナルは脾臓形成にどのように作用するのか？

申請者は、FGFR1、2を介したシグナルが脾臓形成の何らかの過程を制御すると仮定している。この仮説を検証するため、脾臓の遺伝子マーカーを用いて、FGFシグナルを活性化または抑制したときの発現変化を調べた。FGFR2の活性型または機能阻害型改変遺伝子は海外の研究者より提供を受けた。これらより pCAGGS-FGFR2 発現ベクターを構築し、孵卵 2 日目のニワトリ胚の予定脾臓形成域に *in ovo* エレクトロポレーションで導入した。孵卵 4 日目に胚を固定し、脾臓遺伝子マーカー (Hox11, Pod1, Barx1, Bapx1) の発現変動を検討した。その結果、機能阻害型 FGFR2 が導入された脾臓原基細胞では、Barx1 の発現が抑制された胚も確認されたが、コントロール胚との優位な差は生じなかった。

(4) 転写因子群はどのような遺伝子ネットワークにより脾臓形成を制御するのか？

脾臓の遺伝子マーカーのうち、最も早い発生段階より発現するものはNkx3.2とPitx2であるため、この2遺伝子は脾臓形成遺伝子ネットワークの上位に位置すると予想される。そこで、両遺伝子の改変遺伝子を作成し、脾臓形成への影響を調べた。両遺伝子とVP16(転写活性化型)またはengrailed(転写抑制型)との融合コンストラクトを作製した。これらをエレクトロポレーション法によりニワトリ胚に導入し、脾臓遺伝子マーカーの発現変動を調べた。しかしながら、マーカー遺伝子の発現変動を確認することはできなかった。Nkx3.2、Pitx2の次に早く発現するBarx1についても転写活性化型および転写抑制型コンストラクトを作製して、同様の実験を行ったが、マーカー遺伝子の発現変動を確認できなかった。Nkx3.2、Pitx2、Barx1のモルフオリノ・オリゴヌクレオチドを用いて、機能抑制実験を行ったが、マーカー遺伝子の発現変動を確認できなかった。

(5) 脾臓原基の細胞増殖、細胞死、細胞骨格および細胞外マトリックスの動態

脾臓原基細胞の細胞増殖、細胞死、細胞骨格、細胞外マトリックスの動態を免疫組織化学的手法により観察した。Nkx3.2、Pitx2、Barx1改変遺伝子がこれらの動態に影響するか否かを調べたが、変動を確認することはできなかった。

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3件)

① Katsu, K., Tatsumi, N., Niki, D., Yamamura, K-I., and Yokouchi, Y.

“Multi-modal effects of BMP signaling on Nodal expression in the lateral plate mesoderm during left-right axis formation in the chick embryo.”

Developmental Biology、査読有、374, 71-84 (2013)

② Katsu, K., Tokumori, D., Tatsumi, N., Suzuki, A., Yokouchi, Y.

BMP inhibition by DAN in Hensen’s node is a critical step for the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. Developmental Biology、査読有、363, 15-26 (2012)

③ Chi, L., Saarela, U., Railo, A., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Skovorodkin, I., Anthony, S., Katsu, K., Liu, Y., Shan, J., Salgueiro, A. M., Belo, J. A., Davies, J., Yokouchi, Y., Vainio, S. J.

“A Secreted BMP Antagonist, Cer1, Fine Tunes the Spatial Organization of the Ureteric Bud Tree during Mouse Kidney Development.”

PLoS ONE、査読有、6. E27676 (2011).

[学会発表] (計2件)

① 勝 賢二郎、仁木大輔、辰巳徳史、横内裕二

“脾臓形成を制御する遺伝子ネットワークの同定とその作用機序”

第117回 日本解剖学会総会・全国学術集会  
2012年3月26日

山梨大学甲府キャンパス  
(山梨県)

② Katsu, K. and Yokouchi, Y.

“Expression patterns of transcription

factors in the chick developing spleen”  
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 年 3 月 28～30 日  
パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝 賢二郎 (KATSU KENJIRO)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号：30363526