

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 6月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770215

研究課題名（和文） 左右非対称な内臓器官と四肢形成の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of left-right asymmetric morphogenesis in visceral organs and limb.

研究代表者

白鳥 秀卓（SHIRATORI HIDETAKA）

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：90362590

研究成果の概要（和文）：

左右非対称な内臓器官と四肢の形成について、以下の分子機構を明らかにした。

- (1)心臓流出路の左右非対称な形成には、Fgf シグナルを受け取っている内皮層の左右非対称な形態変化が重要である。
- (2)心臓流出路の左右非対称な形成には、Fgf10に加えて他の Fgf 因子も働いている。
- (3)*Pitx2* は左側板中胚葉で左右非対称な発現を開始し、肢芽においては発生が進むにつれ沿軸中胚葉由来の細胞でも発現を開始する。
- (4)*Pitx2* が発現する左肢芽の背尾側の細胞について、*Pitx2* 変異マウスと野生型では細胞増殖の速度が異なり、*Pitx2* は左側特異的に細胞増殖を抑制している。

研究成果の概要（英文）：

About left-right asymmetric morphogenesis in visceral organs and limb, I discovered the following molecular mechanisms:

- (1)Endocardium, which receives Fgf signals, has important role in morphogenesis of heart outflow tract.
- (2)Morphogenesis of heart outflow tract involves several Fgf factors in addition to Fgf10.
- (3)Expression of *Pitx2* is initiated in left lateral plate mesoderm, and also begins at paraxial mesoderm cells in the limb bud.
- (4)Cell proliferation rate of *Pitx2*-expressing cells in dorso-ventral region of left limb is different between wild type and *Pitx2* mutant embryos. *Pitx2* inhibits cell proliferation in these cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、左右軸、器官形成、*Pitx2*、*Fgf10*

1. 研究開始当初の背景

ここ数年で解明されてきた左右軸形成機構の中で、最終段階である左右非対称な器官の形態形成の分子機構の理解は遅れていた。マウスにおける報告は、私の報告を含め、心臓と腸管に関する解析だけであった。

私は、左右非対称な器官の形態形成の分子機構を解明する一番の手がかりは、転写因子 *Pitx2* であると考えた。*Pitx2* は、左右軸形成機構の上流からのシグナルを受け取り、左右非対称に形成するほとんどの器官原基の左側で発現する。そして変異マウスの解析から、*Pitx2* が左右非対称な器官形成を支配していることも明らかであった。

(1)心臓の流出路は、初めは一本の管として出来たものが、大動脈と肺動脈に分離して、大動脈は左心室に、肺動脈は右心室に正しく結合して完成する。左右軸の異常では大動脈と肺動脈の位置異常が観察され、ヒトの先天性疾患でも同様の症状があり、臨床的意義を含めて心臓の発生において重要である。

私は、*Fgf10* が心臓の流出路で非対称に発現していることを発見した。続いて、この非対称性が、*Pitx2* によって直接的に制御されることを明らかにした。そして、*Fgf10* は、*Pitx2* 以外で心臓の流出路で非対称に発現する唯一の遺伝子であり、*Pitx2* の下流で *Fgf10* が左右非対称な形態形成に働いていると予想した。

(2)私は、内臓器官に加えて、外見は左右対称に見える肢芽においても、*Pitx2* が左右非対称に発現していることを発見した。そして、四肢における *Pitx2* の非対称な発現の制御機構や、*Pitx2* が LPM の lineage である腱、muscle connective tissues、軟骨膜等に局限して発現することを明らかにした。さらに、肢芽における *Pitx2* 発現細胞の細胞系譜を追跡した結果、*Pitx2* ASE 欠損マウス [*Pitx2* の左側発現のエンハンサー(ASE)のみを欠損した変異マウス。]と野生型で細胞が寄与する領域の違いを発見した。

しかし、マウスにおいて、四肢の非対称な組織形態やその意義は不明のままであった。

2. 研究の目的

左右非対称な器官形成機構の解明を最終目標として、本研究では、私が作成した *Pitx2* の左側特異的な発現のみが消失する *Pitx2* ASE 欠損マウスを利用し、*Pitx2* の下流の分子機構を解析する。

(1)心臓の流出路の形成機構

本研究では、心臓の流出路の非対称な形成機構について、私が発見した非対称な *Fgf* シグナルと *Pitx2* ASE 欠損マウスの異常形態を手がかりにして解析を進める。その結果、心臓の流出路の形成機構を、細胞生物学的、分子生物学的な融合的に理解することを目的とする。

①*Fgf* シグナルの役割

本研究では、*Fgf10* を左右対称に発現するマウスを作成し、流出路の非対称な形成における *Fgf* シグナルの役割を解析する。

一方、*Fgf* シグナルを受け取る細胞を同定し、その細胞形態、細胞移動、細胞増殖に注目し、*Fgf* シグナルによる左右非対称な心臓の流出路の形成機構を解明する。

②細胞形態との関連

私は、血流による大動脈の非対称な形成機構の解析中に、*Pitx2* ASE 欠損マウスにおいて、流出路の形成過程で、細胞形態の異常部位が存在することを発見した。正常な心臓の発生過程では、流出路がねじれながら左に移動して、左心室と大動脈が正しく結合する。この時にねじれの方向に沿って左心室に向かう細胞集団が存在することを発見したが、*Pitx2* ASE 欠損マウスではこの集団が存在しなかった。

本研究では、該当部位の細胞移動を観察し、*Pitx2* 発現細胞や *Fgf* シグナルとの関連を解析する。

(2)*Pitx2* の非対称な発現が支配する四肢の非対称性の解析

本研究では、*Pitx2* の非対称な発現が支配する四肢の非対称性とその意義を解明する手がかりを得る目的で、以下の解析を行なう。

- ・ *Pitx2* 発現細胞や発生後期や生後に寄与する組織に注目して、非対称な形態や、*Pitx2* ASE 欠損マウスにおける異常形態を探索する。
- ・ *Pitx2* 変異マウスにおける行動異常の探索。
- ・ *Pitx2* の非対称な発現による下流遺伝子の探索

3. 研究の方法

(1)心臓の流出路の形成機構

①*Fgf* シグナルを受け取っている細胞を同定し、その細胞の特徴を解析する。(それぞれの解析は、*Pitx2* ASE 欠損マウス、*Fgf10* を左右対称に発現するマウスでも行う。)

- ・ 心臓の流出路における、*Fgf* 因子の発現を調べる。*Fgf* シグナルを受け取っている細胞をリン酸化 *Erk* の免疫組織染色で同定する。
- ・ *Fgf* シグナルを受け取る細胞と他の細胞の

違いに注目した、流出路の細胞増殖、細胞移動、細胞形態の解析。

・細胞移動：一部の細胞を DiI で標識し、全胚培養後、標識領域の変化を観察する。

・細胞形態：配向性や中心体の位置、filopodia の観察。それぞれの観察は、*Pitx2*ASE 欠損マウスでも行う。

② *Fgf10* を左右対称に発現するマウスの作成と解析

・私が発見した、*Fgf10* の非対称性を制御している *Pitx2* 結合配列を欠損させたマウスの作成 (ES 細胞による gene targeting)。

・*Fgf10* の流出路エンハンサーや *Pitx2*ASE によって、非対称に発現している *Fgf* を対称あるいは内湾側にも異所発現するトランスジェニックマウスの作成と異常形態の観察。

・私が発見した、*Fgf10* の非対称性を制御している *Pitx2* 結合配列を欠損させたマウスの解析

・流出路の細胞形態の観察結果から、非対称な形態形成への関与を示唆した現象については、その現象の変異マウスを作成し、解析する。

(2) *Pitx2* の非対称な発現が支配する四肢の非対称性の解析

①野生型での非対称な形態や、*Pitx2*ASE 欠損マウスにおける異常形態の探索。OPT (Optical projection tomography、3次元的に観察できるカメラ) も使用する。

②肢芽の左右非対称な発現だけを欠失させた *Pitx2* Conditional KO マウスの作成と解析

*Pitx2*ASE 欠損マウスは、生後まもなく死亡するため、肢芽における *Pitx2* の左右非対称な発現の機能解析ができない。よって、*Pitx2* の肢芽の左右非対称な発現のエンハンサーを loxP で挟んだマウスと、肢芽特異的に Cre を発現する *Prx1-Cre Tg* マウスとを掛け合わせ、肢芽の左右非対称な発現だけを欠失させる *Pitx2* Conditional KO マウスを作成する。

③ *Pitx2* Conditional KO マウスの形態異常や機能異常の解析。

運動機能障害に注目し、ビデオ撮影を含めて、野生型と比較しながらの行動解析。

④四肢の左右非対称な *Pitx2* の下流遺伝子のスクリーニング。

ASE-Veuns (CFP の Variant で蛍光が強い) トランスジェニックマウスを利用し、*Pitx2* 発現細胞だけを集める。マイクロアレイによって、野生型と *Pitx2*ASE 欠損マウスの間で発現量に差がある遺伝子を抽出する。

続いて、抽出した遺伝子の発現様式を確認する。

4. 研究成果

左右非対称な内臓器官と四肢の形成機構について、以下の成果を挙げた。

(1) 心臓流出路の形成機構について

①心臓流出路で左右非対称に発現している *Fgf10* の下流シグナルを解析した。その結果、*Fgf10* によって活性化された細胞の指標であるリン酸化 Erk も心臓の流出路で左右非対称に存在することが分かった。さらに、*Fgf10* の発現細胞は心筋層であるがリン酸化 Erk が存在するのは内皮層であり、心臓流出路の左右非対称な形成には内皮層の左右非対称な形態変化が重要であることが示唆された。

②ES 細胞による gene targeting によって *Fgf10* の非対称性を制御している *Pitx2* 結合配列を欠損させ、野生型では心臓流出路で非対称に発現する *Fgf10* が左右対称に発現するマウスを作成し、その解析を行なった。その結果、*Fgf10* を左右対称に発現させても心臓の左右非対称性に明らかな異常は見られず、他の *Fgf* による代償が起こっている可能性が示唆された。

これらの結果は、心臓流出路の左右非対称な形態形成に加えて、不明な点が多い他の器官の左右非対称な形成機構の解明にもつながる成果である。

(2) 肢芽における *Pitx2* の左側特異的な発現について

① *Pitx2* には選択的スプライシングによって 3 種類のアイソフォームが存在する。その 1 種類である *Pitx2c* だけが左右非対称に発現する。この *Pitx2c* が、他の 2 種類の *Pitx2a* と *Pitx2b* と同様に、肢芽の筋細胞で左右両側性に発現していることが分かった。この結果から、*Pitx2c* は左右対称性と非対称性の両方の発現によって肢芽の形態形成を制御していることが示唆された。

②肢芽における左側特異的な *Pitx2* 発現細胞の細胞系譜を解析した結果、*Pitx2* は左側板中胚葉で発現を開始し、発生が進むにつれ沿軸中胚葉の細胞でも発現を開始していることが分かった。発生後期における *Pitx2* 発現細胞の割合は、側板中胚葉由来の細胞より沿軸中胚葉由来の細胞の方が多くなることが分かった。

③ *Pitx2* は、左肢芽の背尾側に偏った発現をしている。この左肢芽の背尾側の細胞について、

*Pitx2*ASE欠損マウスと野性型の細胞増殖を比較した。その結果、*Pitx2*ASE欠損マウスでは、野性型に比べて細胞増殖が盛んに起っていることが分かった。しかしながら、*Pitx2*ASE欠損マウスと野性型の四肢の形態の違いは検出できなかった。*Pitx2*ASE欠損マウスの増殖が盛んな細胞の周囲では細胞増殖が低下していることも分かり、この代償的な反応のために*Pitx2*ASE欠損マウスと野性型の形態の違いを検出できていないことが示唆された。

これらの発見は、マウスの四肢の左右非対称性を解明するための大きな一歩になったと考えている。これらの結果は、マウスの肢芽の左右非対称性を解明するために重要な手がかりになると考えている。

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 8 件)

①Takao D, Nemoto T, Abe T, Kiyonari H, Kajiura-Kobayashi H, Shiratori H, Nonaka S. Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation. *Dev Biol.* 376(1):23-30. 2013 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.018.

②Yoshida S, Shiratori H, Kuo IY, Kawasumi A, Shinohara K, Nonaka S, Asai Y, Sasaki G, Belo JA, Sasaki H, Nakai J, Dworniczak B, Ehrlich BE, Pennekamp P, Hamada H. Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via Pkd2. *Science.* 338(6104):226-3. 2012 査読有 doi: 10.1126/science.1222538.

③Shinohara K, Kawasumi A, Takamatsu A, Yoshida S, Botilde Y, Motoyama N, Reith W, Durand B, Shiratori H, Hamada H. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. *Nat Commun.* 3:622. 2012 査読有 doi: 10.1038/ncomms1624.

④Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into left-right asymmetry in the lateral plate of mouse embryos. Kawasumi A, Nakamura T, Iwai N, Yashiro K, Saijoh Y, Belo JA, Shiratori H, Hamada H.

Dev Biol. 353(2):321-30. 2011 査読有 doi: 10.1242/dev.063966.

⑤Furtado MB, Biben C, Shiratori H, Hamada H, Harvey RP. Characterization of *Pitx2c* expression in the mouse heart using a reporter transgene. *Dev Dyn.* 240(1):195-203. 2011 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2011.03.009.

⑥Bleyl SB, Saijoh Y, Bax NA, Gittenberger-de Groot AC, Wisse LJ, Chapman SC, Hunter J, Shiratori H, Hamada H, Yamada S, Shiota K, Klewer SE, Leppert MF, Schoenwolf GC. Dysregulation of the *PDGFRA* gene causes inflow tract anomalies including TAPVR: integrating evidence from human genetics and model organisms. *Human Molecular Genetics.* 19(7), 1286-1301, 2010 査読有 doi: 10.1002/dvdy.22492.

[学会発表] (計 2 件)

①白鳥秀卓
器官の左右非対称性形成の分子機構
第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 27 日、大宮ソニックシティ (埼玉県)

②白鳥秀卓
マウスの左右非対称な器官形成機構
第 151 回日本獣医学会学術集会、2011 年 3 月 30 日、東京農工大学

[その他]

ホームページ等
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hamada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
白鳥 秀卓 (SHIRATORI HIDETAKA)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：90362590

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし