

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461632

研究課題名(和文) Foxc2遺伝子変異による第4-6鰓弓動脈異常が肺発生に及ぼす影響

研究課題名(英文) Anomalies of the 4-6 pharyngeal arch arteries and the lung development in Foxc2 deficient mouse embryos

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Foxc2欠失マウス胚では、鰓弓動脈の形態に異常を生じる。正常では形成されず、肺呼吸の進化に関連するといわれる第5鰓弓動脈様の構造が本遺伝子欠失マウスではしばしば見られるため、発生過程における血管内皮の走行パターンと肺胞分化に関連する遺伝子の発現動態を解析した。血管内皮マーカーの抗CD31抗体で免疫染色を行ったところ、第4-6鰓弓動脈の間にCD31+細胞が散在し、血管内皮が分布する可能性が示唆された。肺発生における遺伝子発現量では、発生過程の肺胞上皮に接する間質組織で発現するLef1が、胎齢11日欠失胚で低下しており、Foxc2遺伝子が肺発生に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Foxc2 deficient mouse (Foxc2<sup>-/-</sup>) embryos show abnormal morphology of pharyngeal arch arteries (PAAs) during organogenesis. The 5th PAA-like structure, which is not appeared in wild type (WT) embryos, is often detected in Foxc2<sup>-/-</sup> embryos. We examined the distribution of PAA endothelia in pharyngeal arches for checking PAAs pattern, and also analyzed canonical gene expression during lung development from embryonic day (E) 10.5 to 18.5 in both WT and Foxc2<sup>-/-</sup>. Immunohistochemical stain with CD31, a marker of vascular endothelia, revealed scattered CD31+ cells between the 4th and the 6th PAA, such as extra-PAA-like structures in pharyngeal arches. Results of real time PCR showed Lef1 gene level was decreased in Foxc2<sup>-/-</sup> at E11.5. In WT embryos, Lef1 protein was expressed in the distal lung mesenchyme adjacent to the lung epithelium, however, the expression was downregulated in Foxc2<sup>-/-</sup> at E11.5. Our data indicates that Foxc2 gene might be involved in the lung development.

研究分野：循環器発生学

キーワード：Foxc2 遺伝子 先天性心疾患 心肺前駆細胞 鰓弓動脈 肺発生 肺胞上皮前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) *Foxc2* ノックアウトマウス (KO) の心血管異常の解析中、マウスの系統により表現型スペクトラムが従来考えられていたよりも広範囲である可能性、および正常の発生においては形成されない第5 鰓弓動脈様の構造を *Foxc2* 欠失胚子で見出ししていた。

(2) *FOXC2* の突然変異が疑われたヒト先天性心疾患症例で肺毛細血管異形性の合併が報告されたことから、*Foxc2* ミュータント胎子を調べ、このマウス系においても肺胞の異常所見を見出した。

(3) 系統発生学的に第5 鰓弓動脈は肺循環の進化とともに退化・消失するとされる。

### <参考文献>

1 Yu et al., Am J Med Gent Part A 152A:1257-1262, 2010.

2 KV Kardon, "Vertebrates: Comparative Anatomy, function Evolution" 4<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill, 2006: pp455-460.

## 2. 研究の目的

(1) *Foxc2* ミュータント胚子における鰓弓動脈形成過程の形態学的特徴と関連遺伝子とその動態について調べる。

(2) *Foxc2* ミュータントマウスにおける肺胞の形成異常の形態学的特徴と、発生過程における関連遺伝子について本遺伝子との関係の有無を検討。

(3) 心大血管系と呼吸器系両器官の発生過程における共通因子を探究することで、肺の微小循環に異常をきたす新たな原因候補遺伝子を同定。

## 3. 研究の方法

(1) 鰓弓動脈の形態についての解析：胎齢10.5 日齢 (E10.5) 胚子を中心として、以下の方法で解析。

1 インクインジェクション法 - 胚子の心室よりインディアンインクを注入し、血管内腔を可視化することにより鰓弓動脈のパターンを観察。

2 Whole mount 免疫染色法 - 2H3 (抗 neurofilament 抗体) および抗 CD31 抗体 (血管内皮マーカー) 等のマーカーを用いて、鰓弓の形態異常に合併する脳神経の走行異常および鰓弓動脈パターンの詳細を解析。また、関連遺伝子の発現についても調べる。

(2) 肺胞の形態と成熟に関する解析

1 胎齢後期胎子を用いて、定法により薄切切片を作成、一般染色を行い、光学顕微鏡レベルで解析を行う。さらに、必要に応じて電子顕微鏡レベルにおける肺胞の構築形態を調べ、空気-血液関門の状態を解析。

2 胎子肺の凍結切片を用いて多重免疫染色により *Foxc2* ミュータントマウスの肺組織の特徴を解析。

3 ELISA システムを用いた肺胞が産出するサーファクタント蛋白 D の測定。E18.5 の胎子を用いて、肺胞上皮の成熟度を確認。

(3) 器官形成期における *Foxc2* 遺伝子発現部位と肺の発生に關与する遺伝子との関係についての解析

1 *LacZ* ノックインマウスの E10.5 および E11.5 胚子を X-gal 染色後、連続切片を作成し、*Foxc2* 遺伝子の発現部位を同定する。

2 real time PCR を用いた肺発生に關連する遺伝子の発現動態を定量解析。

3 発現に有意差が認められた遺伝子について、免疫染色法を用いて蛋白の発現部位とシグナルの有無を確認する。

## 4. 研究成果

(1) 鰓弓動脈の形態について

計画当初、鰓弓動脈の形成と肺胞・毛細血管の成熟における *Foxc2* 遺伝子の作用を解析、心大血管発生と肺の分化成熟の関連性を検討することを主軸としていた。ところが心肺共通前駆細胞およびその関連遺伝子について Peng らが報告 (Nature 2013) したことから、*Foxc2* ミュータント胚子の鰓弓の形態学的特徴について、さらに詳細な解析が必要となった。インクインジェクション法により鰓弓動脈内腔を可視化した解析では、*Foxc2* 欠失 (*Foxc2*<sup>-/-</sup>) 胚子では第4 鰓弓動脈の欠損のみならず、第4 鰓弓動脈を有する個体でも第4-6 鰓弓動脈間の距離が正常よりも広がっている所見を確認していたため、鰓弓動脈と伴走する脳神経の走行パターンを解析した。即ち、抗 NF-M 抗体を用いた全胚での免疫染色を行ったところ、舌咽神経 (IX) と迷走神経 (X) が正常よりも間隔が狭まっていることがわかり、詳細については現在も検討中である。また、血管内皮マーカー (抗 CD31 抗体) を用いた鰓弓動脈内皮のパターン解析では、E10.5 の *Foxc2*<sup>-/-</sup> 胚子で第4 鰓弓動脈の狭窄、背側大動脈壁の内腔への微細な突出構造、鰓弓間葉組織内での CD31+細胞の点在がみとめられた。器官形成時における鰓弓動脈の形成過程の報告は散見されるが、鰓弓動脈の異常パターン時の血管形成における内皮の分化については詳細が報告されておらず、今後の課題となっている。また、心肺共通前駆細胞についても、免疫染色により分別を試みたが、*Foxc2*+間葉系細胞は分化時に *Foxc2* 遺伝子発現が消失すること (後述) また、現在入手可能な抗体では目的部位における非特異的反応が強い傾向が判明したため、現時点で他の解析方法を試みる必要が生じている。また、鰓弓における発現遺伝子の動態については、心血管系における *Foxc2* の下流遺伝子の一つである *Tbx1* について、肺芽を含めてその発現動態について様々な研究報告があり、この

カスケードについて今後展開する方向となっている。

## (2) 肺胞の形態と成熟について

プロジェクト開始時、一般染色 (H-E 染色) を行い *Foxc2* ミュータント胎仔 (E16.5-18.5) 肺組織形態を解析、正常マウス胎仔肺の成熟過程において、肺胞壁が薄くなり肺胞が広がる時期が胎齢 17 日目であることを確認していた。ところが、*Foxc2*<sup>+/-</sup>胎仔では、出生後生存可能だが、正常に比べ肺胞の広がり E17.5 では十分といえず、成熟の遅延が疑われた。さらに、*Foxc2*<sup>-/-</sup>胎仔では肺の間質組織が厚いままであった。Desai ら (DOI: 10.1038/nature12930) が 2014 年に肺上皮前駆細胞分化と肺上皮細胞マーカーの報告をしたため、それをもとに肺胞上皮の分化を解析したところ、正常では血液空気関門を形成するため扁平化する I 型肺胞上皮 (AEC1) が、*Foxc2*<sup>-/-</sup>では胎齢後期においても扁平にならず、また、肺胞腔の広がりを維持するために必要なサーファクタントプロテインを生産する II 型肺胞上皮 (AEC2) の分化は *Foxc2*<sup>-/-</sup>においても認めるが、正常と比較して少なかった。また、マーカーを用いてリンパ管形成についての解析では、*Foxc2*<sup>-/-</sup>胎仔はリンパ管内腔が低形成であった。

## (3) *Foxc2* の発現と肺の発生に関する遺伝子について

現在一般に使用されている抗 *Foxc2* 抗体を用いて、器官形成期以降の *Foxc2*<sup>+/-</sup>および *Foxc2*<sup>+/+</sup> 個体における *Foxc2* の発現部位の確認を試みたが、非特異的反応が強いため詳細な検討ができなかった。このため、*Foxc2* 遺伝子が発現している細胞に *LacZ* シグナルがラベルされる *Foxc2-LacZ* ノックインマウス (Cederberg et al, DOI:10.1007/s11248-009-9280-1) の E10.5-11.5 胚仔を用いて、*Foxc2* の発現部位を確認した。gal 染色で *LacZ* を可視化した胚仔の連続切片を解析したところ、E10.5 の *Foxc2*<sup>+/-</sup>胚仔において、シグナルは体節、鰓弓動脈内皮のみならず、神経外胚葉、内胚葉由来を除くほぼ全域に見られる中胚葉領域、遊走中の間葉細胞にその発現が認められた。即ち、この時期形成される肺芽の間葉細胞においても *Foxc2* は陽性であった。しかしながら、E11.5 胚仔においては、大動脈基部を除く大血管および肺実質に分化した細胞で、このシグナルは消失していた。

肺発生に関する代表的な遺伝子発現を *Foxc2*<sup>+/+</sup> と *Foxc2*<sup>-/-</sup>において比較したところ、E11.5 胚仔において *Lef1* 遺伝子 (*Wnt* シグナリング活性マーカー) の発現量に有意差を認めため、切片を作成し免疫染色を行ったところ、*Foxc2*<sup>+/+</sup>肺胞上皮に接する間葉組織において *Lef1* 陽性を確認したが、*Foxc2*<sup>-/-</sup>では発現が低下していた。本研究は肺の発生過程で発現する遺伝子へ

の *Foxc2* の関与を示唆した初めての報告となる。二次心臓野と *Foxc2*+細胞との関係については三浦らの報告 (Uddin et al. Biomed Res 36:235-245, 2015) があるが、*Foxc2*+間葉系細胞の血管・リンパ管系および肺組織への分布様式の詳細は不明であり、今後これらの組織の発生過程における *Foxc2*+細胞の Fate map (運命図) および多重免疫染色を用いた解析を中心に、心肺前駆細胞や肺胞上皮前駆細胞への *Foxc2* 遺伝子の関与について研究を進める予定である。

## 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 1 件)

1 Mayoko Tsuji, Masae Morishima, Kazuhiko Shimizu, Shunichi Morikawa, Mikael Heglind, Sven Enerback, Taichi Ezaki, Jun Tamaoki, *Foxc2* influences alveolar epithelial cell differentiation during lung development, Development Growth and Differentiation, Vol.59 (6), 2017, (査読あり、印刷中)  
DOI:10.1111/dgd.12368

[学会発表] (計 13 件)

1 辻真世子、森島正恵、清水一彦、近藤光子、別役智子、久米努、玉置淳、江崎太一、*Foxc2* 遺伝子の肺発生過程における発現と血管新生に及ぼす影響、第 122 回日本解剖学会総会 2017 年 3 月 28-30 日、長崎大学坂本キャンパス (長崎県長崎市)

2 森島正恵、モデルマウスの円錐動脈幹と大血管の形態異常-心大血管発生と表現型-、第 122 回日本解剖学会総会、2017 年 3 月 28-30 日、長崎大学坂本キャンパス (長崎県長崎市)

3 Mayoko Tsuji, Masae Morishima, Kazuhiko Shimizu, Mitsuko Kondo, Tsutomu Kume, Taichi Ezaki, Role of *Foxc2* In Differentiation of Alveolar Type I Epithelial Cells, American Thoracic Society Conference, 2016 年 5 月 13-18 日、カリフォルニア (USA)

4 辻真世子、森島正恵、清水一彦、近藤光子、別役智子、久米努、玉置淳、江崎太一、*Foxc2* 遺伝子が肺発生過程において間葉細胞に及ぼす影響、第 121 回日本解剖学会総会、2016 年 3 月 28-30 日、ビッグパレット福島 (福島県郡山市)

5 森島正恵、辻真世子、清水一彦、Mikael Heglind, Sven Enerback, 久米努、中西敏雄、江崎太一、*Foxc2* 欠失マウスにおける心血管奇形の形態、第 120 回日本解剖学会総会、2015 年 3 月 21-23 日、兵庫国際会議場 (兵庫県神

戸市)

6 辻真世子、森島正恵、清水一彦、近藤光子、玉置淳、久米努、江崎太一、*Foxc2* ノックアウトマウスにおける胎仔肺の組織学的検討、第 120 回日本解剖学会総会、2015 年 3 月 21-23 日、兵庫国際会議場(兵庫県神戸市)

7 辻真世子、森島正恵、清水一彦、近藤光子、玉置淳、久米努、江崎太一、肺発生における *Foxc2* 遺伝子の役割、第 55 回日本呼吸器学会 2015 年 4 月 17-19 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

8 Mayoko Tsuji, Masae Morishima, Kazuhiko Shimizu, Tsutomu Kume, Jun Tamaoki, Taichi Ezaki, Vascular analysis in the lung of *Foxc2* deficient mice, European Respiratory Congress 2014 年 9 月 6-10 日(ドイツ)

9 森島正恵、辻真世子、清水一彦、Mikael Heglind, 久米努、中西敏雄、Sven Enerbäck, 江崎太一、*Foxc2* 欠損マウス胚子における鰓弓形成上の特徴、第 54 回日本先天異常学会学術総会、2014 年 7 月 26-27 日、麻布大学(神奈川県相模原市)

10 辻真世子、森島正恵、清水一彦、玉置淳、久米努、江崎太一、*Foxc2* マウスにおける肺成熟過程の組織学的解析、第 54 回日本先天異常学会学術総会、2014 年 7 月 26-27 日、麻布大学(神奈川県相模原市)

11 Mayoko Tsuji, Masae Morishima, Kazuhiko Shimizu, Mikael Heglind, Sven Enerbäck, Tsutomu Kume, Jun Tamaoki, Taichi Ezaki, VASCULAR DEVELOPMENT IN THE LUNG OF *Foxc2* KNOCKOUT MICE, Weinstein Cardiovascular Development Conference, 2014 年 5 月 7-10 日、マドリッド(スペイン)

12 辻真世子、森島正恵、清水一彦、北原秀治、玉置淳、久米努、江崎太一、*Foxc2* ノックアウトマウスにおける肺成熟過程の組織学的解析、第 119 回日本解剖学会総会、2014 年 3 月 27-29 日、自治医科大学(栃木下野市)

13 森島正恵、清水一彦、中西秀彦、北原秀治、Mikael Heglind、Sven Enerbäck、久米努、江崎太一、*Foxc2* ノックアウトマウスにおける肺組織の形態学的解析、第 53 回日本先天異常学会学術集会、2013 年 7 月 21-23 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

## 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

### (2) 研究分担者

清水 一彦 (SHIMIZU, Kazuhiko)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90385394

### (3) 連携研究者

江崎 太一 (EZAKI, Taichi)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10128259

森川 俊一 (MORIKAWA, Shun-ichi)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70339000

### (4) 研究協力者

辻 真世子 (TSUJI, Mayoko)  
東京女子医科大学・医学部・大学院生

スヴェン エネルベック (ENERBÄCK, Sven)  
イエーテボリ大学・医学部・教授

ミカエル ヘグリンド (HEGLIND, Mikael)  
イエーテボリ大学・医学部・研究員

久米 努 (KUME, Tsutomu)  
ノースウェスタン大学・医学部・教授