



# Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation

竹内, 重人

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2116

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002116>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	たけ うち しげ と 竹 内 重 人	（岡山県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成1259号	
学位論文題目	<b>Mouse Ror 2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation</b> （受容体型チロシンキナーゼ mouse Ror 2 は心臓及び四肢の形成過程に必須の役割を担う）	
審査委員	主査 教授 山 村 博 平 教授 横 山 光 宏          教授 寺 島 俊 雄	

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [緒言]

発生過程の多様な細胞間相互作用において、受容体型チロシンキナーゼ (receptor type tyrosine kinases : RTKs) は重要な役割を担っている。成長因子等の可溶性の ligand もしくは近接細胞の膜上に発現している ligand と結合した後、RTKs は細胞内情報伝達を引き起こし、細胞増殖や移動、及び細胞の生死に関わる働きを行う。我々の研究室が以前より注目している Ror-family RTKs はショウジョウバエからマウス・ヒトに至るまで構造のよく保存された、少なくとも2つのメンバーから構成される。構造上の特徴として、細胞内領域、膜貫通領域、及び細胞外領域からなり、種を越えて共通した domain として、細胞内に Trk-family と相同性の高い tyrosine kinase domain, 細胞外には cystein rich domain, 蛋白質間の相互作用に重要と考えられる kringle domain が認められる。哺乳類では更に細胞外領域に Immunoglobulin (Ig) -like domain が認められる。

マウスの Ror-family である mouse Ror 1 (mRor 1) 及び mouse Ror 2 (mRor 2) は、マウスの発生過程において時間-空間的に異なった発現様式で制御されている。いずれも胎生期の神経系において発現が認められるが、mRor 2 が生後発現が速やかに減弱するのに対し、mRor 1 はその発現が生後も持続する。また mRor 2 の発現が神経系に限局されるのと異なり、mRor 1 は胎生期及び生後の心臓、肺にも発現が認められる。Ror-family RTKs の機能は ligand との結合により制御されと考えられるが、現時点では ligand は固定されておらず、Ror-family RTKs はいわゆる orphan receptor である。今回我々は、mRor 2 の機能、特に発生過程における役割を明らかにする目的で、mRor 2 の knock out mice を作製し、その発現型の解析を行った。

#### [方法及び結果]

mRor 2 の細胞外領域の Ig-like domain を含む exons を欠失した targeting vector を作製した。electroporation 法にて mutant の embryonic stem cell を樹立し、C57BL/6 blastocysts に injection した。得られた chimera と C57BL/6 の交配により、heterozygous mice (hetero) が生まれることを PCR

及び Southern blot により確認した。hetero の外観は正常で wild type の mice (wild) と違いが認められなかった。hetero のかけあわせを行ったところ、生後3-4週間後のケージには homozygous の mice (mutant) は認められなかった。しかしながら、生直後のケージの中に常に約1/4の割合で死亡している新生児が存在し、genotype は全て mutant であった。開腹による胎児の詳細な検討を行ったところ、mutant の embryonic lethal は認められず、胎内でメンデルの法則に基づいた比で、wild/hetero/mutant のマウスが認められた。胎生15.5日より、mutant の体全体のサイズは wild に比し80-90%と小さく、四肢、尾が短く、顎の形が丸みを帯びていた。18.5-19.5日頃、胎児は全例が出生するが、mutant においては、生直後より努力様呼吸と顕著なチアノーゼが認められ、ミルクを飲むことなく6時間以内に全例死亡した。

発生過程における mRor 2 の詳細な発現部位を調べるため、whole-mount in situ hybridization を行った。胎生9.5日の wild の胎児にて、鰓弓、肢芽、前脳、及び中脳に強い mRor 2 の発現が認められた。ラジオアイソトープを用いた in situ hybridization により、胎生12.5日の wild の胎児にて、中枢神経系、特に大脳皮質、中脳及び脊髄に発現が認められた。さらに、心臓、上顎骨、下顎骨、椎骨にも明らかな発現が認められた。また、mutant の胎児では anti-sense probe 及び、sense probe にて signal は認められなかった。wild type の胎児を、sense probe を用いて解析した場合にも signal は検出されなかった。

形態学的な異常を H-E 染色で検討したところ、mutant では解析行った全例において、心室中隔欠損が認められた。心房中隔欠損も高頻度に認められた。弁、大動脈弓、大血管系の異常は認められなかった。更に肺の異常として、wild では生後肺胞が拡張するのに対して、mutant の肺においては明らかな肺胞の拡張は認められなかった。この肺胞拡張不全が新生児の努力様呼吸及びチアノーゼの原因であると考えられる。

胎児及び新生児の外観で、四肢、尾、及び顎骨の形態異常が認められたため、骨格系の発生異常を骨染色により経時的に検討した。外観の差異と同様、骨染色においても、胎生14.5日以降は明らかに四肢及び尾が短く、顎骨の形成不全が認められた。また、胎生14.5日においては全体のサイズに明らかな差が認められないにも関わらず mutant の四肢及び尾が短く、特に前肢の遠位部（橈骨、尺骨）及び後肢の遠位部（脛骨、腓骨）に著しい形成不全が認められた。胎生17.5日以降は、四肢及び尾の違いに加え、顎骨の低形成、全体のサイズの違いが認められた。Alizarin Red で赤色に染まる部位は骨化に対応しており、wild では胎生15.5日以降より骨化が進行することが確認される。しかし、mutant では胎生15.5日以降、四肢の遠位部において正常な骨化は認められなかった。また、背側からみた像において、胎生17.5日の wild では椎骨及び肋骨の正常な骨化が認められるが、mutant では認められなかった。これらの所見より、mRor 2 は骨格系の形成に関わり、特に四肢、尾、椎骨、及び肋骨の形成に重要な役割を担うことが明らかとなった。

更に、骨組織の発生過程における mRor 2 の役割を検討するために、胎児の長骨と椎骨の H-E 染色を行い、wild と mutant の比較を行った。長骨の骨端板において、wild の場合には軟骨細胞の明らかな骨化が認められるが、mutant では増殖中の軟骨細胞の数の減少と配列の異常が認められる。脊柱の発生過程において、wild の場合には軟骨化中心において、軟骨細胞の成熟・増殖、及び細胞間質の石灰化といった正常な軟骨の成熟が認められる。一方、mutant ではそれらが欠如している。すなわち、mutant においては、軟骨細胞の分化・増殖、正常な石灰化が認められず、mRor 2 は軟骨細胞の増殖及び骨化に重要な役割を果たしているものと考えられる。

[考察]

心室中隔や四肢の発生・形成過程においては様々な細胞間的情報伝達因子が重要な役割を担っている。最近では、これらの過程に関与することが予想されていなかった遺伝子が、knock out miceの解析により、心形成及び骨形成過程に関わっていることが明らかにされている。例えば、chemokine receptorであるCXCR4のknock out miceにおいて心室中隔欠損が、血球系転写因子であるCbfa1のknock out miceにおいて骨形成の完全な消失、等である。

Holt-Oram syndromeは前肢の形成異常及び心室中隔欠損で特徴づけられ、最近になり、その原因遺伝子としてTBX5が固定された。mRor2のmutantの表現形は、上下肢の形成異常及び心室中隔欠損であり、Holt-Oram syndromeに類似している。TBX5は主に上肢に、また他のT-box familyであるTBX4は下肢に発現しており、それぞれ上肢、下肢の発生および上・下肢の特徴化の過程において重要な役割を担うことが知られていた。

しかしながら、mRor2は胎生期において上肢、下肢いずれにおいてもmRNAの発現が認められ、mRor2のmutantにおいて上肢、下肢いずれにも異常が認められることから、TBX4、TBX5とは異なる働きを有すると考えられる。実際、mRor2のmutantにおいて、TBX4とTBX5はそれぞれ下肢・上肢に明らかな発現が認められる。

また、我々のデータより、mRor2が軟骨細胞の増殖、成熟、骨化に関わっていることが示唆された。昨年、Ror-family RTKsのC.elegansの相同分子であるCAM-1の機能が発表された。興味深いことに、CAM-1は発生過程における細胞の移動、非対称な細胞分裂の極性の決定、さらには軸索の伸長過程において重要な役割を担うことが明らかとなっており、今後mRor2が軟骨細胞をはじめ様々な細胞の移動、極性決定にどのような機能を持っているのか興味を持たれる。

## 論文審査の結果の要旨

Ror-family receptor type tyrosine kinases (RTKs)はショウジョウバエからマウス・ヒトに至るまで構造のよく保存された、少なくとも2つのメンバーから構成される。構造上の特徴として、細胞内領域、膜貫通領域、及び細胞外領域からなり、細胞内にはtyrosine kinase domain、細胞外にはcystein rich domain、kringle domainが認められる。哺乳類では更に細胞外領域にImmunoglobulin (Ig)-like domainが認められる。

マウスのRor-familyであるmouse Ror1 (mRor1)及びmouse Ror2 (mRor2)は、マウスの発生過程において時間-空間的に異なった発現様式で制御されている。いずれも胎生期の神経系において発現が認められるが、mRor2が生後発現が速やかに減弱するのに対し、mRor1はその発現が生後も持続する。またmRor2の発現が神経系に限局されるのと異なり、mRor1は胎生期及び生後の心臓、肺にも発現が認められる。

申請者はmRor2の細胞外領域のIg-like domainを含むexonsを欠失したtargeting vectorを作製し、常法にて、heterozygous mice (hetero)を得た。heteroの外観は正常でwild typeのmice (wild)と違いが認められなかった。heteroのかけあわせを行ったところ、生直後のケージの中に常に約1/4の割合で死亡している新生児が存在し、genotypeは全てmutantであった。開腹による胎児の検討を行ったところ、mutantのembryonic lethalは認められなかったが、胎生15.5日より、mutantの体全体のサイズはwildに比し80-90%と小さく、四肢、尾が短く、顎の形が丸みを帯びていた。18.5-19.5日頃、胎児は全例が出生するが、mutantにおいて、生直後より努力様呼吸と顕著なチアノーゼが認められ、ミルクを飲むことなく6時間以内に全例死亡している。

さらに申請者は発生過程における mRor 2 の詳細な発現部位を調べるため、whole-mount in situ hybridization を行った。胎生9.5日の wild の胎児にて、鰓弓、肢芽、前脳、及び中脳に強い mRor 2 の発現が認められ、胎生12.5日の wild の胎児にて、中枢神経系、特に大脳皮質、中脳及び脊髄に発現が認められた。さらに、心臓、上顎骨、下顎骨、椎骨にも明らかな発現が認められた。

形態学的な異常を H-E 染色で検討したところ、mutant では解析を行った全例において、心室中隔欠損が認められた。更に肺の異常として、wild では生後肺胞が拡張するのに対して、mutant の肺においては明らかな肺胞の拡張は認められなかった。

胎児及び新生児の外観で、四肢、尾、及び顎骨の形態異常が認められたため、骨格系の発生異常を骨染色により経時的に検討した。外観の差異と同様、骨染色においても、胎生14.5日以降は明らかに四肢及び尾が短く、顎骨の形成不全が、特に前肢の遠位部（橈骨、尺骨）及び後肢の遠位部（脛骨、腓骨）に著しい形成不全が認められた。

更に、骨組織の発生過程における mRor 2 の役割を検討するために、胎児の長骨と椎骨の H-E 染色を行い、wild と mutant の比較を行っている。長骨の骨端板において、wild の場合には軟骨細胞の明らかな骨化が認められるが、mutant では増殖中の軟骨細胞の数の減少と配列の異常が認められる。脊柱の発生過程において、wild の場合には軟骨化中心において、軟骨細胞の成熟・増殖、及び細胞間質の石灰化といった正常な軟骨の成熟が認められる。一方、mutant においては、軟骨細胞の分化・増殖、正常な石灰化が認められず、mRor 2 は軟骨細胞の増殖及び骨化に重要な役割を果たしているものと考えられた。

本研究は、遺伝子 targeting 法を用いて受容体型 tyrosine kinase mRor 2 の機能について研究したものであるが、従来殆ど行われなかった哺乳動物 Ror-family tyrosine kinase の発生過程における機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると考え。よって、本申請者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。