Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Wild-Type Endoderm Abrogates the Ventral Developmental Defects Associated with GATA-4 Deficiency in the Mouse

成田，奈緒子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1999-03-17
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2325
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002325

※ 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。

[132]

氏名・（本籍）	成田奈緒子（なりた なおこ）　（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博ろ第1685号
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学位授与の日付	平成11年３月17日
学位論文題目	Wild-Type Endoderm Abrogates the Ventral Developmental Defects Associated with GATA－４　Deficiency in the Mouse （正常内胚葉によるGATA－４欠失マウス腹側臓器発生異常の修復）
審査委員	主査　教授　中村　肇 教授　丸尾　猛　　教授　寺島俊雄

論文内容の要旨

緒言

GATA－４は1993年に同定されたZnフィンガードメインを持つ転写因子であり，コンセンサス配列（A/T）GATA（A/G）に結合するGATA転写因子群（GATA１－６）の一員である。心筋細胞，羊膜内胚葉その他の細胞において遺伝子発現及び分化発生に重要な役割を担うと考えられている。特に心臓の発生においてはGATA－４は，前腸の陥入と心管形成の活発な時期に，心臓原基の内蔵中胚葉（precardiac splanchnic mesoderm）及び隣接する内胚葉に発現する。GATA－４ノックアウトマウスは胎生9.5日以前に死亡し，腹側臓器の形態発生に重篤な障害がみとめられた。すなわち，胎児両側にある二本の心臓原基は遊走して腹側で融合し一本の心管を形成する事ができずに，胎児外背側に二本の心管を残存する。さらに前腸は形態異常を呈し，囲心腔は欠如，羊膜と羊水は背側へ移動している。この事実は，GATA－４の心臓原基の内臓中胚葉における発現か，あるいはその両者同時の発現かのいずれかが，胎児の腹側臓器の発生に必須であることを示唆している。今回我々は，キメラマウスの実験系を使う事により，中胚葉ではなく，内胚葉におけるGATA－４の発現が腹側臓器の発生に必須な条件である事を証明した。

方法

β－ガラクトシダーゼトランスジーンを全細胞で発現するROSA26マウス（Jackson Lab）をC57BL／６マウスと交配させ，胎生2.5日に８細胞胚を採取し，Gata４欠失ES細胞（Gata４－／－ES細胞）４個をそれぞれマイクロインジェクトした後，Swiss-Webster偽妊娠マウスの卵管に戻し妊娠を継続させた。適当な時期に胎児を採取し，X-galで全体を染色した後，４％パラホルムアルデヒドで固定，パラフィン埋没後切断（５mm）を切ってH&E染色を施した。

結果

Gata４－／－ES細胞をROSA26マウス胚（Gata４＋／＋）にマイクロインジェクトして得られた高度キメラマウスは胎生８－10日に採取，X-galで染色して全体像あるいは切片で観察した（図１，２）。Gata４－／－ES細胞由来の組織は濃青の染色の欠如により容易に判別できた。この高度キメラ

マウスでは羊膜の内胚葉細胞全部と前腸，後腸の内胚葉細胞のごく一部がGata 4 ＋／＋ホスト細胞由来でこれ以外の胎児細胞はすべてGata 4 －／－ES細胞由来であった（図1A，1C，1D，2A－2C)。これらの高度キメラマウスは，やや発育遅延を認める以外は形態上の異常を認めなかった。このキメラマウス胎児においては，GATA－4の心臓原基の内臓中胚葉における発現は完全に欠如しているにもかかわらず，腹側臓器の形態発生に異常を認めず，心臓はループ状で正中線上にあり，正常な心内膜層と心筋層を認めた（図1C，1D，2C)。胎児採取の際の観察では胎児心は正常に拍動が見られ，各々囲心腔も認められた。前腸は正常な形態を持ち，心臓の背側，神経管の腹側に正しく位置していた（図1C，1D，2C)。各々の胎児は腹側に羊膜を持ち，正常な羊水に囲まれていた（図1A，1C，1D)。このキメラ胎児の形態学的特徴は，神経管の腹側にほとんど構造物を認めないGATA－4ノックアウトマウスのそれとは明らかに異なっていた。

考察

GATA－4ノックアウトマウスは，前腸の陥入と心管形成などを含む腹側臓器の形態発生に重篤な異常を呈する。これと比較して，Gata 4 －／－↔ROSA26（Gata 4 ＋／＋）高度キメラマウスにおいては，Gata 4 ＋／＋細胞は内胚葉にしか存在しないにもかかわらず，腹側臓器の形態発生には異常が認められなかった。この結果から我々は，正常（Gata 4 ＋／＋）細胞が原始内胚葉（羊膜）と耐久性内胚葉（前腸）のいずれか，あるいは両方に存在することが，隣接するGata 4 －／－組織が正常腹側臓器へと発生するのに十分な条件であると結論付けた。この事は，マウス胚の発生における外側から腹側への巻き込みは，中胚葉とその内側に隣接する内胚葉の相互作用によって起こるという概念を支持するものである。さらに，種々の報告によれば，転写因子GATA－4は内胚葉における遺伝子の発現を制御する事により，この腹側への巻き込み現象に重要な役割を担っている事が示唆されている。内胚葉が両生類や鳥類の心臓形成において心筋細胞の分化に影響を及ぼす因子であることはすでに報告されているので，鼠の心臓の形態発生においてもやはり内胚葉が影響する事は十分予期される。例えば細胞外基質蛋白（例：フィブロネクチン）やシグナル伝達物質（例：BMP，FGF）の産生が，内胚葉が隣接する心臓原基中胚葉の分化／遊走に影響を与えるメカニズムとして考えられている。

GATA－4が原始内胚葉（羊膜）あるいは耐久性内胚葉（前腸）のいずれに発現していることが腹側臓器の形態発生に必須であるかは，我々の報告したキメラマウスの実験系では決定できない。しかし状況証拠からは，原始内胚葉（羊膜）での発現が，正常側形態発生により重要な意味を持っていると考えられている。マウスの発生においては，原始内胚葉から耐久性内胚葉が分化，分離し，胎児胚と原始内胚葉は完全に区別される。この結果，胚の発生における外側から腹側への巻き込みが起こる際には，原始内胚葉はAIP（前腸管孔）の近傍に集積する事になる。GATA－4のmRNAと蛋白はマウス発生初期の全期間，AIP（前腸管孔）の近傍を含む原始内胚葉羊膜に発現している。これに対して胎生9－10日陥入した前腸部分の耐久性内胚葉にはGATA－4のmRNAの発現はみられない。さらに，GATA－4ノックアウトマウスやGata 4 －／－ES↔ROSA26（Gata 4 ＋／＋）高度キメラマウスでの本稿の実験結果より，GATA－4の発現がなくても耐久性内胚葉由来の前腸の形成が可能であると証明された。いくつかの実験系からGATA－4が原始内胚葉羊膜の機能に関係していると示唆されている。トランスフェクションの実験から，羊膜の原始内胚葉に発現するいくつかの遺伝子のGATA－4がトランスアクチベートすることが分かっており，またGata 4 －／－ES細胞をin vitroで分化させると，羊膜内胚葉の形成と種々の羊膜内胚葉マーカー遺伝子の発現を欠如する。GATA－4ノックアウトマウスにおいては，羊膜内胚葉と思われる構造が見られるが，およそ3分の1の胚は腸

胚形成ができず，これらの胚の羊膜内胚葉は機能的に欠陥を持っている事が示唆される。

我々のキメラマウスの実験では鼠の心発生における内胚葉と中胚葉の相互関係について考察することができた。しかし，ほぼすべての細胞がES細胞から成るキメラマウスのため胎児は満期まで生存する事ができなかったため実験はすべて胎生10日以前の胎児で行われた。このため，微細な形態上や機能上の異常は見落とされている可能性は残るが，それでもGATA－４ノックアウトマウスと我々の高度キメラマウスの心臓や前腸の形態の大きな差異から，Gata４－／－マウスの表現型の原因は，内胚葉の欠如による所が大きく，中胚葉の欠如には直接関係がない事を示唆するものである。

最近報告された心臓に発現するbHLH蛋白のdHANDのノックアウトマウスの研究結果もやはり，中胚葉ではなく内胚葉のGATA－４の発現が正常な腹側の形態発生に必須である事を示唆するものである。dHANDノックアウトマウスは胎生10.5日に死亡し，右心室の低形成と拍出血管の異常を呈する。GATA－４のmRNAはこのノックアウトマウスの心筋内には認められないが，内胚葉由来の組織には発現している。これらの結果は，中胚葉由来の心組織と内胚葉由来の組織におけるGATA－４の発現は，それぞれ別のプロモーターに支配されており，心筋細胞におけるGATA－４の発現はdHANDノックアウトマウスの心臓原基の中胚葉は，GATA－４の発現を欠如しているにもかかわらず，胎児両側にある二本の心臓原基は遊走して腹側で融合し，また前腸の形成も正常で，中胚葉におけるGATA－４の発現は，腹側臓器の形態発生に必要ではないという考えを支持するものであった。

論文審査の結果の要旨

GATA－４は，1993年に同定されたZnフィンガー・ドメインを持つ転写因子であり，コンセンサス配列（A/T）GATA（A/G）に結合するGATA転写因子群（GATA１－６）の一員である。心筋細胞，羊膜内胚葉その他の細胞において遺伝子発現及び分化発生に常用な役割を担うと考えられている。特に心臓の発生においてはGATA－４は，前腸の陥入と心管形成の活発な時期に，心臓原基の内蔵中胚葉（precardiac splanchnic mesoderm）及び隣接する内胚葉に発現することが知られている。

申請者らは，GATA－４ノックアウトマウスは，胎生9.5日以前に死亡し，腹側臓器の形態発生に重篤な障害を認めることから，キメラマウスの実験系を使うことにより、中胚葉ではなく，内胚葉におけるGATA－４の発現が腹側臓器の発生に必須な条件であることを証明しようとした。

Gata４－／－ES細胞ROSA26マウス胚（Gata４＋／＋）にマイクロインジェクトして得られた高度キメラマウスを，胎生８－10日に採取，X-galで染色して全体像あるいは切片で観察した。GATA－４ノックアウトマウスは、前腸の陥入と心管形成などを含む腹側臓器の形態発生に重篤な異常を呈する。これと比較して，Gata４－／－f ROSA26（Gata４＋／＋）高度キメラマウスにおいては，Gata４＋／＋細胞は内胚葉にしか存在しないにもかかわらず，腹側臓器の形態発生には異常が認められなかった。

この結果から、正常（Gata４＋／＋）細胞が原始内胚葉（羊膜）と耐久性内胚葉（前腸）のいずれか，あるいは両方に存在することが、隣接するGata４－／－組織が正常腹側臓器へと発生するのに十分な条件であると結論付けた。このことは、マウス胚の発生における外側から腹側への巻き込みは、中胚葉とその内側に隣接する内胚葉の相互作用によって起こるという概念を支持するものである。さらに、種々の報告によれば、転写因子GATA－４は内胚葉における遺伝子の発現を制御する事により、この腹側への巻き込み現象に重要な役割を担っている事が示唆されている。

マウスの発生においては、原始内胚葉から耐久性内胚葉が分化し、分離し、胎児胚と原始内胚葉は完全に区別される。この結果、胚の発生における外側から腹側への巻き込みが起こる際には、原始内胚葉はAIP（前腸管孔）の近傍に集積することになる。GATA－４のmRNAと蛋白はマウス発生初期の全期間、AIP（前腸管孔）の近傍を含む原始内胚葉羊膜に発現している。これに対して胎生９－10日の陥入した前腸部分の耐久性内胚葉にはGATA－４のmRNAの発現はみられない。また、Gata４－／－ES細胞をin vitroで分化させると、羊膜内胚葉の形成と種々の羊膜内胚葉マーカー遺伝子の発現を欠如する。GATA－４ノックアウトマウスにおいては、羊膜内胚葉と思われる構造が見られるが、およそ３分の１の胚は腸胚形成ができず、これらの胚の羊膜内胚葉は機能的に欠陥を持っている事が示唆された。

本研究は、キメラマウスの実験で心発生における内胚葉と中胚葉の相互関係についてに研究したものであり、従来全く研究されていなかったGATA－４ノックアウトマウスと本研究モデルの高度キメラマウスでの比較検討から，Gata４－／－マウスの表現型には、内胚葉の欠如によるところが大きく、中胚葉の欠如には直接関係がない事を示唆するという重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。