

Ror 2 チロシンキナーゼによるシグナル伝達機
構及び骨軟骨疾患との関連解析

神戸大学医学部

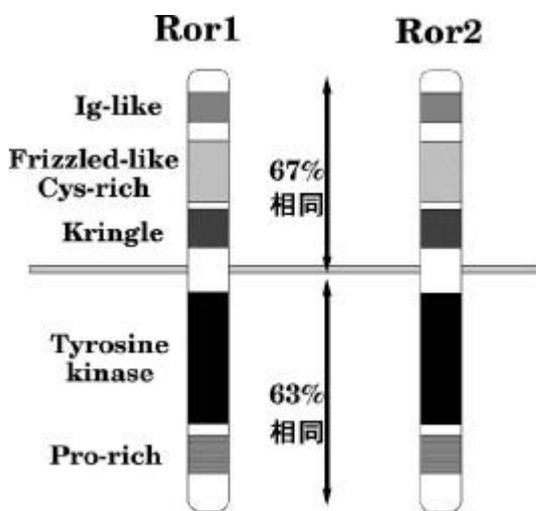
大石 勲

Ror2 チロシンキナーゼによるシグナル伝達機構及び骨軟骨疾患との関連解析

1. 研究の背景と目的

哺乳動物の形態形成機構の解析は、単に正常個体発生を明らかにするにとどまらず、先天性疾患を始めとする諸種の病態を分子レベルで理解する上でも重要である。形態形成過程の細胞間相互作用において、受容体型チロシンキナーゼ (RTKs) は必須の役割を担っている。我々が同定した Ror ファミリー RTKs は 2 つのメンバー (Ror1, Ror2) から構成され (図 1)、これまでに行ったノックアウトマウスの作製・解析結果から Ror2 が呼吸器、循環器系の形成過程や四肢パターン形成並びに骨軟骨形成過程に必須の役割を担うことを明らかにしている (1,2)。また最近、遺伝性の短趾小人症である Robinow 症候群及び B 型短趾症の罹患者において Ror2 遺伝子の変異が相次いで報告され、ヒト形態形成においても Ror2 は必須の役割を担うと考えられる (3,4, 5, 6)。しかし、その重要性が明らかになる一方で Ror2 は未だリガンドが同定されておらず、シグナル伝達機構も不明である。一方、Ror2 と高い相同性を有する Ror1 の機能は不明であり、Ror1, Ror2 の発生過程における発現動態や相互作用についても解析されていなかった。

本研究では Ror ファミリー RTKs の機能、とりわけ発生過程における機能を解析する目的で Ror1, Ror2 の詳細な発現動態解析を行うと共に、新たに Ror1 ノックアウトマウスを作製・解析した (7)。加えて、Ror1, Ror2 の形態



形成過程における相互作用を明らかにする目的で Ror1, Ror2 ダブルノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行った (8)。

2. 研究方法・研究内容

マウス Ror1, Ror2 の 3' 側非翻訳領域約 700 塩基をそれぞれプローブとし、in-situ hybridization 法により、マウス初期胚 (7.5, 8.5, 9.5, 10.5 日胚) における Ror1, Ror2 の発現様式を解析し比較・検討した。また、特徴のある発現動態に関してはマウス胚の切片を作製し、発現部位の詳細な検討を行った。加えて、11.5 日

以降の胚由来の肢芽、心臓、肺、脳等の組織における Ror1, Ror2 の詳細な発現動態解析を行った。

更に、Ror1 ノックアウトマウスを作製し、上記発現動態の解析結果並びに Ror2 ノックアウトマウスの表現型解析の結果を踏まえ、呼吸器、循環器系、及び骨軟骨系における表現型解析を行った。加えて、Ror1, Ror2 の機能連関について解析するために Ror1, Ror2 ダブルノックアウトマウスを作製し Ror1, Ror2 (シングル) ノックアウトマウスの表現型と比較検討を行った。

3. 研究結果

Ror1, Ror2 の発現は 7.5 日胚より検出され、Ror1 は頭部 (胚前方)、Ror2 は原条領域 (胚後方) にそれぞれ明瞭な発現が認められた (図 2 A, B)。8.5 日胚においては Ror1 の発現が頭部間充織に、Ror2 の発現が前脳、中脳、体側神経管の背側、頭部神経堤細胞及び原条領域に発現が認められた (図 2 C-F)。さらに、この時期の頭部における切片を作製し解析を行ったところ、興味深いことに Ror1, Ror2 はいずれも遊走しつつある頭部神経堤細胞に強い発現が認められた (図 2)。9.5 日-10.5 日胚において Ror1, Ror2 は共に頭部神経堤細胞由来の組織である咽頭弓や前頭鼻隆起を含む顔面原基にそれぞれ類似した発現パターンを呈する (図 2)。また、体幹部においても Ror1, Ror2 は間葉系の細胞を中心に発現しており、9.5 日-10.5 日胚の切片による内部組織の解析から、特に皮筋板や椎板の背側で発現していることが明らかとなった (図 2 K, L)。発生過程の肢芽においては、9.5 日胚で Ror1, Ror2 共に強い発現が認められ、その後 10.5 日胚では Ror1 は肢芽基部

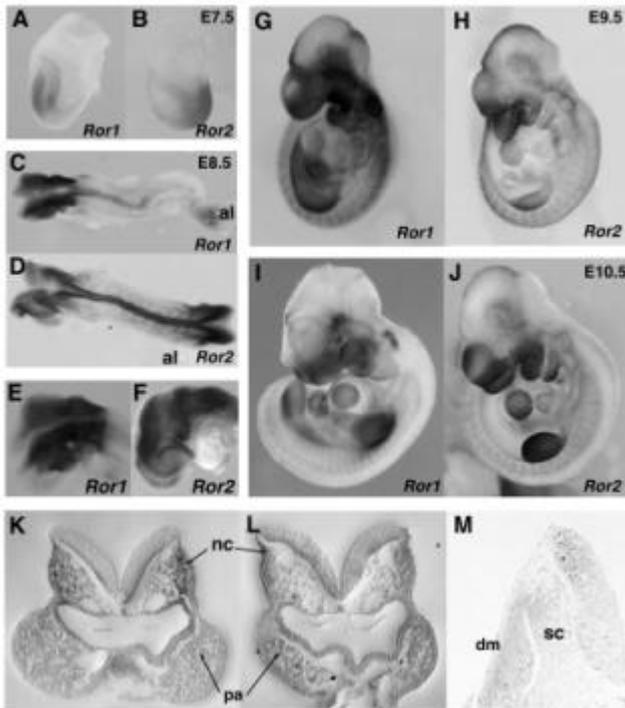


図 2 初期胚における Ror の発現動態

に局限して発現するに対し、Ror2 は肢芽全体に発現が認められた (図 2 G-J)。

次に初期発生過程以降の Ror1, Ror2 の組織、臓器形成過程における発現動態を検討したところ、13.5 日胚の心臓、肺において Ror1, Ror2 は発現が認められ、心臓においては、心筋、心室中隔、大動脈弁、心房に発現が認められるのに対し、心外膜にはいずれの発現も検出されなかった (図 3 A, B)。肺においては、Ror1, Ror2 ともに肺胞原基に発現が認められた。これらの結果と Ror2 遺伝子欠損マウスにおける心臓の形成不全や肺の機能不全との関連に興味を持たれる (図 3 C, D)。また、13.5 日胚の脳において Ror1 は殆ど発現していないのに対して、Ror2 は海馬神経上皮、尾状核、大脳辺縁系新皮質に発現が認められた (図 3 E, F)。また眼において、Ror1 はレンズ上皮に発現が認められるが、Ror2 の発現は

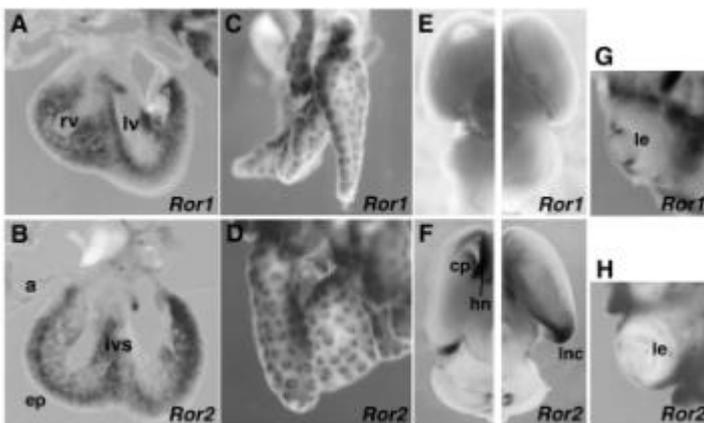


図 3 組織形成過程における Ror の発現動態

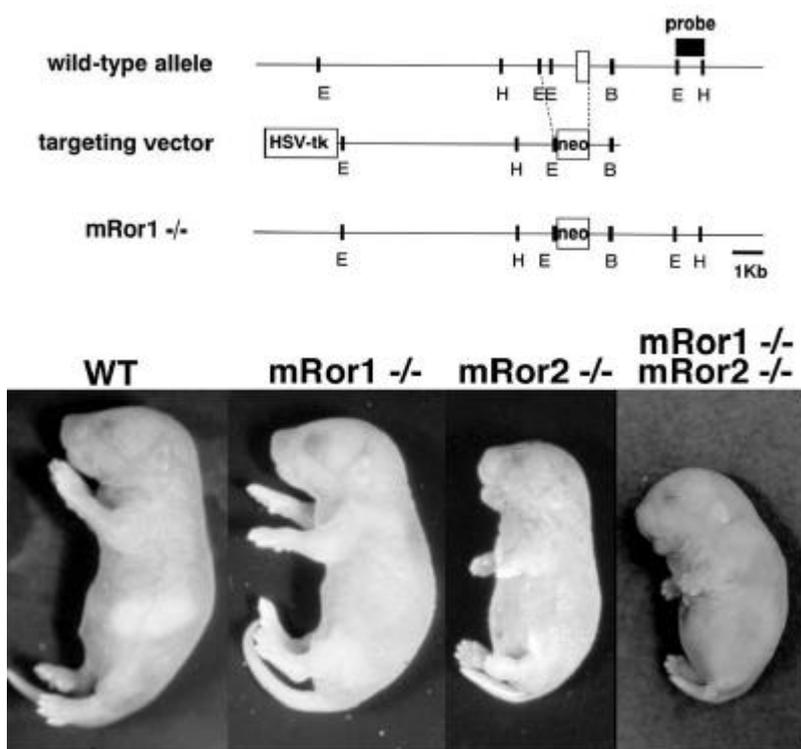


図4 Ror ノックアウトマウスの外観

を行うために Ror1 のノックアウトマウスを作製・解析すると共に Ror1, Ror2 のダブルノックアウトマウスの作製を行った。

図4に図示するように、Ror1 のイムノグリン領域を含むエクソンを欠失したノックアウトマウスの作製を試みた。Ror1+/- のヘテロマウスには妊性を含め異常は認められなかった。次に Ror1+/- マウスの交配により Ror1-/- マウス（ノックアウトマウス）を作出したところ、Ror2 ノックアウトと同様に、呼吸不全による新生児致死の表現型を呈した。組織学的解析の結果 Ror1 ノックアウトマウスは Ror2 ノックアウトマウスと同様に肺胞の拡張不全が認められた(図5)。Ror2 ノックアウトマウスは顔面、肋骨、椎骨、四肢の骨格形成不全等の形態形成の異常が認められるが、Ror1 欠損マウスは顕著な形態の異常は示さなかった(図4)。Ror1, Ror2 は構造が類似し、発生過程における発現動態も重複する部分が多いため、Ror1 ノックアウトマウスにおいて Ror1 の機能を Ror2 が代償する可能性が考えられた。そこで、Ror1+/- マウスと Ror2+/- マウスを交配し、得られた Ror1+/- ; Ror2+/- マウスを交配し、Ror1/Ror2 のダブルノックアウトマウスを作出した。Ror1/Ror2 の

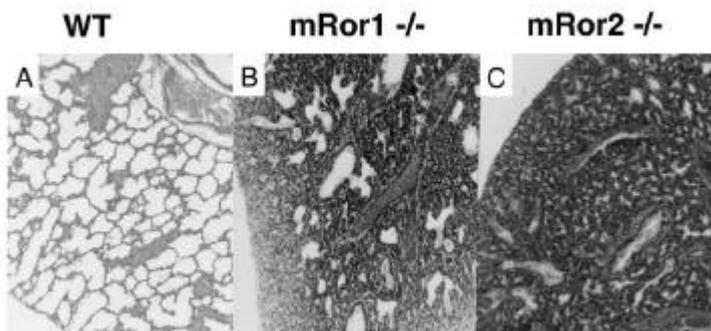


図5 Ror ノックアウトマウスの肺

観察されなかった(図3 G, H)。

Ror1, Ror2 は相互に構造が類似するのみならず、発生過程における発現動態は顔面、肢芽、心臓、肺において時間的・空間的に少なくとも部分的に一致することが明らかとなり、Ror1 も Ror2 同様形態形成過程に参与する事が予想される一方で、Ror1, Ror2 の機能的な連関(相互作用や機能の重複性)の可能性が強く示唆された。これらの点について解析

ダブルノックアウトマウスは外観上 Ror2 ノックアウトマウスの表現型をより増強させたような表現型すなわち、より重篤な体全体の矮小化、四肢・尾の短縮、顔面の低形成が認められた(図4)。

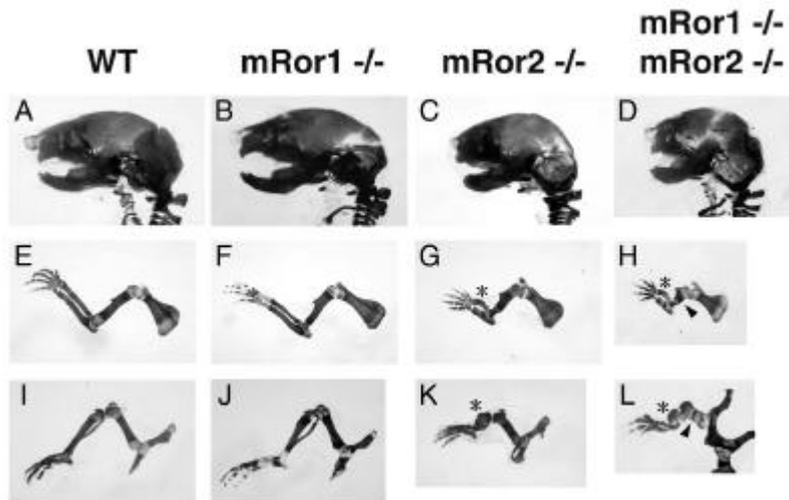


図 6 Ror ノックアウトマウスの頭部、四肢骨格

マウスにおいて軸骨格系・付属肢骨格系ともに Ror2 ノックアウトマウスよりも重篤な異常（遠位・近位長管骨、頭蓋骨、上顎・下顎、椎骨、肋骨、恥骨、胸骨の低形成や形成不全、形成異常）が認められると共に心室中隔の欠損に加え大血管の転位が認められた(図 6,7)。これらのことから、Ror1 ノックアウトマウスにおいて Ror2 が Ror1 の機能を代償していることならびに、Ror1 が Ror2 と同様に骨格系及び心臓・大血管系の形成に関与することが明らかとなった。加えて、Ror1/Ror2 のダブルノックアウトマウスが Ror1, Ror2 それぞれのノックアウトマウスでは認められない幾つかの表現型を呈することから、Ror1, Ror2 は発生過程において相互作用することが遺伝学的に強く示唆された。

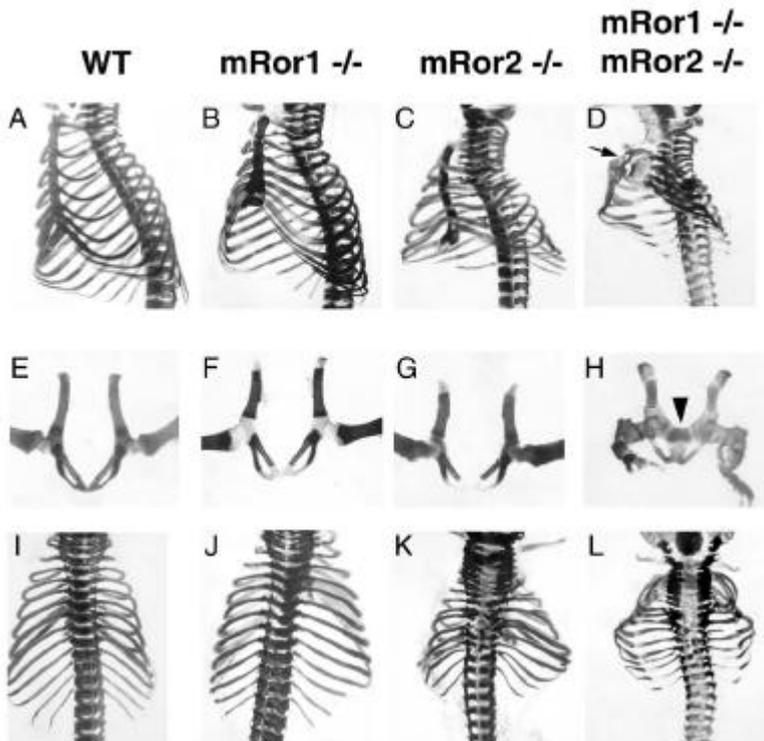


図 7 Ror ノックアウトマウスの軸骨格

Ror2 ノックアウトマウスでは顔面、肋骨、椎骨、四肢(特に遠位長管骨)の骨格形成不全や心室中隔欠損等の形態形成の異常が認められた(図 6,7)。一方 Ror1 欠損マウスは顕著な形態の異常は示さないが、Ror1/Ror2 のダブルノックアウト

4 .研究がもたらす効果および波及効果

本研究により、Ror2 は骨形成をはじめとした発生過程における Ror1 の機能を代償しうること、Ror1 も Ror2 と同様に呼吸器、循環器系の形成過程や四肢形成並びに骨軟骨形成過程に関与すること、Ror1, Ror2 が相互作用し、形態形成を制御し得ることが明らかとなった。また、ノックアウトマウスの解析結果と発生過程における発現動態解析から、Ror1,

Ror2 が主に神経堤細胞や間葉系細胞の増殖、分化、移動の過程で機能することが強く示唆された。シグナル伝達を含め、Ror1, Ror2 の分子機能については未解明の点が多く今後の課題であるが、Ror1, Ror2 が生体において協調的に働くことから Ror1, Ror2 シグナルのクロストーク機構が存在することが予想される。

Ror1, Ror2 ノックアウトマウスは新生児致死の表現型を呈するため、ノックアウトマウスを用いた生後個体における機能解析は不可能であるが、この問題を解決するために、現在 Cre-LoxP システムを用いた細胞種・組織特異的 Ror1, Ror2 変異マウスの作製を試みており、生後における Ror1, Ror2 の機能解析や、これらを疾患モデルとした病態解析が可能になることが強く期待される。

5. 参考文献

- (1) Oishi I et al.: Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system. *Genes Cells*. 1999 Jan;4(1):41-56.
- (2) Takeuchi S et al.: Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells*. 2000 Jan;5(1):71-8.
- (3) Oldridge M et al.: Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet*. 2000 Mar;24(3):275-8.
- (4) Afzal AR et al.: Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet*. 2000 Aug;25(4):419-22.
- (5) van Bokhoven H et al.: Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet*. 2000 Aug;25(4):423-6.
- (6) Schwabe GC et al.: Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet*. 2000 Oct;67(4):822-31.
- (7) Matsuda T et al.: Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mech Dev*. 2001 Jul;105(1-2):153-6.
- (8) Nomi M et al.: Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 2001 Dec;21(24):8329-35.