

令和元年6月17日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02618

研究課題名(和文) 左右非対称形成の解明 Hippoシグナルと新規調節因子の同定

研究課題名(英文) Deciphering of left-right asymmetry -Identification of new molecules during L-R determination and proof of

研究代表者

望月 直樹 (MOCHIZUKI, NAOKI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究所長

研究者番号：30311426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：体の中で左右非対称性の臓器(心臓、肝臓、消化管)が配置される機構の解明を目指した。哺乳類にはノードが発生期に一過性に形成され、その内部の繊毛が回転することで左右差が生じると言われているが、ゼブラフィッシュのクッパ 胞(ノードに相当)を生きたまま可視化することで検討した。クッパ 胞形成とHippo シグナルの形成は関係がないが、クッパ 胞の形成以前にカルシウムシグナルの活性化が生じていることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象の根幹である体の前後、背腹、左右を決定する機構の解明は発生学、生物学の問題として重要である。この中で本研究では、左右差形成機構の解明を目的とした。クッパ 胞という発生時に一過性に生じる器官内に流れが生じて左右決定因子の不均衡分布が生じることが、左右差決定の古典的なメカニズムと考えられてきた。しかし、本研究でクッパ 胞の内腔が形成される以前からカルシウムの濃度の不均一性がクッパ 胞形成細胞群に見られることがわかり、新たな左右差形成機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Left-right asymmetry is essential for body planning as well as anterior-posterior and dorsal-ventral axes. We focused on the mechanism by which kupffer's vesicle (KV) and cilia in the KV are organized during zebrafish embryogenesis. In the classical pathway, left-right flow in the KV promoted by the rotation of cilia results in the asymmetric distribution of factors that determines the localization of progenitor cells of organs.

We developed transgenic zebrafish lines that enabled us to monitor KV cells and cilia and that enables us to visualize Ca oscillation in the KV cells. By monitoring the KV formation and cilia development, we demonstrated that Ca oscillation starts before the lumen forms inside of the KV, suggesting that Ca oscillation does not depend on the flow caused by the rotation of cilia. Furthermore, we found that Hippo signaling is dispensable for KV formation followed by cilia formation but indispensable for correct organ distribution.

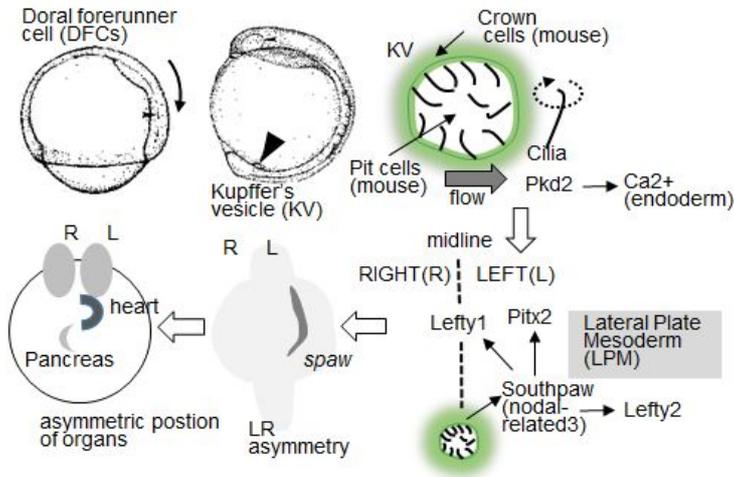
研究分野：循環発生生物学

キーワード：左右差 クッパ 胞 Hippo シグナル ゼブラフィッシュ 繊毛 発生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体軸形成のなかで左右軸の異常は、臓器の左右位置異常として明らかとなる(ヒトでは心尖部が左向き、肝臓が右側、脾臓が左側、脾頭—尾部が右から左に向かうが左右軸形成障害によってこれらの臓器の配置が変わる)。現在までにこの左右非対称は、脊椎動物の発生初期に一過性に形成される Node (マウス)あるいは Kupffer's vesicle (KV、ゼブラフィッシュ)に依存していることが明らかになっている。Node, KV に形成される cilia (繊毛) の回転運動による流れ(左向き)が、周囲の細胞の活性化(Ca^{2+} の活性化)の左右差を生じる。右図に示すように、左右差が側板中胚葉(LPM)での TGF- β ファミリー分子に属する Nodal, Lefty ファミリー分子の発現の左右差を引き起こすことが証明されてきた。Nodal (ゼブラフィッシュでは Southpaw) シグナルの下流で左右差を決定する因子としては、Pitx2 が代表として調べられている(非対称性決定のドグマ)。



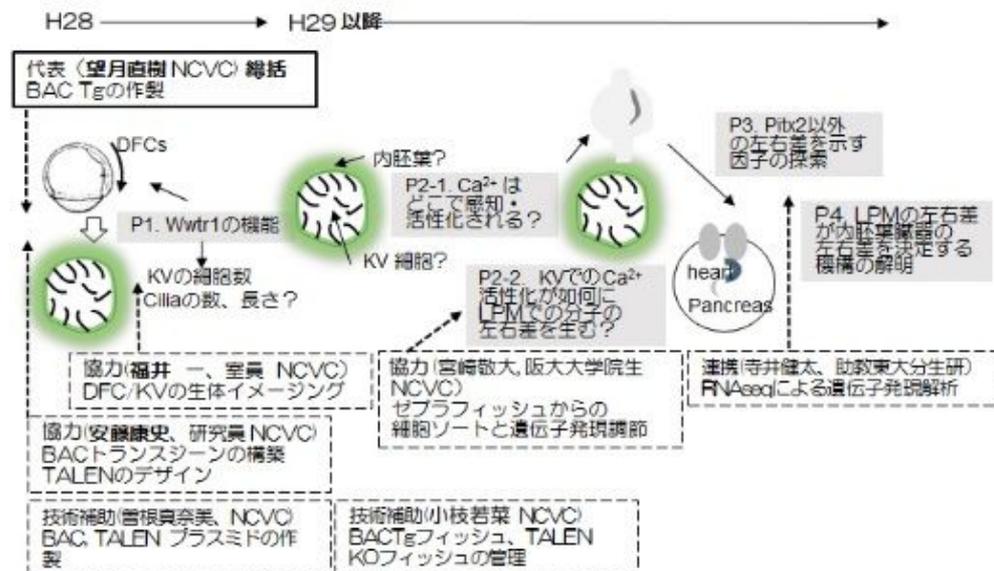
以上の情報伝達系が如何にどの時点で機能することは、解剖学的なKV形成や繊毛形成がどの時点でどのような情報伝達系に作用して生じるのか？また、どのような情報伝達系と構造との関係はどのように成立しているのかは、不明であった。

2. 研究の目的

DFCs の移動に始まり、最終的に臓器(心臓や脾臓など)の非対称配置に至る左右非対称が生じる情報伝達分子の発現まで未解明な点を明らかにする。特に Hippo シグナル分子の関わりと、新規左右非対称性を誘導する分子の同定も行いながら左右非対称臓器配置の分子メカニズムを突き止めることを目標とする。以下の点を具体的目標(ロードマップ目標として研究する)。

- Object 1 Wwtr1 が DFCs の移動を制御しているのかを明らかにする。もし、移動制御に関係ない場合にはKV形成の細胞の数・質の調整にかかわるのか？また、Wwtr1 が cilia 形成に直接かかわる転写共役因子として機能するのかを明らかにする。
- Object 2 KV 周囲での左右差感知機構としてゼブラフィッシュでも Ca^{2+} 感知機構が機能して、LPM での分子発現の差を生じることに不可欠な感知機構であるかを検証する。
- Object 3 KV 周囲何なる分子が、LPM での Southpaw 発現の差を生むのかを明らかにする。
- Object 4 Pitx2 以外の発現に左右差が生じている分子がないか？を探索する。
中胚葉臓器の心臓だけでなく内胚葉臓器の脾臓、肝臓の左右差を LPM で発現する分子がどのように位置決めをしているのか、その情報伝達を明らかにする。

3. 研究の方法



上記に従って3年間で目標を達成する計画とした。

本研究計画では、ゼブラフィッシュの発生における Hippo シグナルの左右非対称での役割の解明と既知分子以外の未同定左右非対称誘導因子の同定を計画する。

1. BAC クローントランスジェニック(Tg)作製とTALEN のによる遺伝子破壊操作による DFC から KV 形成の可視化を行うことで Hippo シグナルの左右非対称性形成への関与を検討する。
2. KV あるいは内胚葉特異的 BAC-Tg で Ca^{2+} センサープローブによる Ca^{2+} シグナルの活性化の可視化と optogenetics による Ca^{2+} 活性誘導による左右非対称誘導機構を解明する。

KV, LPM, 内胚葉特異的に蛍光を発現する BAC-Tg を用いて、細胞分取により部位特異的に発現する遺伝子を探索する。

Plan (P)1. DFC 移動と KV 形成における *Wwtr1* の機能解析のために DFC 特異的に蛍光を発現する Tg フィッシュを作製する。DFC の KV への移動と KV 形成に至るまでの過程を可視化し調べる。

P2-1. 左右非対称性確立のための Ca^{2+} 感知機構を明らかにする(KV 内なのか?それとも KV 周囲の内胚葉細胞群なのか?を明らかにする)。

P2-2. 左右非対称の Ca^{2+} を観察できた場合には、 Ca^{2+} の左右非対称性活性化が LPM での左右非対称遺伝子発現を誘導するのに必要・十分であるかを検証する。このために、人為的に Ca^{2+} を反対側で活性化した場合に、LPM での左右に逆転が生じるかを明らかにする。

P3. LPM での *pitx2* 以外の分子の非対称発現分子の探索

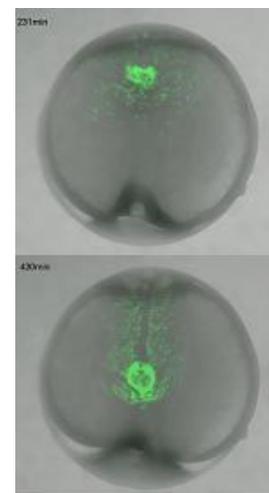
P4. LPM の左右差が内臓の左右差を決定する機構の解明

本研究で必要な Tg KO ゼブラフィッシュ個体を下記に列挙して作製する。

- DFC を特異的に可視化するフィッシュとして、
TgBAC(*lrdr1*:mVenus):DFC 特異的にプロモーターが活性化する *left-right dynein-related1* (*lrdr1*) 遺伝子を含む BAC クローンを入手して *lrdr1* プロモーター下流で folding が早い蛍光蛋白質 monomeric (m)Venus を発現する Tg
あるいは、TgBAC(*cftr*:GV(Gal4/VP16)):KV 細胞特異的にプロモーターが活性化する遺伝子として報告されている chloride channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Cftr)遺伝子の下流で GV を発現する Tg
- 繊毛を可視化するフィッシュとして
TgBAC(UAS:Arl13b-EGFP/ mCherry)の作製:GV の UAS 結合により、両方向性に mCherry と Arl13b-EGFP を発現する個体を作製する。
- Ca^{2+} の可視化フィッシュとして
Tg(*sox17*:GV);(UAS:GCamp7) の作製: Ca^{2+} の細胞内増減を生体で検出するためには、 Ca^{2+} 検出プローブ(GCamp7)の組織特異的発現 Tg が必要である。Gal4/UAS システムを用いて KV 周囲内胚葉で活性化する *sox17* プロモーターを用いて本 Tg フィッシュを樹立する。*sox17* プロモーターが KV 周囲の細胞で活性化することは、右図で示すように既に確認済みであり、このプロモーター下流に GV を発現する個体を作製し、Tg(UAS:GCamp7) と交配することにより作製可能
- 左右差を持って発現すると言われている中胚葉マーカ 遺伝子を可視化する個体として
TgBAC(*tdgf1*:GV);(UAS:mVenus), TgBAC(*spaw*:GV);(UAS:mCherry),
TgBAC(*lefty1*:GV);(UAS:mTurquoise) を作製する。
- 臓器配置を可視化する個体として
膵臓の可視化個体 Tg(*ins*:mCherry) 心臓の可視化個体
Tg(*myl7*:tEOS) (cardiac myosin light chain (*myl7*) を作製する。

4. 研究成果

(1) 当該研究遂行のために必要な、Tg KO フィッシュを作製した。ただ、DFCsの可視化は SOX17 promoter を用いることで、*lrdr1* や *cftr* promoter を用いなくても十分に観察が可能であることが判った。このために、Tg(*sox17*:egfp) Tg(*sox17*:gal4FF) を作製して、KV の形成と KV の内腔の形成、頭側から尾側への移動を可視化した。右図に示すように、頭側で GFP 陽性細胞群が尾側に移動して、GFP 陰性細胞群(内腔)を囲むように KV を形成することがわかった。この個体と *Wwtr1* ^{-/-} あるいは *Yap* ^{-/-} 個体で KV の大きさを調べることで、Hippo シグナルと KV 形成能を調べた。*Wwtr1 Yap* の単独欠損個体では、KV の大きさや内腔の大きさに相違は認めなかった。さらに *Wwtr1 Yap* の両者欠損個体でも大きな欠損は認めなかった。



Tg(*sox17*:EGFP) による内胚葉 DFCs の可視化
上段 DFCs が GFP 陽性となる:下段 DFC 陰性箇所が内腔と考えられる

(2) Tg(UAS:GCaMP7)との交配により、KV 内の Ca²⁺の活性化も可能であった。Ca²⁺ の活性化を時間経過とともに観察すると DFCs が頭側に位置している初期のほうが Ca²⁺ oscillation が頻回にみられ、尾側に DFCs が移動するとともに Ca²⁺ oscillation が減弱することが判った。また、右図に示すように Ca²⁺ oscillation の頻度と左右差を検討したところ明らかに左右差を認めなかった。前述したように、尾側側に KV 形成細胞が移動して、内腔が形成されると oscillation が減弱することから、Ca²⁺ が繊毛形成依存性に誘導されるというこれまでの説とは違う機構が DFCs 内で機能していることが示唆された。

(3) KV 内繊毛形成も可視化した。Tg(actb1:arl13b-EGFP) を作製して繊毛を可視化した。KV を Tg(sox17:mCherry) で見ることにより、KV 内の繊毛を限定的に可視化できることがわかった。この個体を用いて、定量的に KV 内繊毛数、長さを調べた。野生型と Wwtr1 欠損個体、Yap 欠損個体の繊毛形成への効果を検討した結果単独では大きな差がないが、両者欠損個体では、本数・長さともに弱体化減少した。

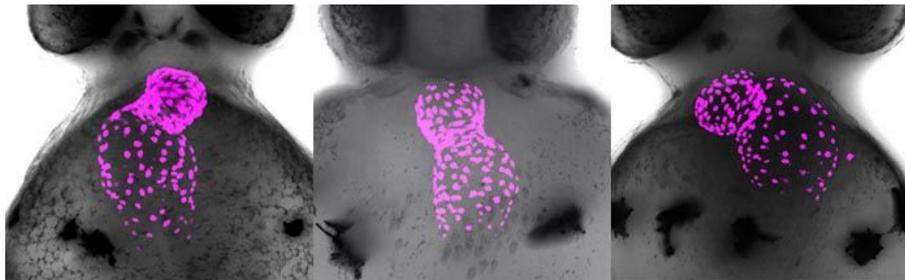
(4) 左右差を可視化できる個体として、Tg(spaw:YFP),

Tg(pitx2:mCherry)を作製した。心臓

と脾臓をそれぞれ可視化する個体も作製した。さらに、中胚葉由来の細胞を検出できる TgBAC(draculin:mCherry) を作製して中胚葉臓器の左右差を確認することを試みた。Draculin が両側中胚葉で陽性になり、その後に片側臓器で陽性になることから、Draculin 陽性細胞の移動を調節する分子が左右を決定する因子となっていることを突き止めた。

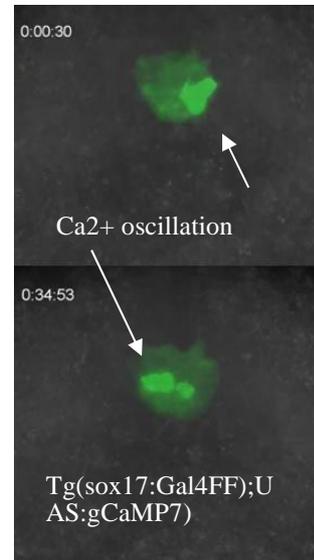
(5) Tg(sox17:EGFP) 陽性細胞を FACS で回収して、RNA-seq を行うことで、DFCs で左右非対称性を決定する遺伝子発現の有無の検討を開始した。本研究終了時点では、未達となったが、継続する予定である。

(6) Wwtr1 Yap の遺伝子欠損と心臓の looping の関係について、Wwtr1^{+/-} Yap^{+/-} の個体を交配して、心臓の位置を調べることで Hippo シグナルと左右非対称性を調べた。Tg(myl7:mCherry) 個



Tg(myl7:mCherry) 個体で Wwtr1 Yap の遺伝子破壊を TALEN で作製して交配することにより心臓の位置と Hippo シグナルの関係を調べた

体で Wwtr1, Yap のそれぞれ欠損個体を作製して心臓の形態を左図のように調べた結果、Wwtr1^{-/-} Yap^{+/-} 個体で looping 異常を認めたことから、Hippo シグナルが左右非対称性に関わることがわかった。



Tg(sox17:Gal4FF);(UAS:GCaMP7) 胚で KV 形成細胞の Ca²⁺ を観察。緑が Ca²⁺ の増加した細胞を示す。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

- (1) Fukui H, Miyazaki T, Cow RWY, Ishikawa H, Nakajima H, Vermot J, Mochizuki N. Hippo signaling determines the number of venous pole cells that originate from the anterior lateral plate mesoderm in zebrafish. **eLIFE**2018 doi: 10.7554/eLife.29106.
- (2) Miyazaki T, Otani K, Chiba A, Nishimura H, Tokudome T, Takano-Watanabe H, Matsuo A, Ishikawa H, Shimamoto K, Fukui H, Kanai Y, Yasoda A, Ogata S, Nishimura K, Minamino N, Mochizuki N. A New Secretory Peptide of Natriuretic Peptide Family, Osteocrin, Suppresses the Progression of Congestive Heart Failure After Myocardial Infarction. **Circ Res**. 2018 Mar 2;122(5):742-751
- (3) Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, Terai K, Fukui H, Fukuhara S, Ando K, Miyazaki T, Yokota Y, Sxhmelzer E, Belting H, Affolter M, Lecaudey V., Mochizuki N. Flow-dependent endothelial YAP regulation that contributes to vessel maintenance. **Dev. Cell** 40: 523-536 e6. Doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.019, 2017
- (4) Bower NI, Koltowska K, Pichol-Thievend C, Virshup I, Paterson S, Lagendijk AK, Wang W, Lindsey BW, Bent SJ, Baek S, Rondon-Galeano M, Hurley DG, Mochizuki N, Simons

- C, Francois M, Wells CA, Kaslin J, Hogan BM. Mural lymphatic endothelial cells regulate meningeal angiogenesis in the zebrafish. **Nat Neurosci.** 2017 Jun;20(6):774-783. doi: 10.1038/nn.4558. Epub 2017 May 1.
- (5) Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y, Iba T, Wakabayashi T, Muramatsu F, Kidoya H, Fukuhara S, Mochizuki N, Ishii S, Kishima H, Takakura N. Lysophosphatidic Acid Receptor 4 Activation Augments Drug Delivery in Tumors by Tightening Endothelial Cell-Cell Contact. **Cell Rep.** 2017 Aug 29;20(9):2072-2086. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.080.
- (6) Kärpanen T, Padberg Y, van de Pavert SA, Dierkes C, Morooka N, Peterson-Maduro J, van de Hoek G, Adrian M, Mochizuki N, Sekiguchi K, Kiefer F, Schulte D, Schulte-Merker S. An Evolutionarily Conserved Role for Polydom/Svep1 During Lymphatic Vessel Formation. **Circ. Res.** 2017 Feb 8. pii: CIRCRESAHA.116.308813. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308813
- (7) Morooka N, Futaki S, Sato-Nishiuchi R, Nishino M, Totani Y, Shimono C, Nakano I, Nakajima H, Mochizuki N, Sekiguchi K. Polydom Is an Extracellular Matrix Protein Involved in Lymphatic Vessel Remodeling. **Circ. Res.** 2017 Feb 8. pii: CIRCRESAHA.116.308825. doi: 10.1161/ CIRCRESAHA.116.308825.
- (8) Chiba A, Watanabe-Takano H, Terai K, Fukui H, Miyazaki T, Uemura M, Hashimoto H, Hibi M, Fukuhara S, Mochizuki N. Osteocrin, a secretory peptide from heart, contributes to cranial osteogenesis in zebrafish. **Development** 144: 334-344, 2017

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) Naoki Mochizuki. Ang1/Ang2-Tie1/Tie2 signaling for hematovascular development in zebrafish. (口頭) International Vascular Biology Meeting 2018 Jun1-4th Helsinki Finland
- (2) Naoki Mochizuki The Responses of Endothelial Cells to the Flow. (口頭). World Clinical Pharmacology Meeting 2018. July 6, 2018 Kyoto
- (3) Naoki Mochizuki. The responses of endothelial cells to the flow, Keystone Symposium 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.z-cv.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 施設外分担者無し

(2)研究協力者 (国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部所属)

研究協力者氏名：福井 一

ローマ字氏名： Hajime Fukui

研究協力者氏名：安藤 康史

ローマ字氏名： Koji Ando

研究協力者氏名：宮崎 敬大

ローマ字氏名： Takahiro Miyazaki