

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18551

研究課題名(和文) 心臓形成に寄与する神経堤細胞の分化決定機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cell fate determination in the cardiac neural crest

研究代表者

松花 沙織 (Matsuhana, Saori)

神戸大学・理学研究科・助教

研究者番号：70767251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心臓神経堤細胞は耳胞から第3体節に位置する神経堤領域から生じ、心臓流出路などの心臓形成に貢献する。心臓神経堤細胞は他の神経堤細胞とは異なる特有の分化運命決定機構をもつと考えられているが、その機構は未だ不明である。本研究では、ニワトリ胚を用いて心臓神経堤特異的な遺伝子としてMafBを同定し、その機能解析を行なった。その結果、MafB遺伝子が心臓神経堤の発生及び心臓神経堤細胞における神経堤遺伝子発現に必須であることを明らかにした。さらにMafBが心臓神経堤細胞では神経堤マーカー遺伝子sox10の発現を直接制御することを示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓神経堤細胞は心臓循環器形成において重要な細胞群であり、心臓神経堤細胞の欠損や分化異常は、先天性心疾患を引き起こすことが報告されている。本研究ではニワトリ初期胚の心臓神経堤細胞において特異的に発現する遺伝子としてMafB遺伝子を同定し、この遺伝子が心臓神経堤の発生において必須な役割を持つことを示した。MafBを系口として心臓神経堤細胞の運命決定機構を明らかにすることで、心臓神経堤細胞に関連した先天性心疾患を引き起こす作用機序の解明やその治療法の確立に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells are a multipotent cell population, unique to vertebrate embryos. They arise from dorsal neural tube along the body axis, migrate extensively throughout the body and differentiate to a variety of cell types. The 'cardiac neural crest' is a subdivision that arises from the neural tube at the post-otic to 3rd somite level and contribute to cardiovascular morphogenesis including septum of the outflow tract. In this study, we showed that MafB is specifically expressed in cardiac neural crest cells. Next we tested the role of MafB using loss of function approaches. The results show that MafB is necessary for cardiac neural crest development and functions as a direct regulator of sox10 expression in the cardiac neural crest.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：心臓神経堤細胞 遺伝子制御ネットワーク 心臓発生

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は多分化能と移動能をもち、脊椎動物の発生を支える重要な細胞群である。これらは神経管形成期に背側神経管から生じ、遊走細胞となり、決まった経路を移動する。そして末梢神経、心臓、頭部の骨格、色素細胞など多岐に渡る細胞種へと分化する。神経堤細胞はその由来する領域により5つに区分される。多分化能を有する神経堤細胞の運命決定には、その由来する領域・移動開始時期・移動経路が大きく影響する。しかし、心臓部から生じる心臓神経堤細胞は例外である。心臓神経堤細胞は、耳朮から第3体節に位置する神経堤領域から生じ、第3、4、6咽頭弓を通して大動脈管や甲状腺、副甲状腺、胸腺をつくる。さらに移動した心臓神経堤細胞は、心臓原基内に入り込み、心臓流出路や心臓の大動脈と肺動脈間の隔壁をつくる。心臓神経堤細胞を切除した胚は主にこの隔壁欠損を引き起こし、総動脈幹遺残症 (PTA; Persistent Truncus Arteriosus) という重大な心疾患に至る。さらに、多分化能を有する他の神経堤細胞を心臓神経堤細胞と置換移植しても、この隔壁欠損の表現型を免れることはできない (Kirby et al., *Dev Biol*, 1989)。つまり、この隔壁の形成は心臓神経堤細胞にしか成し得えず、他の神経堤細胞とは異なる独自の性質をもつと考えられる。そこで、心臓神経堤細胞には他の神経堤細胞にはない特異な遺伝子制御機構が存在すると考えられる。しかし、その分子機構は未だ不明である。

申請者はこれまで神経堤細胞研究のモデル生物であるニワトリ胚を用いて、心臓神経堤細胞で特異的に働く遺伝子の同定を行ってきた。神経堤細胞特異的に発現するレポーター遺伝子を用いて、神経堤細胞を生きたニワトリ胚で GFP 標識し、その GFP 標識した心臓神経堤細胞を Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) により単離し、次世代シーケンサーを用いて全転写産物解析を行った。これにより、心臓神経堤細胞で発現する遺伝子を網羅的に同定することに成功した。

2. 研究の目的

心臓神経堤細胞には、基本的な神経堤遺伝子による制御機構に心臓神経堤遺伝子が組み込まれることで、特殊な遺伝子制御ネットワークを構築していると考えられる。申請者のこれまでの研究から多数の心臓神経堤遺伝子を同定したが、その多くは心臓神経堤での機能が不明である。本研究課題では、ニワトリ胚を用いて心臓神経堤特異的に発現する遺伝子の機能を解析し、心臓神経堤細胞における遺伝子制御ネットワークを明らかにすることで、心臓神経堤細胞の特殊な細胞分化決定機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 作製した心臓神経堤細胞における遺伝子発現プロファイルをもとに、頭部神経堤細胞における同様の実験から得られた遺伝子発現プロファイルデータ (Simões-Costa et al., 2012) と比較し、心臓神経堤特異的な遺伝子の同定を行った。さらに、それらの遺伝子の発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーションによって解析した。

(2) (1) で得られた遺伝子のうち、転写因子をコードする *MafB* 遺伝子の機能を明らかにするため、*MafB* の機能阻害ニワトリ胚を作製した。機能阻害には、モルフォリノオリゴによる *MafB* タンパク質の翻訳阻害、*MafB* 転写活性能を失ったドミナントネガティブ変異体、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウトの3種類の手法を用いた。*MafB* 機能阻害胚を用いて、免疫染色や *in situ* ハイブリダイゼーションにより神経堤マーカーの発現を解析した。

(3) 神経堤マーカー遺伝子 *sox10* と *MafB* の制御関係について検討した。*sox10* 神経堤特異的エンハンサー (E2) の塩基配列において、*MafB* の結合モチーフの有無を転写因子結合プロファイルデータベース JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>) を用いて調べた。さらにその結合モチーフに塩基置換を導入した変異レポーターを作製し、ニワトリ胚内でそのレポーター活性を解析した。

4. 研究成果

(1) 心臓神経堤特異的な遺伝子の同定

心臓神経堤細胞における遺伝子発現プロファイルから、まず転写因子のみを抜き出した。次に、頭部神経堤細胞における同様の実験から得られた遺伝子発現プロファイル (Simões-Costa et al., 2012)との比較により、頭部神経堤細胞や全ての神経堤細胞で発現している遺伝子を差し引くことにより、心臓神経堤特異的な遺伝子の同定を行った。その結果、心臓神経堤特異的な30の転写因子の同定に成功した (図1)。

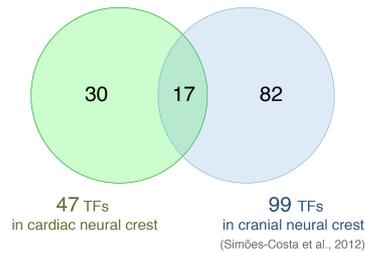


図1. 心臓神経堤細胞及び頭部神経堤細胞において発現する転写因子 (TF)の比較

さらに、これらの遺伝子の発現様式をin situハイブリダイゼーションにより解析した。その結果、発生初期に発現する心臓神経堤特異的な遺伝子として*MafB*遺伝子を新規に見出した。

(2) 心臓神経堤細胞における*MafB*遺伝子の機能

*MafB*遺伝子の機能解析を行うため、モルフォリノオリゴを用いたノックダウン実験を行った。この胚を用いて、神経堤マーカー抗体HNK-1を用いた免疫染色を行なったところ、心臓神経堤細胞特異的にシグナルが減少した。よって、*MafB*は心臓神経堤の発生に必須であることがわかった。

さらに、in situハイブリダイゼーションによる神経堤マーカー (*sox10*, *Ets1*, *krox20*, *MafB*) の発現を検出したところ、心臓神経堤細胞において著しいシグナル低下が見られた。また*MafB*のドミナントネガティブ型変異胚やCRISPR/Cas9によるノックアウト胚においても、同様の結果が得られた。よって*MafB*が心臓神経堤細胞における神経堤遺伝子の発現に必須であることが示された。

(3) 心臓神経堤細胞における*MafB*による*sox10*発現調節機構

心臓神経堤遺伝子として同定した*MafB*による神経堤マーカー遺伝子*sox10*への発現制御を明らかにする実験に取り組んだ。ニワトリでは*sox10*の神経堤特異的なエンハンサーが既に同定されており、このエンハンサーを蛍光蛋白質発現ベクターに導入したレポーターコンストラクトが作製されている (Betancur et al., 2010)。まず転写因子結合プロファイルデータベースJASPARを用いて、*sox10*の神経堤特異的なエンハンサー*sox10E2*配列 (264bp)内に*MafB*の結合候補配列が3つあることを見出した。この部位にそれぞれ塩基置換を挿入した変異型*sox10E2*レポーターを作製し、ニワトリ胚内でその変異レポーター活性を検証したところ、3カ所のうち一カ所でレポーター活性の減少が観察された。さらに、*MafB*機能欠失胚においても、野生型*sox10E2*レポーターの活性が減少した。これらの結果から、*MafB*が心臓神経堤細胞での*sox10*の発現制御を行っていることを明らかにした。このことから、心臓神経堤細胞では*MafB*が*sox10*発現の直接のインプットとして働いていると言える。

(4) 心臓神経堤細胞特異的な遺伝子制御機構モデル

以上の結果から、*MafB*は心臓神経堤細胞における遺伝子制御ネットワークの中心的役割を担っていると考えられる。既に、*MafB*は*Ets1*とタンパク質レベルで結合すること、*sox10E2*エンハンサーの配列中に*Ets1*の結合配列が存在することが報告されている。*MafB*と*Ets1*の発現様式は、神経堤細胞において心臓神経堤細胞のみで重複している。本研究により、*MafB*と*Ets1*の複合体が心臓神経堤細胞特異的な遺伝子発現制御機構を生み出しているという新たなモデルを提示す

ることができた (図2)。これらの知見を研究協力者であるBronner博士 (カリフォルニア工科大)とともに論文にまとめ発表した。

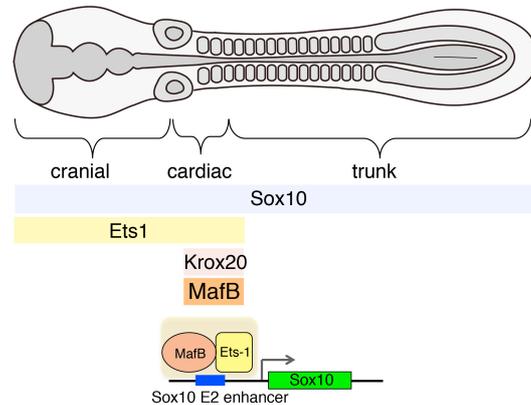


図2. 心臓神経堤細胞における MafB遺伝子機能のモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① [Saori Tani-Matsuhana](#), Felipe Monteleone Vieceli, Shashank Gandhi, Kunio Inoue, Marianne E. Bronner. Transcriptome profiling of the cardiac neural crest reveals a critical role for MafB. *Dev. Biol.* 査読あり, 444, 2018, pp. S209-S218, DOI:10.1016/j.ydbio.2018.09.015
- ② [Saori Tani-Matsuhana](#)^{*}, Rie Kusakabe, Kunio Inoue. Developmental mechanisms of migratory muscle precursors in medaka pectoral fin formation. *Dev Genes Evol.*, 査読あり, 28 (5), 2018, pp. 189–196, DOI:10.1007/s00427-018-0616-9, ^{*}corresponding author
- ③ Manami Kobayashi, [Saori Tani-Matsuhana](#), Yasuka Ohkawa, Hiroshi Sakamoto, Kunio Inoue. DND protein functions as a translation repressor during zebrafish embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読あり, 484, 2017, pp. 235-240, DOI:10.1016/j.bbrc.2017.01.080

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① [Saori Tani-Matsuhana](#), Kunio Inoue, Marianne E. Bronner. Transcriptome analysis of the cardiac neural crest reveals a critical role for MafB. 41th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2AW-13-6, 1P-0395. Yokohama, Japan. (December 2018)
- ② [Saori Tani-Matsuhana](#), Felipe Monteleone Vieceli, Shashank Gandhi, Kunio Inoue and Marianne E. Bronner. Transcriptome analysis of the cardiac neural crest reveals a critical role for MafB. Developmental Biology 77th Annual Meeting. Portland, Oregon USA (July 2018)
- ③ [Saori Tani-Matsuhana](#), Kunio Inoue, Marianne E. Bronner. Transcriptome analysis of the cardiac neural crest reveals a MAFB gene regulatory subcircuit. Cell and Developmental Biology Meeting (Joint Annual Meeting of JSDB 51th and JSCB 70th). P3-039. Tokyo, Japan (June 2018)
- ④ [Saori Tani-Matsuhana](#), Kunio Inoue. The developmental mechanisms of fin muscle cells in medaka, *Oryzias latipes*. 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 1P-0851. Kobe, Japan. (December 2017)
- ⑤ Manami Kobayashi, [Saori Tani-Matsuhana](#), Yasuka Ohkawa, Hiroshi Sakamoto, Kunio Inoue. DND protein functions as a translation repressor during zebrafish embryogenesis. 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, Japan. (December 2017)
- ⑥ [Saori Tani-Matsuhana](#), Kunio Inoue. The developmental mechanisms of fin muscle cells in medaka, *Oryzias latipes*. 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. P205. Tokyo, Japan. (May 2017)
- ⑦ Manami Kobayashi, [Saori Tani-Matsuhana](#), Yasuka Ohkawa, Hiroshi Sakamoto, Kunio Inoue. DND

protein functions as a translation repressor during zebrafish embryogenesis. 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Tokyo, Japan. (May 2017)

〔図書〕（計 0 件）

○出願状況（計 0 件）

該当なし

○ 取得状況（計 0 件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/faculty/inoue.html>

http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-rna/html2/gyoseki_saori.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：マリアン ブロンナー

ローマ字氏名：Marianne Bronner

所属：カリフォルニア工科大学・教授

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。