

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17775

研究課題名(和文) ライブイメージングと定量化による心臓前駆細胞の移動制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis for the mechanism of cardiac cell migration with live-imaging and quantification

研究代表者

森田 仁 (Morita, Hitoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：20767701

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)：本研究では、脊椎動物の心臓形成のメカニズムのさらなる理解を目指し、モデル脊椎動物のゼブラフィッシュの初期胚を対象にして、心臓が形成される最初の段階で見られる細胞の移動がどのように起こるのかを、生きた状態のままの細胞の動きを時間を追って観察し、その速度などを計算することで明らかにすることに取り組んだ。本研究の結果、将来心臓になる心臓前駆細胞はそれ自身で移動する能力を有していても、その周囲の環境が適切に整っていないと正しい方向には移動できず、正常な心臓を形成することができないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで心臓形成の初期段階の細胞移動については心臓前駆細胞自身の移動能力の重要性が言われていたが、本研究で個々の細胞レベルでの観察と定量的解析を行ったことによって、前駆細胞の移動には細胞自身の移動能力だけでなく、その周囲の環境が細胞移動に適した状態になっていることが必要であることが明らかとなった。本研究結果によってヒトを含めた脊椎動物の心臓形成機構への理解が深まり、先天性心疾患の発症原因の解明やその予防につながるものが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, cell movements that occur in the early step of the heart formation were observed in embryos of zebrafish, one of the model organisms of vertebrates, with live-imaging and quantifying the speed of cells and so on to understand the mechanism of the heart formation of vertebrates. As a result of this study, it turned out that the migration of the cardiac progenitor cells that form the heart in the adult depended on the surrounding environment even if the cells can migrate on their own.

研究分野：発生生物学

キーワード：心臓形成 細胞移動 ライブイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の心臓形成の初期には、心臓前駆細胞が左右の体側から正中線に移動して融合することで将来の心臓が形成され始める。この細胞移動が正常に起こらないと正常な心臓が形成されず致死となる。心臓前駆細胞の移動についてはこれまで、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) シグナルの重要性が報告されているが、S1P シグナル関連分子が移動する心臓前駆細胞及びその周辺でどのように振る舞うのか、そして一連の細胞移動の流れの中でもどの過程に寄与しているのかといった詳細についてはほとんど分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物のモデルの一つであるゼブラフィッシュの初期胚を対象にして、心臓前駆細胞の移動の特徴を共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングとその定量化によって明確に捉え、正常個体と S1P シグナル欠損個体の心臓前駆細胞の移動を定量的に比較することによって、前駆細胞移動における S1P シグナルの寄与を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 心臓前駆細胞移動のライブイメージングの系の確立

心臓前駆細胞の動態解析を遂行する目的で、共焦点顕微鏡下で胚を長時間・安定的に観察するための培養条件・胚位置の固定方法、移動する細胞を明瞭に捉えるための顕微鏡の諸設定を検討する。心臓前駆細胞を他の細胞と区別して観察するため、心臓前駆細胞特異的マーカー遺伝子 (心筋ミオシン: *myl7*) のトランスジェニック系統を用いる。

#### (2) 顕微鏡画像データを解析するためのパイプラインの作成

顕微鏡画像から細胞動態の定量化を行うために、(1)で確立させた観察手法で得られる画像データをもとに、定量化に必要な量と質のデータが得られているかを確認し、定量解析に必要なパイプラインを作成する。具体的には、画像処理の手順の確立、定量化に必要な画像中のシグナルの効率の良い取得方法の検討、定量化したデータの表現・可視化方法の検討を行い、それぞれの段階で必要な (半) 自動化用のプログラムを構築する。

#### (3) 正常個体と S1P シグナル欠損個体での心臓前駆細胞移動のライブイメージングと定量化

心臓前駆細胞の移動における S1P シグナルの役割を細胞レベルで調べるため、(1)、(2)で観察手法と解析手順を確立した後、正常胚と S1P の輸送体 *Spns2* の変異体において、心臓前駆細胞の移動 (もしくは移動不全) を観察し定量化する。

#### (4) S1P シグナル関連分子の動態観察のためのノックイン系統の作製とライブイメージングによる分子動態の定量化

S1P シグナルの時空間制御と心臓前駆細胞の動態の関係性を明らかにする目的で、*Spns2* 及び S1P 受容体の一つである S1PR2 の発現動態を継時的に可視化が可能なトランスジェニック系統を作製する。具体的には、CRISPR/Cas9 によるマイクロホモロジー媒介末端結合を利用することで、目的遺伝子の遺伝子座に蛍光タンパク質をノックインし、それらの分子の発現を可視化できるゼブラフィッシュ系統を作製する。作製したノックイン系統を共焦点顕微鏡によってライブイメージングし、心臓前駆細胞が移動する時の *Spns2* と S1PR2 の分子動態を記録する。得られた画像データから分子の発現動態や細胞内局在を継時的に定量化し、心臓前駆細胞移動の定量化データと比較することによって前駆細胞移動時における各分子の動態の特徴を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 心臓前駆細胞移動のライブイメージングの系の確立

本研究ではまず、共焦点顕微鏡を用いて心臓前駆細胞の動態をライブイメージングで捉えるための系を確立させることを行った。心臓前駆細胞の可視化には、*Tg(my17:EGFP)* のトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用いた。共焦点顕微鏡下での観察は、受精後約 12 時間後の胚のうち十分な量の EGFP の蛍光強度をもつ胚を事前に蛍光実体顕微鏡を用いて選出しておき、その胚を 1.2% の低融点アガロース中に包埋して位置を固定して観察を行った。胚を包埋する際は、心臓前駆細胞が移動してゆく位置に留意して胚の向きを整えることで、より最適な画像の取得が可能となった。包埋した胚は 28.5 に設定した恒温槽中でライブイメージングを行った。蛍光画像取得の時間間隔は、取得後の画像から個々の細胞のトラッキングが可能であり、且つ心臓前駆細胞が正中線に到達するまでの長時間の観察終了後の胚にレーザー光による光毒性で発生異常が生じない程度の間隔を検討し、5 分ごとの画像取得が適当であることを見出した。これらの条件検討によって、心臓前駆細胞の移動を、移動開始間もない時点から正中線で融合するまでの期間にわたって個々の細胞レベルで捉えることが可能になった。このような長時間且つ細胞レベルにおける心臓前駆細胞移動のライブイメージングについて報告されている事例は国内外を含めてほとんど存在せず、本研究のアプローチの確立によって新たな発見が期待される。

#### (2) 顕微鏡画像データを解析するためのパイプラインの作成

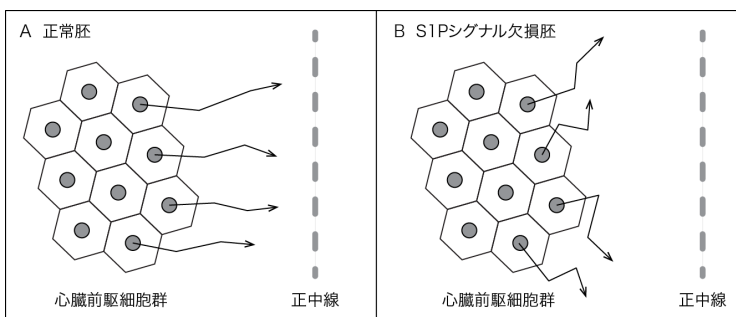
(1) のライブイメージングで得られた画像を元に細胞動態の解析を行うために必要な画像処理・解析方法の検討を行った。まず顕微鏡での画像取得中に胚全体がずれるようにして動くドリフト現象が起きていたため、蛍光画像と同時に撮影した明視野画像を指標に画像解析ソフト ImageJ のプラグインを用いて 3 次的にこれを補正した。続いて、補正した画像を元に画像解析ソフト Imaris を用いて各時点における細胞の位置を特定し、個々の細胞を継時的にトラッキ

ングすることが可能になった。

Imaris を用いた解析によって時間軸も含めた細胞動態の 4 次元的データが得られたので、続いてそのデータを元に数理解析ソフト Matlab を用いて定量的な解析を行うことで、細胞動態の特徴を抽出することを試みた。細胞動態の指標として基本的な、速度、移動方向に加え、正中線に対してどのような動きをするか、また個々の細胞同士の位置関係はどのように変化してどれくらい集団性を保って移動するかということを定量的に解析するためのプログラムを構築した。以上の画像処理、解析方法によって心臓前駆細胞移動の特徴が定量的に抽出できるパイプラインを確立することができた。心臓前駆細胞移動の定量化は既に報告されている事例があるが、本研究では長時間にわたって細胞レベルで観察したデータを元に定量化を行っているという点でこれまでにないアプローチであり、それによって新たな知見が得られることが期待される。

### (3) 正常個体と S1P シグナル欠損個体での心臓前駆細胞移動のライブイメージングと定量化

次に、これまで心臓前駆細胞の移動に関与することが示されてきた S1P シグナルが、どのようにして前駆細胞の移動に関与するのかを調べるために、S1P 輸送体である Spns2 の機能欠損個体を用いてその前駆細胞の動態解析を行った。解析する *spns2* 欠損個体は、*spns2* に対するモルフォオリノオリゴヌクレオチド (*spns2*-M0) を *Tg(my17:EGFP)* の胚に顕微注入して一過的にその機能を欠失させたノックダウン個体を用いた。*Spns2*-M0 注入胚はこれまで報告されていたように心臓前駆細胞移動の異常を示し、胚は心臓が体の左右に分かれた状態の二叉心臓の表現型となった。その胚の前駆細胞移動を本研究結果(1)と(2)の手法を用いてライブイメージングと定量解析をしたところ、細胞の移動速度は正常胚と *spns2* 欠損胚の間で大きな差は見られなかった。一方で細胞の移動方向については、正常胚の心臓前駆細胞はほぼ一貫して正中線に向かって移動しているのに対し、*spns2* 欠損胚の前駆細胞は比較的ランダムな移動方向を示すことが分かった(図)。この結果は、S1P シグナルが心臓前駆細胞の移動能自体を制御しているわけではなく、その他の要因(例えば心臓前駆細胞の周囲の環境)を制御することを通して前駆細胞移動に関与していることを示唆している。



図：心臓前駆細胞移動のトラッキング結果を示した模式図

(A) 正常胚。心臓前駆細胞は正中線(破線)に向かって移動する。(B) S1P シグナル欠損胚。心臓前駆細胞の移動方向は比較的ランダムになり、最終的に正中線にたどり着くことができない。図中の矢印がトラッキング結果を表す。

この結果は、S1P シグナルが心臓前駆細胞の移動能自体を制御しているわけではなく、その他の要因(例えば心臓前駆細胞の周囲の環境)を制御することを通して前駆細胞移動に関与していることを示唆している。これまで S1P シグナルは心臓前駆細胞の移動自体を制御すると考えられていたが、本研究での発見は S1P シグナルの新たな作用機序を介した前駆細胞移動への寄与を示唆するものであると言える。これは本研究において細胞レベルでの長時間にわたるライブイメージングのアプローチを取ったことによって可能になったことである。

### (4) S1P シグナル関連分子の動態観察のためのノックイン系統の作製とライブイメージングによる分子動態の定量化

S1P シグナル関連分子が移動する心臓前駆細胞周辺でどのような振る舞いを見せるかについて調べるため、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によって *spns2* と *s1pr2* の配列にそれぞれ *egfp* が結合するようにノックインしたゼブラフィッシュ系統を作成することを試みた。ノックインについては以前からその効率の低さが課題となっていたため、近年新たに報告された手法を導入するなどして改善を図った。しかしながら、現段階で目的とするノックイン系統を確立することができていない。今後はノックインの手法の改善を検討しつつ、過剰発現の系も試すことを視野に入れて取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hitoshi Morita
2. 発表標題 Interaction of cell migration and surrounding tissues during early cardiogenesis in zebrafish
3. 学会等名 日本発生生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----