

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02452

研究課題名(和文) Molecular regulation of mesothelial EMT in avian chorioallantoic fusion

研究課題名(英文) Molecular regulation of mesothelial EMT in avian chorioallantoic fusion

研究代表者

Sheng Guojun (Sheng, Guojun)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：20399439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類の漿尿膜は、外界とのガス交換を通して胚発生期の肺機能を担い、哺乳類胎盤の進化的起源でもある。本研究では、鳥類漿尿膜の初期発生段階である漿膜と尿膜の融合に着目した。初期融合は約6時間(E3.75-4.0)のうちに進展することを見だし、細胞組織解析、転写産物発現解析、組織移植によるキメラ解析、CRISPR転写活性調節などから初期融合を解析した。尿膜と漿膜双方の中皮EMTが融合に関与すること、尿膜中皮EMTは能動的かつ漿膜中皮EMTは受動的に起こること、EMT転写因子が漿尿膜融合中皮EMTに関与することなどを明らかにした。また、漿尿膜融合中皮EMTはpartial-EMTであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

This research has offered us better understanding of an important developmental process called "chorioallantoic fusion", the evolutionary precursor for mammalian placenta. Many pregnancy diseases are due to placental defects, of which this project helped us gain a better mechanistic understanding.

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the early phase of the formation of chorioallantoic membrane, which serves as the embryonic lung in avian development and is the evolutionary origin for mammalian placenta. We narrowed down the timing of initial fusion to E3.75 to E4, a short window of about six hours. We performed cell biological (through immunofluorescence and EM analyses), molecular (through RNA-seq and RNA in situ analyses), embryological (through graft and chimera analyses) and perturbation (through overexpression and CRISPR-based gene activation/inhibition) experiments. We showed that chorioallantoic fusion involved EMT of both mesothelial layers. We also showed that the allantoic mesothelial layer EMT is an active process, whereas chorionic mesothelial layer EMT is passive. We showed that EMT transcription factors were involved in chorioallantoic membrane fusion EMT and that this EMT could be considered as partial EMT.

研究分野：developmental morphogenesis

キーワード：mesothelium chicken chorion allantois EMT cancer

1 . 研究開始当初の背景

Mesothelial cells are derived from mesoderm germ layer. They are simple squamous epithelial cells lining the peritoneal, pleural, pericardial and extraembryonic coelomic cavities. Their physiological function is to secrete lubricants such as glycosaminoglycans and surfactant to prevent adhesions between the parietal and visceral surface of coelomic cavities. Mesothelial cells in the adult are stable epithelia, with their apical side facing the coelomic cavity and their basal side facing either the body wall or visceral organs (parietal and visceral mesothelia, respectively). Failure of epithelial maintenance in adult mesothelia results in mesothelial EMT (epithelial mesenchymal transition), which is known to be associated with many human diseases (e.g, ovarian cancer, mesothelioma and peritoneal and pulmonary fibrosis). During embryonic development, however, mesothelial cells and their precursors can undergo physiological EMT, supplying mesenchymal cells to developing tissues and organs. One such example of developmental mesothelial EMT is the CAM (chrioallantoic membrane) fusion, during which two mesothelial layers come into apical-apical contact and fuse to form the CAM. This process is evolutionarily conserved among all amniotes (birds, reptiles and mammals). In birds and reptiles, the fused CAM expands to cover the entire under-surface of the shell and functions as an embryonic organ for respiration and calcium absorption. In mammals, the CAM makes up the fetal portion of chorioallantoic placenta and functions as the major interface for fetomaternal nutrient/waste exchanges. In mice, failure to initiate CAM fusion is embryonic lethal.

2 . 研究の目的

The purpose of this project is use avian CAM model to study molecular mechanisms regulating CAM fusion and mesothelial EMT. Specifically, we want to uncover key molecular drivers of CAM fusion and EMT, induce and inhibit CAM fusion and EMT through molecular perturbation, and induce mesothelial EMT independent of CAM fusion. Through these experiments we hope to gain better understanding of human diseases caused by abnormalities in mesothelial EMT and CAM fusion. More specifically, we aim to 1) characterize molecular drivers of CAM fusion and CAM EMT; 2) establish an ex vivo model of CAM fusion and CAM EMT; 3) perform cell lineage analysis of chorionic and allantoic mesothelial cells during CAM fusion and CAM EMT; 4) modulate CAM fusion through molecular perturbation and induce mesothelial EMT independent of CAM fusion.

3 . 研究の方法

We use a combination of omics, molecular, embryological and imaging tools for our studies. We will first pinpoint the exact developmental window of CAM fusion (not reported). For omics studies, we have obtained the CAGE-based sequencing data, and are in collaboration with RIKEN Yokohama (Gusev lab) to integrate our data to the FANTOM ZENBU interactive website. We will make it public after publication of paper. For molecular studies, we use CRISPR-based gene activation and inhibition tools and use antisense probe-based method for doing in situ hybridization method. We also use chemicals that are known to inhibit signaling pathways to perturb CAM fusion. For embryological studies, we use in ovo and ex ovo culture and CAM. For ex vivo experiments, we isolate un-fused allantois and chorion, and perform DNA electroporation to mesothelial cells, and assemble CAM followed by incubation and imaging. For immunofluorescence studies, we use antibodies specific to known cell biological markers (including ZO1, E-cad, laminin and vimentin) in CAM tissues (before, during and after fusion). We also use these CAM tissues for EM studies to have fine detailed structural understanding of CAM.

4 . 研究成果

In the first year of this project (2018 fiscal year), we have complete major work in achieving aim 1. We have obtained quality promoterome data (CAGE-based transcription start site mapping) on genes expressed in different tissues involved in CAM fusion. We have also mapped temporal progression of CAM fusion to a well-defined 6-12 hour window (E3.75-E4.25 of chick development). In the second year of this project (2019 fiscal year), we have made progress for aims 2, 3 and 4. More specifically, we have uncovered involvement of canonical EMT regulatory gene (SNAIL) and non-canonical EMT regulatory gene (WT1) during CAM fusion. We have performed gene expression analysis of those transcription factors. We have also made CRISPR/gRNA mediated gene activation (CRISPR-a) and inhibition (CRISPR-i) constructs for these two genes and performed gain- and loss-of function studies in ex ovo CAM culture. We have optimized ex vivo CAM fusion methodology. We have performed immunofluorescence studies of CAM samples for EMT marker gene expression and have performed electron microscopy studies of fusing CAM tissues for cell biological studies. The project is making progress according to the plan. With molecular and cellular data, we have confirmed that EMT is indeed involved during CAM fusion. We have obtained a list of enriched genes during CAM fusion and have data to support the involvement of WNT and FGF signaling pathways during CAM fusion. One un-expected result is that the allantoic mesothelial cells and chorionic mesothelial cells have different morphology, behavior during fusion, and molecular repertoire. This suggests that although both mesothelial layers undergo EMT during CAM fusion, their molecular regulatory mechanisms are likely different.

mesothelium shows molecular asymmetry along the proximal-distal axis of the fusion plane during CAM fusion. We aim to sort this out during the last fiscal year, and to publish our work.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Alam T, Agrawal S, Severin J, Young RS, Andersson R, Arner E, Hasegawa A, Lizio M, Ramiowski JA, Abugessaisa I, Ishizu Y, Noma S, Tarui H, Taylor MS, Lassmann T, Itoh M, Kasukawa T, Kawaji H, Marchionni L, Sheng G, R R Forrest A, Khachigian LM, Hayashizaki Y, Carninci P, de Hoon MJL	4. 巻 30
2. 論文標題 Comparative transcriptomics of primary cells in vertebrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Research	6. 最初と最後の頁 951 ~ 961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gr.255679.119	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamidi Sofiane, Nagai Hiroki, Sheng Guojun	4. 巻 -
2. 論文標題 Partial EMT/MET: An Army of One	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0779-4_5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wei Weng, Hiroki Nagai, Sofiane Hamidi, Guojun Sheng	4. 巻 105
2. 論文標題 NPAS4L is involved in avian hemangioblast specification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 2647 ~ 2650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.239434	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawanyawisuth Kanlayanee, Sashida Goro, Sheng Guojun	4. 巻 13
2. 論文標題 Epithelial?Mesenchymal Transition in Liver Fluke-Induced Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 791 ~ 791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13040791	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ismagulov Galym, Hamidi Sofiane, Sheng Guojun	4. 巻 9
2. 論文標題 Epithelial-Mesenchymal Transition Drives Three-Dimensional Morphogenesis in Mammalian Early Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.639244	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sheng Guojun	4. 巻 148
2. 論文標題 Defining epithelial-mesenchymal transitions in animal development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.198036	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang Jing, Sheng Guojun, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 341 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-020-0237-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamidi Sofiane, Nakaya Yukiko, Nagai Hiroki, Alev Cantas, Kasukawa Takeya, Chhabra Sapna, Lee Ruda, Niwa Hitoshi, Warmflash Aryeh, Shibata Tatsuo, Sheng Guojun	4. 巻 147
2. 論文標題 Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 184960 ~ 184960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.184960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamidi Sofiane, Nakaya Yukiko, Nagai Hiroki, Alev Cantas, Shibata Tatsuo, Sheng Guojun	4. 巻 16
2. 論文標題 Biomechanical regulation of EMT and epithelial morphogenesis in amniote epiblast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Biology	6. 最初と最後の頁 041002 ~ 041002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1478-3975/ab1048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 L. Osorio, X. Wu, L. Wang, Z. Jiang, C. Neideck, G. Sheng and Z. Zhou*	4. 巻 in press
2. 論文標題 ISM1 regulates NODAL signaling and asymmetric organ morphogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamidi Sofiane, Nakaya Yukiko, Nagai Hiroki, Alev Cantas, Shibata Tatsuo, Sheng Guojun	4. 巻 16
2. 論文標題 Biomechanical regulation of EMT and epithelial morphogenesis in amniote epiblast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Biology	6. 最初と最後の頁 041002 ~ 041002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1478-3975/ab1048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 RJ Gilbert, Sheng Guojun, Viebahn Christoph	4. 巻 205
2. 論文標題 A New Beginning for Cells Tissues Organs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 254 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000496633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Siddiqui Rokeya, Suzu Shinya, Ueno Mikinori, Nasser Hesham, Koba Ryota, Bhuyan Farzana, Noyori Osamu, Hamidi Sofiane, Sheng Guojun, Yasuda-Inoue Mariko, Hishiki Takayuki, Sukegawa Sayaka, Miyagi Eri, Strebel Klaus, Matsushita Shuzo, Shimotohno Kunitada, Ariumi Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1007372 ~ 1007372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 S. Hamidi and G. Sheng	4. 巻 164
2. 論文標題 Epithelial-mesenchymal transition in haematopoietic stem cell development and homeostasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 137-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 H. Nagai, M. Shin, W. Weng, F. Nakazawa, L. M. Jakt, C. Alev and G. Sheng	4. 巻 62
2. 論文標題 Early Hematopoietic and vascular development in the chick.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 137-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamidi Sofiane, Sheng Guojun	4. 巻 164
2. 論文標題 Epithelial-mesenchymal transition in haematopoietic stem cell development and homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 265 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy063	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Hiroki, Shin Masahiro, Weng Wei, Nakazawa Fumie, Jakt Lars Martin, Alev Cantas, Sheng Guojun	4. 巻 62
2. 論文標題 Early hematopoietic and vascular development in the chick	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 137 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1387/ijdb.170291gs	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Guojun Sheng
2. 発表標題 Epithelial Mesenchymal Transition during Chorioallantoic Membrane Fusion
3. 学会等名 Avian Model Systems 10 Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Guojun Sheng
2. 発表標題 Epithelial Mesenchymal Transition in Development
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------