

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06265

研究課題名(和文) 漿尿膜融合を誘導する機能性を指標にした、新しい中皮細胞EMT制御分子の探索

研究課題名(英文) Exploring the molecules regulating mesothelial EMT during chorio-allantoic fusion

研究代表者

永井 宏樹 (Nagai, Hiroki)

熊本大学・国際先端医学研究機構・リサーチ・スペシャリスト

研究者番号：80772508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト疾患や胚発生などの様々な局面に関わりを持つ中皮細胞EMTの調節メカニズムについては、不明な点が数多く存在する。本研究では、新しい中皮EMTモデルとしてニワトリ胚の漿尿膜融合に着目した。漿尿膜融合では漿膜中皮と尿膜中皮のクロストークにより中皮EMTが誘導される。漿尿膜融合を駆動する中皮EMT制御分子の探索をおこない、EMTコア転写因子、WNTおよびTGFシグナル分子、中皮腫マーカーWT1などが漿尿膜融合の中皮EMT調節制御に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間葉転換(EMT)は、ガンの浸潤や転移に深く関与する現象としてよく知られており、ガン制圧の標的として势力的に研究がなされている。中皮EMTは、中皮腫や卵巣ガン、肺繊維症などのヒト疾患の発生とその進行プロセスに深く関わっている。また胎児の正常発生においても、心臓や腸への血管平滑筋細胞の供給などを通して、重要な役割を担っている。本研究で得られた知見は、中皮細胞性疾患の病態や正常組織発生の中皮EMTの理解促進という観点において、その一端に少なからず寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mesothelial EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) plays important roles in various aspects, including development and progression of human disorders and organogenesis in embryo development. Despite the importance of understanding the regulatory mechanism of mesothelial EMT, however, little is known about the molecules regulating mesothelial EMT. With a novel mesothelial EMT model called chorio-allantoic fusion in chicken embryo, we explored the regulatory molecules driving the mesothelial EMT taking place on chorion mesothelium and allantois mesothelium during the fusion process. This study have revealed that the factors, including EMT core transcription factors, WNT and TGF signaling molecules, and mesothelioma marker WT1, are involved in molecular regulation of mesothelial EMT during chicken chorio-allantoic fusion.

研究分野：発生生物学

キーワード：漿尿膜融合 中皮EMT ニワトリ胚モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (EMT) は、正常組織の発生に限らず、ヒト疾患の進行プロセス、特にガンの浸潤や転移等に深く関与する細胞形態制御メカニズムであり、上皮性ホメオスタシスを維持している細胞から運動性を獲得した間葉系細胞へと遷移するプロセスである。生体中の体腔をおおう側壁中皮や壁側中皮などの中皮細胞は、互いが接触する環境下に常時おかれているが、体腔を満たす漿液や中皮細胞が分泌する酸性ムコ多糖などが潤滑剤として機能することで、癒着が起こらないように厳密に制御されている。一方で、中皮細胞は細胞外刺激や内在性シグナルの変異などに呼応して細胞極性を喪失し、間葉系細胞へと上皮間葉転換 (EMT) する細胞特性も保持している。

中皮細胞の EMT は、肺線維症や卵巣がんなど多くのヒト疾患の発生と進行に深く関わっており、また組織発生においては、心臓、肺、腸の血管平滑筋細胞、雄生殖腺のセルトリ細胞などの供給においてその重要性が示されている。しかし、普段は上皮性ホメオスタシスを安定的に維持している中皮細胞が、どのような細胞内外の要因により間葉系細胞へと変化するのか、その分子調節シグナルや細胞の形態制御メカニズムには、未解明な部分が数多く存在する。

2. 研究の目的

本研究では、新しい中皮 EMT モデルとしてニワトリ胚の漿尿膜融合に着目した。ニワトリ胚漿尿膜融合では、漿膜中皮と尿膜中皮の接触を端緒として漿膜と尿膜の融合が誘導され、漿尿膜が形成される。この一連の融合プロセスには中皮の形態変化、すなわち中皮 EMT が含まれる。そこで、『中皮 EMT が漿尿膜融合を駆動する』という作業仮説のもと、漿膜および尿膜組織で機能する中皮 EMT 制御分子の探索を行った。

3. 研究の方法

本研究は、主に以下の方法により進めた。

(1) 漿尿膜融合組織の CAGE-seq 解析から取得した時系列および組織領域特異的な遺伝子発現プロファイルから、漿尿膜融合にともなう発現変動を示す遺伝子をリストアップし、漿尿膜融合組織における発現パターンを mRNA in situ hybridization 法により解析した。

(2) 研究方法(1)の解析により同定できた漿尿膜融合特異的な発現変動遺伝子のうち、漿膜中皮および尿膜中皮に発現する遺伝子に着目し、CRISPR/dCas9 介在性の内在性転写活性調節法 (CRISPR-a/-i 法) を用いて漿尿膜融合にたいする機能性を検証した。具体的には、発生途上の胚 (3.75 日から 4.0 日胚) より単離した尿膜および漿膜組織にたいして転写活性化 (CRISPR-a) プラスミドまたは転写抑制 (CRISPR-i) プラスミドを in vitro エレクトポレーション法により導入し、16 時間程度の in vitro 培養をした後に、漿尿膜融合の表現型を免疫染色、mRNA in situ hybridization 法などにより解析した。漿尿膜融合組織の in vitro 培養系は、ニワトリ初期胚の Modified-Cornish pasty culture 法 (MC culture 法)、またはその変法を用いた。

4. 研究成果

(1) 漿尿膜融合組織における発現変動遺伝子の同定

漿尿膜融合の進展にともない発現変動する遺伝子を同定するために、独自に実施した漿尿膜融合組織の CAGE-seq 解析から取得した遺伝子発現プロファイルを参照した。まず、融合前 (3.75 日胚) 融合初期 (4.0 日胚: 胚発生接触部位において尿膜と漿膜の融合が誘導されているが、まだ物理的に漿膜と尿膜が分離可能な段階) および融合中期 (4.25 日胚: 最初の接触部位における融合が進展し、漿膜と尿膜が分離できない段階) の各融合発生段階に着目した。つづいて、融合前の漿膜と尿膜、融合初期の漿膜と尿膜それぞれに由来する

接触領域および非接触領域、および融合中期の融合完了領域と融合進展領域、からなる全 8 画分（各 4 レプリケート）の CAGE-seq 解析から取得した遺伝子発現プロファイルの定量解析をおこなった。その結果、WNT シグナル分子のうちリガンド分子（WNT6 など）は漿膜特異的または漿膜バイアス性の発現を示し、受容体分子（FZD4 など）は尿膜特異的または尿膜バイアス性の発現を示すことがわかった。さらに興味深いことに、WNT シグナル分子は特に融合前および融合初期において高発現を示すことから、融合の誘導局面で重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、TGF β 受容体分子は尿膜バイアス性の発現を示した。一方、中皮腫マーカーとして知られる WT1 遺伝子は、尿膜中皮特異的に発現し、融合の進展にともなって段階的に発現レベルが減衰することがわかった。このことから尿膜が漿尿膜融合プロセスにおいて能動的かつ主導的に振る舞うことが示唆された。

（2）EMT コア転写因子の発現パターンの同定

一般に上皮間葉転換（EMT）には、5 つの転写因子（SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2 and Twist1）のうち少なくとも一つまたはその複数が関与することが知られている。これら 5 つの転写因子は EMT コア転写因子と称される。そこで、漿尿膜融合組織における EMT コア転写因子の発現パターンを調べた。CAGE-seq プロファイルからは、EMT コア転写因子は尿膜特異的に発現していることが示唆された。つぎに、mRNA *in situ* hybridization 法により、発現パターンを詳細に解析したところ、尿膜中皮には SNAI1、SNAI2、および ZEB2 が、漿膜中皮には SNAI2 が発現していることがわかった。また、これらコア転写因子の融合進展部位における発現パターンは、融合の進展に呼応して、細胞形態の変化をともなうダイナミックな変化を示した。ことから、漿尿膜融合の融合初期には漿膜中皮 EMT および尿膜中皮 EMT が重要な役割をはたすことが強く示された。

（3）CRISPR/dCas9 介在性の内在性転写活性調節法による漿尿膜融合表現型の解析

融合前および融合初期のニワトリ胚から単離した尿膜および漿膜の中皮にたいして、転写活性化（CRISPR-a）または転写抑制（CRISPR-i）プラスミドを *in vitro* エレクトロポレーションにより導入し、その表現型を解析した。まず、プラスミドの改変をおこなった。具体的には、既存の転写活性化因子 dCas9-VP160 融合タンパク質と gRNA を共発現する転写活性化プラスミド、および転写抑制因子 KRAB-dCas9 融合タンパク質と gRNA を共発現する転写抑制プラスミド、それぞれの融合タンパク質上流のプロモーターを CAGGS に置換した。同時に、改変したプラスミドの融合タンパク質下流に 2A-GFP を導入し、GFP レポーター共発現プラスミドを新しく構築した。hU6 プロモーター下流に挿入する gRNA 配列のデザインは、CAGE-seq 解析で取得した転写開始点（TSS）プロファイルを参照した。プラスミドの機能性は初期胚を用いて検証し、有効性を確認した。

研究成果（1）および（2）において同定した漿尿膜融合の制御候補遺伝子について、尿膜中皮および漿膜中皮へ CRISPR-a または CRISPR-i プラスミドを導入し、内在性転写活性攪乱実験を実施した。これまでに、いくつかの興味深い表現型を取得している。そのうち、融合前期の尿膜中皮に発現する WT1 遺伝子を標的にした攪乱実験では、エレクトロポレーションにより尿膜中皮へ CRISPR-i プラスミド（WT1-i）を導入し、漿膜非存在下で *in vitro* 培養した後に表現型を解析した。WT1-i プラスミドを導入した尿膜中皮細胞では、上皮性の喪失が起こるとともに、尿膜中皮アピカル側へと遊走する細胞の存在を認めた。融合初期の融合誘導部位では、SNAI1 の発現上昇に呼応するように WT1 発現は減弱・消失することを別途明らかにしている。これらの結果から、尿膜中皮 EMT には WT1 発現の下降調節が密接に関連していることが明らかになった。これまでのところ、漿膜に発現する遺伝子については、転写活性調節による顕著な表現型を見いだせていない。引き続き CRISPR/dCas9 介在性の転写活性攪乱実験から得られた表現型の解析をおこなっており、漿尿膜融合の中皮 EMT の理解を目指して研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sofiane Hamidi, Yukiko Nakaya, Hiroki Nagai, Cantas Alev, Takeya Kasukawa, Sapna Chhabra, Ruda Lee, Hitoshi Niwa, Aryeh Warmflash, Tatsuo Shibata, Guojun Sheng	4. 巻 -
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 -
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 Wei Weng, Hiroki Nagai, Sofiane Hamidi, Guojun Sheng	4. 巻 -
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 -
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 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 -
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 -
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 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, Hiroki Nagai, Guojun Sheng	4. 巻 2179
2. 論文標題 Partial EMT/MET: An Army of One	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	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 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiroki Nagai, Guojun Sheng.
2. 発表標題 Mesothelial EMT during chorio-allantoic fusion in chick early development.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Nagai, Guojun Sheng.
2. 発表標題 Mesothelial EMT during chorio-allantoic fusion in chick early development
3. 学会等名 The 9th EMT International Association Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagai Hiroki, Sheng Guojun.
2. 発表標題 Involvement of Epithelial-Mesenchymal Transition in Avian Chorioallantoic Fusion
3. 学会等名 Avian Model Systems 10 (国際学会)
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
---------	---------