

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16143

研究課題名（和文）MafB遺伝子が制御する心臓神経堤細胞の分化運命決定機構の解明

研究課題名（英文）Understanding gene regulatory mechanisms during cardiac neural crest cell development

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。転写因子MafBは心臓神経堤細胞特異的に発現し、心臓神経堤細胞の形成に必須な役割を持つ。本研究ではMafB遺伝子の発現調節領域を、ニワトリゲノムにおいて同定・単離した。その制御領域を用いたレポーター遺伝子を作成し、ニワトリ胚内で神経堤細胞の中でも心臓神経堤細胞だけを標識することに成功した。これにより、心臓神経堤細胞の形成初期から移動までの過程を追跡し、その動態を明らかにする結果を得た。

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おり、心臓神経堤細胞は心臓循環器形成・維持において重要な細胞群である。本研究では、ニワトリゲノムにおいて心臓神経堤細胞特異的に発現するMafB遺伝子の発現調節領域を同定した。この領域は、レポーター遺伝子として利用することで心臓神経堤細胞の追跡・分布を明らかにするだけでなく、心臓神経堤細胞除去実験に応用することができ、心疾患発症機序を再現するモデル胚作成の有用なツールとなる。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）：Cardiac neural crest cells arise in the caudal hindbrain and then migrate to the heart through the pharyngeal arches. These cells contribute to the formation of the heart, including septum of the outflow tract, and are unique to this neural crest population. MafB is a transcription factor expressed specifically in early migrating cardiac neural crest cells as well as in rhombomeres (r) 5 and 6. In this study to clarify the molecular basis for cardiac neural crest-specific MafB expression, we identified the regulatory region in the chicken genome controlling the expression of endogenous MafB transcripts. A reporter driven by this regulatory region was employed to trace the migration of these cells into the pharyngeal arches.

研究分野：分子生物学

キーワード：心臓神経堤細胞 心臓発生 MafB 遺伝子発現制御機構

## 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。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、第3、4、6咽頭弓を移動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流出路に到達する。心臓流出路は総動脈幹という一本の管に、心臓神経堤細胞が入り込み中隔細胞へと分化することで壁をつくり、やがて大動脈と肺動脈に分けられる。この中隔は大動脈肺動脈中隔と呼ばれる。心臓神経堤細胞の発生異常・欠損は、主に大動脈肺動脈中隔形成不全となり大動脈と肺動脈が分離しない総動脈幹遺残症 (PTA; Persistent Truncus Arteriosus) という重大な心疾患に至る。心臓神経堤を切除したニワトリ胚では、この中隔を失った PTA の表現型を示す。さらに、心臓神経堤除去胚に、多分化能を有する他の神経堤を置換移植しても、この中隔欠損の表現型を免れることはできない (Kirby et al., *Dev Biol*, 1989)。よって、心臓神経堤細胞は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。しかし、その独自性を生み出す分子メカニズムについてはわかっていない。

申請者はこれまで心臓神経堤細胞の独自の細胞分化能を生み出す分子メカニズムを明らかにすることを旨とし、ニワトリ胚を用いて初期の心臓神経堤細胞で特異的に発現する遺伝子を網羅的に同定した。その中でも、心臓神経堤特異的に発現する *MafB* 遺伝子が心臓神経堤細胞の初期発生に必須であること、そして *MafB* が神経堤細胞マーカー遺伝子 *Sox10* のエンハンサーを直接活性化することで、心臓神経堤細胞での *Sox10* 発現制御を行っていることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究から、*MafB* 遺伝子が心臓神経堤細胞の遺伝子制御機構において中心的な役割を果たしていることが示唆された。*MafB* の機能阻害は心臓神経堤細胞の遺伝子発現制御ネットワークの破綻に至るため、心臓神経堤細胞の形成不全を引き起こし、最終的にはそれに起因する心疾患になると考えられる。一方で、*MafB* は心臓神経堤細胞の独自性を生み出すキーファクターの可能性が示唆される。そこで本研究では心臓神経堤細胞の独自の分化運命決定機構を明らかにするために、目的として (1) *MafB* 機能阻害ニワトリ胚を構築し、引き起こされる心疾患の形態異常とその分子機序を解き明かす、(2) *MafB* を用いて他の神経堤細胞から心臓神経堤細胞へのリプログラム効果を検証する、という2点を掲げた。

## 3. 研究の方法

(1) 移動初期の心臓神経堤細胞の移動は CXCR4/SDF1 シグナルによって制御されていることが報告されている。CXCR4 は SDF1 リガンドのレセプターであり、ニワトリ胚では発生ステージ HH12 において心臓神経堤細胞特異的に発現する。一方、SDF は心臓神経堤細胞周辺の表皮外胚葉層で局所的に発現し、CXCR4 を発現している心臓神経堤細胞を胚の腹側へ誘引することで移動を促進する。両者の遺伝子の発現は互いに活性化しあうポジティブフィードバックループをもつことで、段階的に腹側への移動を制御している。

本研究では、*MafB* の機能阻害が心臓神経堤細胞の移動にどのような影響を与えているのか調べた。*MafB* 機能阻害ニワトリ胚を作成し、心臓神経堤細胞の移動初期・中期の発生段階において、CXCR4 および SDF1 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。

(2) *MafB* の心臓神経堤特異的な発現がどのように生み出されているのか調べるため、*MafB* 遺伝子の発現調節領域の同定を試みた。エンハンサーなどのシス調節領域は、一般的にゲノム内で保存性が高い傾向がある。そこで、まず *MafB* 遺伝子周辺のニワトリゲノム配列上において、脊椎動物内での保存性が高い領域を候補領域とした。その候補領域をニワトリゲノムから PCR により増幅・単離し、レポーターコンストラクトに組み込み、実際にニワトリ胚で発現活性能について解析した。そして、内在の *MafB* 発現を再現するそのレポーターを見出した。

(3) (2) で同定した *MafB* 遺伝子の発現調節領域は心臓神経堤細胞特異的な発現を生み出す転写因子が結合する場となっていると考えられる。その転写制御の分子メカニズムを明らかにするため、この領域に結合しうる転写因子の探索を行った。

(4) 心臓神経堤細胞の欠損は心疾患を引き起こすことが報告されているが、これらの知見の多くは外科的な心臓神経堤除去といった組織レベルでの手法によって得られてきた。ニワトリ胚内で心臓神経堤細胞だけを欠損させることでその心疾患を再現する PTA モデルニワトリ胚の構築に向けて、(2)で同定した MafB の発現調節領域とジフテリア毒素 (DTA) を利用した実験系を導入することにした。DTA は細胞死を誘導するため、胚発生の中で DTA を発現した細胞のみが除去される。まず基本となる実験系の確立のため、神経堤細胞特異的エンハンサー制御下で DTA を発現するコンストラクトをニワトリ胚に導入し、移動中の心臓神経堤細胞に対する影響を検討した。

(5) MafB に体幹部神経堤細胞を心臓神経堤細胞化するリプログラム効果があるか否かを検証した。MafB をニワトリ胚体幹部神経堤で異所的に発現させ、その神経堤で心臓神経堤細胞特異的な遺伝子発現が誘起されるか、in situハイブリダイゼーションや免疫染色により解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) MafB 機能阻害胚における心臓神経堤細胞移動制御因子 CXCR4, SDF1 の発現解析

MafB の機能阻害が心臓神経堤細胞の移動能にどのような影響を与えているのか調べるため、MafB 機能阻害ニワトリ胚を作成し、CXCR4 および SDF1 の発現を in situハイブリダイゼーションにより解析した (図 1)。その結果、MafB 機能阻害ニワトリ胚では CXCR4 の発現が著しく低下した。この結果から、これまで得られていた MafB 機能阻害が心臓神経堤細胞の分化に影響を与えるという知見に加えて、MafB が心臓神経堤細胞の移動にも影響を及ぼすことを明らかにした。また、MafB 機能阻害ニワトリ胚では、SDF1 発現も低下しており、MafB 機能阻害が直接的か間接的かはまだ不明ではあるものの、心臓神経堤細胞移動における CXCR4/SDF1 シグナリングに影響を与えていることがわかった。

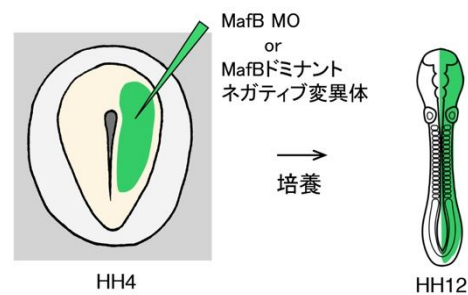


図1. MafB機能阻害胚の作成スキーム  
ニワトリ胚HH4の右側にのみMafBモルフォノオリゴまたは機能阻害コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入し、HH12まで培養する。

##### (2) MafB 遺伝子の発現調節領域の同定とそのレポーターによる心臓神経堤細胞の可視化と追跡

ニワトリゲノムの MafB 遺伝子周辺において、脊椎動物内で保存性の高い領域を候補として 12 ヶ所抜き出し、ニワトリゲノムを用いた PCR により増幅・単離した。これをレポーター発現ベクターに組み込み、そのコンストラクトをニワトリ胚へエレクトロポレーションにより導入することで、これらの候補領域に発現活性があるかどうかを検証した。その結果、MafB のタンパク質コード領域の上流に存在する約 1.8kb の断片を組み込んだレポーター遺伝子によって、内在の MafB 遺伝子発現を完全に再現することができた (図 2A, B)。よってこの領域を MafB 発現調節領域 (mafB\_E1) と同定した。

さらにこの領域を脊椎動物種内での保存性によって大きく 3 つに分け、断片的に用いたレポーターアッセイを行ったところ、ロンボメアと心臓神経堤細胞での発現開始 (MafB\_E1a)、心臓神経堤細胞での発現維持 (MafB\_E1b)、発現増強 (MafB\_E1c) の 3 つのエレメントに分けることができた。さらに MafB\_E1a にはロンボメア形成に関わる転写因子の結合予想モチーフが、MafB\_E1b には MafB の結合予想モチーフが存在していた。

以上の結果から、まず MafB\_E1a によってロンボメアで転写活性化された MafB が、その後、MafB 自身のポジティブフィードバックによって MafB\_E1b エレメントを介して移動中の心臓神経堤細胞

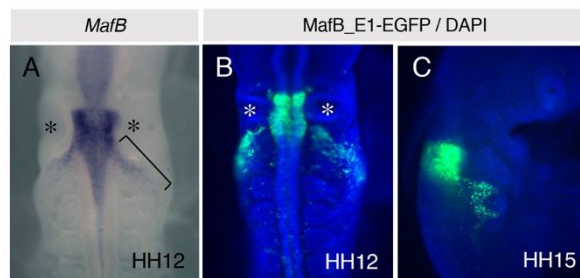


図2. MafBの内在発現様式および MafB\_E1-EGFPの発現様式 (\*は耳胞を示す)

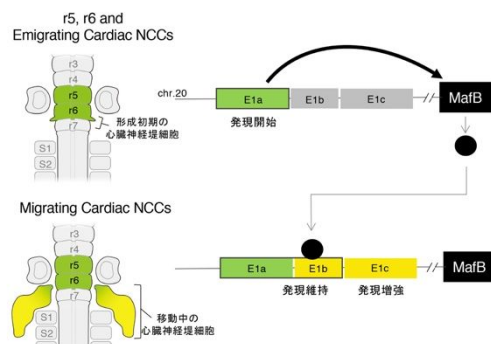


図3. MafB\_E1内の各エレメントによる心臓神経堤細胞での MafB発現調節機構のスキーム



胞で発現維持させるという一連のスキームを見出した (図 3)。

MafB\_E1 を用いたレポーター (MafB\_E1-EGFP) は神経堤細胞の中でも心臓神経堤細胞でのみ発現するため、心臓神経堤細胞特異的レポーターとして利用可能である。このレポーターを導入したニワトリ胚内で心臓神経堤細胞を標識し、発生段階をおってレポーター発現細胞の挙動を解析した。その結果、このレポーターによって、心臓神経堤細胞を形成初期から心臓原基に向かって運ばれてゆく移動期までを追跡することに成功した (図 2C)。さらに、この細胞がその後心臓形成に貢献しているのかを調べるため、マウスにおいて心臓弁になることがわかっている神経堤細胞のレポーター Krox20NCE-mCherry と共導入し、それぞれの細胞集団の挙動を解析した。その結果、MafB\_E1-EGFP 発現陽性細胞集団の一部が、Krox20NCE-mCherry 発現細胞と重複していた (図 4)。この結果を受けて、MafB\_E1-EGFP を発現している心臓神経堤細胞が将来の心臓形成 (少なくとも心臓弁の形成) に直接的に関わることを示唆した。

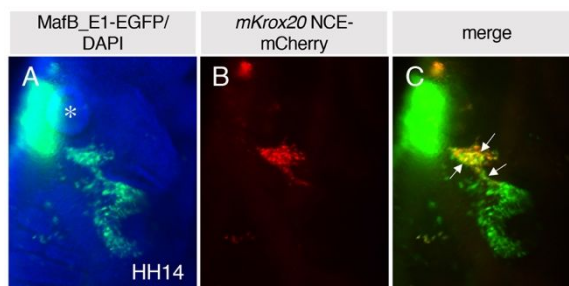


図4. MafB\_E1-EGFPおよびKrox20NCE-mCherryレポーターの発現様式 (矢印は各発現陽性細胞集団が重複している箇所を示す)

### (3) MafB 発現調節領域を活性化させる因子の探索

MafB\_E1 の塩基配列に結合すると予想される転写因子モチーフの探索を行った。その結果、MafB 以外にも神経堤細胞形成関連転写因子の結合モチーフが多数見つかった。現在これらの結合予想領域に欠損・変異導入したレポーターを作成し、その活性をニワトリ胚内で解析している。すでに発現活性に影響のある部位をいくつか見出しつつある。今後さらに絞り込みを行い、心臓神経堤細胞の発現活性に影響のある転写因子の同定を行う。

### (4) 神経堤細胞特異的エンハンサーとジフテリア毒素 (DTA) を組み合わせた心臓神経堤細胞欠損実験系の確立

神経堤細胞特異的なエンハンサー制御下で DTA を発現させ、ニワトリ胚内で神経堤細胞を欠損させる実験系を立ち上げることにした。ニワトリ胚初期の神経堤細胞特異的エンハンサーの一つである Sox10E2 の制御下で DTA を発現するコンストラクトを作成し、心臓神経堤細胞レポーター MafB\_E1-EGFP と共に、ニワトリ胚 HH4 の外胚葉層へ共導入した。その胚を心臓神経堤細胞が形成される HH12 まで培養し、MafB\_E1-EGFP 発現様式を観察した。その結果、ロンボメア 5,6 での MafB\_E1-EGFP 発現は明確に確認されたが、心臓神経堤細胞での発現はほとんどみられなかった。この結果は、DTA が発現した神経堤細胞が胚内で除去されたことによりこのような表現型を示したと結論した。よって、ニワトリ胚における、神経堤細胞特異的エンハンサーと DTA を組み合わせた神経堤細胞欠損実験系の構築に成功したと考えられる。

今後はこの系を用いて、MafB\_E1 制御下で DTA を発現させることによる心臓神経堤細胞欠損、およびそのニワトリ胚の長期培養を経て、心疾患 PTA モデルの構築を目指す。

### (5) MafB 遺伝子の異所発現による体幹部神経堤の心臓神経堤細胞化の検証

MafB の発現コンストラクトを作成し、これをニワトリ胚 HH4 の外胚葉層にエレクトロポレーションすることで、体幹部神経堤領域への MafB 異所発現を導入した。MafB により心臓神経堤細胞特有の転写活性が与えられているか否かの指標として、心臓神経堤では発現活性をもつが体幹部神経堤ではもたない sox10E2-EGFP レポーターを共導入して、その発現活性を観察した。その結果、MafB のみを異所発現させた体幹部神経堤では sox10E2-EGFP レポーター発現はみられなかった。

しかし、MafB およびいくつかの神経堤特異的遺伝子を複合的に異所発現させたニワトリ胚では、体幹部神経堤で sox10E2-EGFP レポーターの発現が引き起こされている結果を得た。さらにこの異所発現胚の体幹部神経堤では、一部の心臓神経堤細胞特異的遺伝子の内在発現も誘起されているという予備的知見を得ている。この結果から、MafB を含むこれらの遺伝子らの異所発現が、体幹部神経堤から心臓神経堤の遺伝子発現プログラムへ変換しているという可能性が示唆される。今後、異所発現胚における体幹部神経堤細胞の発現変動の解析を詳細に進めることで、リプログラム効果の検証を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tani-Matsuhana Saori, Inoue Kunio	4. 巻 167
2. 論文標題 Identification of regulatory elements for MafB expression in the cardiac neural crest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells & Development	6. 最初と最後の頁 203725 ~ 203725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cdev.2021.203725	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川田 結雅, 井上 邦夫, 松花(谷) 沙織
2. 発表標題 ニワトリ胚を用いた移動初期の心臓神経堤細胞における遺伝子制御機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saori Tani-Matsuhana
2. 発表標題 An effective approach to uncover the cardiac neural crest genes
3. 学会等名 第53回日本発生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saori Tani-Matsuhana, Kunio Inoue, Marianne Bronner
2. 発表標題 Transcriptome analysis of the cardiac neural crest reveals a critical role for MafB
3. 学会等名 第52回日本発生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松花沙織
2. 発表標題 転写因子 MafB を糸口とした心臓神経堤細胞の分化機構の解明
3. 学会等名 第20回 日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2021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		
米国	California Institute of Technology		