

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390052

研究課題名（和文）ディファレンシャルディスプレイ法を用いた新しい初期心筋分化機構の解明

研究課題名（英文）Exploration of novel mechanisms regulating early cardiomyocyte development by using a differential-display method

研究代表者

中島 裕司（NAKAJIMA YUJI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80207795

研究成果の概要(和文)：胞胚期の予定心臓細胞は胚盤葉上層の外側に存在し、正中後方、次いで前方に移動する。この上皮形態中を移動する奇妙な細胞運動はポロネーズ運動として記載されているが、その機構は不明である。この運動を制御する因子について細胞標識法と全胚培養系を用いて検討した。ポロネーズ運動は Nodal によって制御されることが示された。また胚盤葉上層に2種類の細胞ロゼットが形成され、Nodal によって制御されていることが示唆された。Nodal は予定心臓中胚葉を含む細胞運動に係わることが判明した。

研究成果の概要(英文)：During axis formation in amniotes, posterior and lateral epiblast cells in the area pellucida undergo a counter-rotating movement along the midline to form primitive streak (Polonaise movements). Using chick blastoderms, we investigated the signaling involved in this cellular movement in epithelial-epiblast. In cultured posterior blastoderm explants from stage X-XI embryos, either Lefty1 or Cerberus-S inhibited initial migration of the explants on chamber slides. In vivo analysis showed that inhibition of Nodal signaling by Lefty1 affected the movement of DiI-marked epiblast cells prior to the formation of primitive streak. In Lefty1-treated embryos without a primitive streak, Brachyury expression showed a patchy distribution. However, SU5402 did not affect the movement of DiI-marked epiblast cells. Multi-cellular rosette, which is thought to be involved in epithelial morphogenesis, was found predominantly in the posterior half of the epiblast, and Lefty1 inhibited the formation of rosettes. Three-dimensional reconstruction showed two types of rosette, one with a protruding cell, the other with a ventral hollow. Our results suggest that Nodal signaling may have a pivotal role in the morphogenetic movements of epithelial epiblast including Polonaise movements and formation of multi-cellular rosette.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	8,500,000	2,550,000	11,050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学、中胚葉、細胞移動

1. 研究開始当初の背景

胞胚期の予定心臓細胞は胚盤葉上層の外側後方に存在する。予定心臓細胞は胚盤葉上層後方に発現する成長因子 Nodal と胚盤葉下層後方に発現する線維芽細胞増殖因子 FGF(fibroblast growth factor)-8 によって予定心臓中胚葉への決定を受け、原腸陥入によって前方側板中胚葉領域に移動し、予定心臓中胚葉に分化する。予定心臓中胚葉は内胚葉から分泌される成長因子 BMP (bone morphogenetic protein) と FGF-8 により心筋細胞に分化する。この過程で予定心臓細胞は、胞胚期には胚盤葉上層内を外側から後方正中へ、また後方の予定心臓細胞は前方に移動する。後方正中から前方正中領域に移動した予定心臓中胚葉細胞は他の予定中内胚葉細胞とともに原腸陥入によって中内胚葉細胞に分化する。これまでの研究によって、原腸陥入時の細胞移動は葉盤用上層細胞の上皮間葉形質転換 epithelial-mesenchymal transition (EMT) とそれに引き続き起こる間葉細胞のアメーバー様運動であり、原始線条に発現する FGF-8 による忌避作用 chemorepellent 胚前方に発現する FGF-4 による誘因作用 chemoattractant な作用によって、予定心臓中胚葉細胞が移動することが判明している。

胞胚期の胚盤葉上層は上皮構造をもち、予定心臓細胞は上皮構造内で、あるいは上皮構造が一群となって、胚盤葉上層の外側から後方正中、後方正中から前方に移動する。この奇妙な細胞移動はポロネーズ (Polonaise movement, Graper1929) として記載されているがその細胞メカニズムやその運動をコントロールする成長因子の本体は不明である。

そこでディファレンシャルディスプレイ法を用いて胞胚初期と胞胚後期に発現している遺伝子を比較し、胞胚初期に胚盤葉上層に特異的に発現している 70 遺伝子を明らかにした。

2. 研究の目的

胞胚初期に発現している成長因子 Nodal 等について、予定心臓細胞および予定中内胚葉細胞のポロネーズ運動を制御する因子を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 全胚培養系

ニワトリ有精卵から、フィルターリングを用いて胞胚を摘出し、Eyal-Giladi に従ってステージを決定した。初期胞胚(ステージ X, XI)を実験に使用した。全胚培養は New 法に従い卵白アガー上に胚盤を置き、37°C、湿度 70% で培養した。

(2) 細胞標識

蛍光色素 DiI を先端の直径 20 μm のガラスピペットとプレッシャーインジェクターを用いて胚盤葉上層細胞を標識し、蛍光実体顕微鏡を用いて経時的に細胞移動を追跡した。

(3) インサイチュハイブリダイゼーション

中胚葉に特異的に発現する Brachyury に対する Digoxigenin 標識 RNA プローブを作成し Nieto の方法に従って全胚インサイチュハイブリダイゼーションを行った。

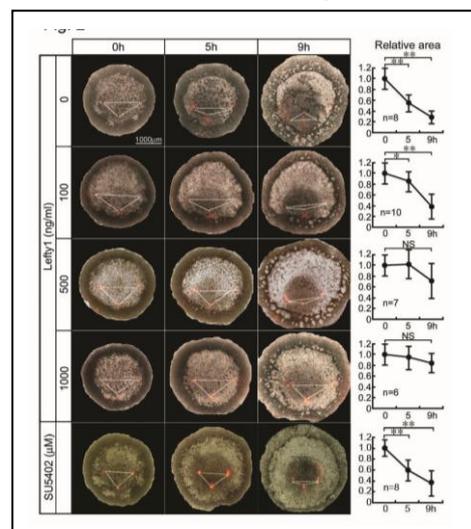
(4) 細胞ロゼットの三次元構築

胞胚を 4% paraformaldehyde/PBS で固定しローダミン標識ファロイジンで全胚標識を行った。レーザー顕微鏡で胚盤葉上層のロゼット形成領域を Z 軸方向に 20 μm (20 断面) スキャンし、得られた画像と三次元構築ソフト Delta Viewer を用いてロゼットの三次元構築を行った。

4. 研究成果

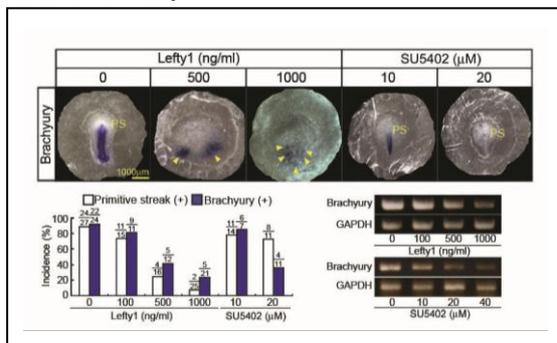
(1) Lefty1 は胚盤葉上層細胞のポロネーズ運動を抑制する

Lefty はレセプターに結合し Nodal シグナルを特異的に抑制する。全胚培養を行った胞胚の胚盤葉上層の 9 時、15 時、18 時の位置に DiI で細胞標識を行い、再び孵卵し 5 時間後、9 時間後に DiI 標識細胞の移動を記録した。細胞移動を半定量化するために三点で囲んだ領域の面積変化を求めた。以下の図に示すように Lefty の添加によって標識細胞の移動が抑制された。一方、FGF シグナルの薬理的阻害剤である SU5402 の添加では標識細胞の移動障害は認められなかった。また図には示さないが Nodal レセプターの阻害剤 SB431542 の添加によって標識細胞の移動が抑制された。以上の結果は Nodal シグナルがポロネーズ運動を制御するシグナルの一部であることを示唆している。



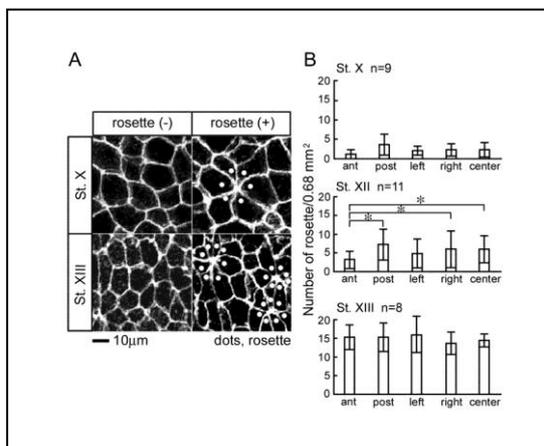
(2) Lefty1 は原始線条の形成を阻害するが Brachyury の発現は抑制しない

上記の全胚培養系を用いて Lefty のシグナルを抑制後、中胚葉細胞の分化マーカーである Brachyury の発現をインサイチュハイブリダイゼーションで検出した。以下の図に示すようにコントロール培養では原始線条が形成され、そこに Brachyury が発現していた。一方 Lefty1 によって Nodal シグナルを抑制した場合、原始線条は形成されなかったが、Brachyury の発現は胚盤葉上層の後方にパッチ状に検出された。また SU5402 投与によって原始線条は形成され、Brachyury も発現したが、原始線条の幅はコントロールに比較して狭かった。以上の結果は、Nodal シグナルの抑制によって予定心臓細胞を含む中胚葉細胞の移動は抑制されたものの、分化マーカーである Brachyury の発現は誘導されたことを示している。



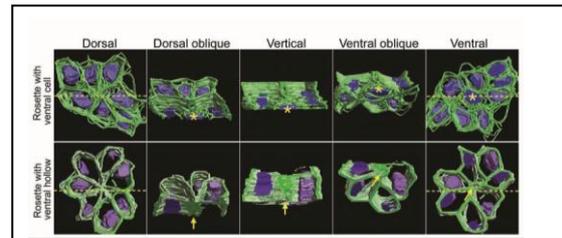
(3) 胚盤葉上層の細胞ロゼットの分布

ショウジョウバエの発生において、上皮である生殖細胞帯の進展運動において細胞ロゼット形成の役割が報告されている。そこでポロネズ運動中の胚盤葉上層の細胞ロゼットの分布について検討した。その結果以下の図に示すように、細胞ロゼットはポロネズ運動が起こっている領域、すなわち胚盤葉上層の後方領域に多く認められることが分かった。この結果は細胞ロゼットの形成とポロネズ運動の関係を示唆するものである。



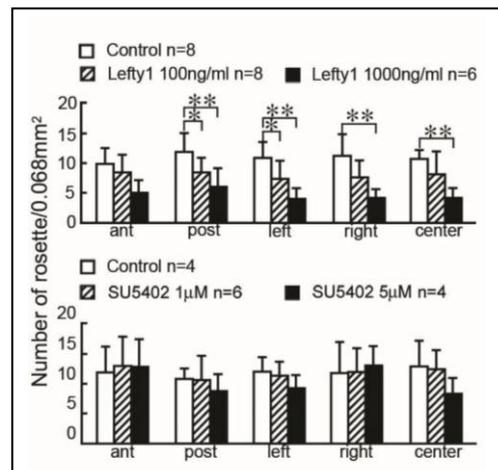
(4) ロゼットの三次元構造

ファロイジン染色の共焦点レーザー顕微鏡像と三次元構築ソフトを使用して細胞ロゼットの立体構造を検討した。その結果、下図に示すように、少なくとも二種類のロゼットが存在することを明らかにした。すなわち、一つはロゼットの中心に細胞がないもの、もう一つは背側から見るとロゼット構造を示しているが、腹側から見ると中央に細胞が存在しているものである。これらのロゼットは胚盤葉上層から細胞が落ち込み、胚盤葉下層の細胞を産み落としている過程を表しているものと推察される。



(5) Lefty1 はロゼット形成を抑制する

次にロゼット構造の形成が Nodal シグナルの抑制によって影響されるかについて検討した。全胚培養した胚盤に Lefty1 を加え、ロゼット形成を検討した。下図に示すようにロゼットは Lefty1 の容量依存性にその形成数が減少した。



(6) まとめ

以上の結果から Nodal シグナルは胚盤葉上層の予定心臓細胞を含む中内胚葉細胞の移動や細胞ロゼットの形成等の胚盤葉上層の形態形成運動に係ることが判明した。今後、細胞ロゼットがポロネズ運動や胞胚の形態形成に果たす役割とその細胞メカニズムについて、ディファレンシャルディスプレイ法で明らかにした遺伝子群を中心に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. Differentiation (in press). 査読有
- ② Yanagawa N, Sakabe M, Sakata H, Yamagishi T, Nakajima Y. Nodal signal is required for morphogenetic movements of epiblast layer in pre-streak chick blastoderm. Dev Growth Diff 53, 366-377, 2011. 査読有
- ③ Nakajima Y. Second lineage of heart forming region provides new understanding of conotruncal heart defects. Congenital Anomalies 50, 8-14, 2010. 査読有
- ④ Takahashi M, Abe M, Yamagishi T, Nakatani K, Okade T, Ogawa T, Konishi H, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Nakajima Y. Local ventilation system successfully reduced formaldehyde exposure during gross anatomy dissection classes. Anat Sci Int, 85, 251-252, 2010. 査読有
- ⑤ Nakajima Y, Sakabe M, Matsui H, Sakata H, Yanagawa N, Yamagishi T. Heart Development before beating. Anat Sci Int 84, 67-76, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① Nakajima Y. Morphological and molecular dissection of retinoic acid (RA)-induced transposition of the great arteries. The joint meeting of the 88th annual meeting of the physiology society of Japan The 116th annual meeting of the Japanese association of anatomists. March 28-30, 2011.
- ② Yanagawa N, Yamagishi T, Nakajima Y. Nodal signaling for morphogenetic movements of epiblast cells in pre-streak chick blastoderm. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting Dec 11-15, 2010, Philadelphia, PA, USA.
- ③ Yanagawa N, Yamagishi T, Nakajima Y. Nodal signal is required for morphogenetic movements of epiblast cells in pre-streak chick blastoderm. Society for developmental Biology 69th Annual Meeting, Albuquerque, New Mexico, Aug 5-9, 2010, Dev Biol 344, A50, 2010.

- ④ Ando K, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting Dec 5-9, 2009, San Diego.
- ⑤ 中島裕司 心臓形成領域の発生と心奇形 第49回日本先天異常学会 2009年6月25日～27日(鹿児島)
- ⑥ 柳川成章、坂田大和、坂部正英、中島裕司 ニワトリ胞胚期から原腸期に起こる予定心臓細胞の遊走 第82回日本解剖学会近畿支部学術集会 平成20年11月29日、大阪市立大学医学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 裕司 (NAKAJIMA YUJI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20390052

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし