

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号： 82406
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22590197
 研究課題名（和文） 器官発生バイオメトリクス

研究課題名（英文） Biometric analysis of organogenesis

研究代表者

西井 清雅 (NISHII KIYOMASA)
 防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教
 研究者番号： 20264020

研究成果の概要（和文）： 器官発生の座標データ蓄積により、その力学を理解できる。本研究課題では、胎児心拍動のビデオ画像をもとに動点追跡を行い、初期心拍動の様式とその異常を詳細に解析した。胎児心刺激伝導の異常は、心内膜床の発生異常を引き起こした。そこで心筋層の刺激-転写連関に直接関与するカルシウム依存転写因子 NFATc4 のタイムラプス画像解析を行い、ギャップ結合による刺激伝導が NFATc4 を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Assembling and analyzing cells' coordinates during development greatly facilitate understanding of organogenetic dynamics. In this study, video recordings of embryonic heart contractions were subjected to point-tracking analysis, where heart functions and patterns of conduction were deduced. Abnormal conduction was causative of an endocardial cushion defect. NFATc4 is a calcium-dependent transcription factor directly responsible for excitation-transcription coupling within the myocardium. Time-lapse imaging of fluorescently-tagged NFATc4 indicated that normal conduction through gap junctions could efficiently activate NFATc4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	0	2,600,000
2011年度	500,000	0	500,000
2012年度	500,000	0	500,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

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： 細胞分化・組織形成

1. 研究開始当初の背景

哺乳類発生学の基本は胎児の連続組織標本作製に始まる。連続標本にわたる細胞の形態変化や染色性を注意深く観察することにより、細胞種や走行能・その方向を判断でき、細胞外基質の分布や線維の配向性を加味して、器官発生を構成する細胞の分化・増殖・発育を記述できる。このようにして蓄積した

器官発生の記述が、今日私たちが手にする発生学の教科書として集大成されている。しかしながらこの方法による記述では器官発生の力学的側面が情報として失われている。従来の器官発生学はパラパラ漫画のごとく発生をアニメーションとして見せることには成功しているものの、コマとコマを結ぶ変位が生じた力学を定性的にしか説明していな

い。研究代表者はこれまで、標的遺伝子組換え法により作製された、心臓発生異常を示すマウス (Development 1997, 124: 3673-3682, Development 2000, 127: 3501-3512, Dev Biol 2008, 322: 65-73、等) の拍動異常をビデオ画像として記録してきた。ここでは、撮影画像を見て判断するという「定性解析」が中心で、変位などの量を測る画像の「定量解析」は十分に行われていなかった。

2. 研究の目的

(1) 「初期心拍動の特性と、ギャップ結合変異による異常」

胎児心拍を記録したビデオ画像から測定点を抽出し、その変位データをもとに刺激伝導の様式を推定するとともに、ギャップ結合による刺激伝導の機能を定量解析により明らかにする。

(2) 「胚盤胞培養内の heterogeneity 解析」

胚盤胞を培養すると、将来胎児本体を構成する細胞群が固まり、内細胞塊を構成する。この細胞塊は一様な細胞群に見えるものの、細胞塊中の位置関係によって分化する器官がある程度決まっている。本研究では胚盤胞培養中の細胞の fate mapping を行い、内細胞塊中での位置との関連及び遺伝子変異による影響を定量解析する。

(3) 「網膜神経節細胞の投射における refinement の解析」

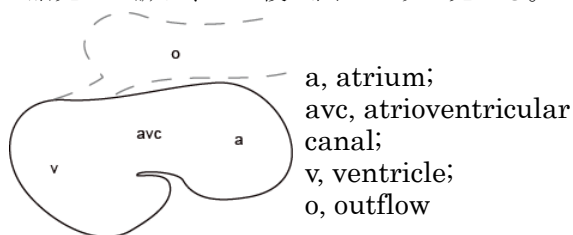
網膜神経節細胞は軸索ガイダンスを受け外側膝状体の所定領域に達した時、複数の軸索側枝を送る。新生児の目が開き、視覚刺激が入力するようになると、刺激を同時に受け取る神経結合の組が選別 (fire together, wire together) される。この過程は refinement と呼ばれ、その過程については詳細な記述がなされていない。そこで左右の眼球に異なる蛍光色素でラベルした神経トレーサーを注入し、日齢ごとの神経対のオーバーラップを計測して神経節細胞一つあたりの投射数を各ステージにおいて推定する。

3. 研究の方法

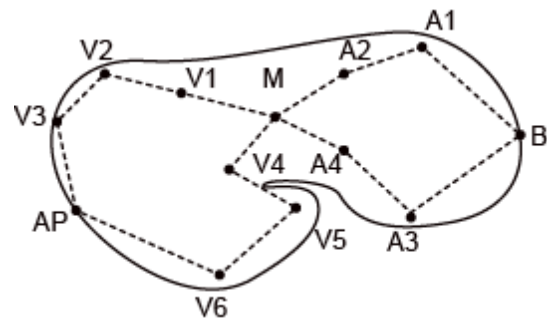
(1) 「初期心拍動の特性と、ギャップ結合変異による異常」

ビデオ画像解析の概略は、次の通りである。

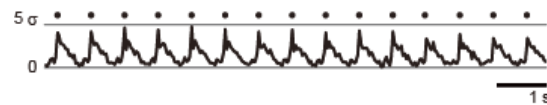
・胎児の心臓は、この模式図のように見える。



・そこから、動点解析の対象となる部位を次のように選別する。

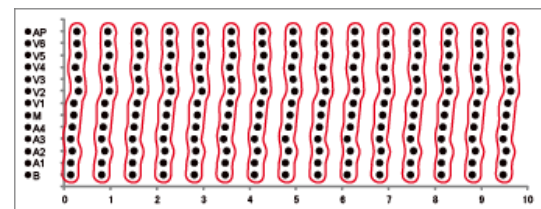


・動点の速度は、次のようになる。測定点上の細胞が興奮した時、筋収縮が同時にかかるため、速度は急速に上がる (付点した部分)。

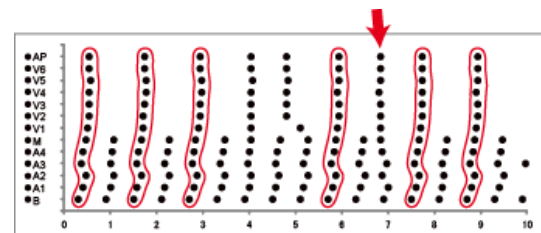


・胎児心臓内各点の興奮をまとめ、その時空間分布を、Raster Plot として表示した。上段は正常な規則正しい拍動パターンから得たもの、下段は伝導障害を示す心筋特異的 Cx45 欠損胎児の拍動から作成したものである。A-V block と、しばしば逆行伝導 (赤矢印) を認めることが分かる。

野生型



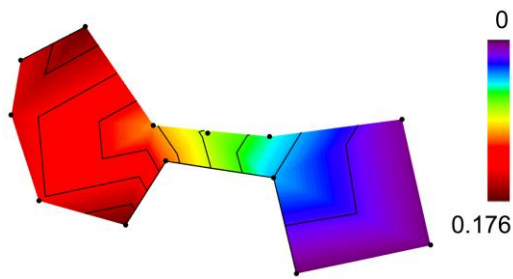
Cx45 変異型



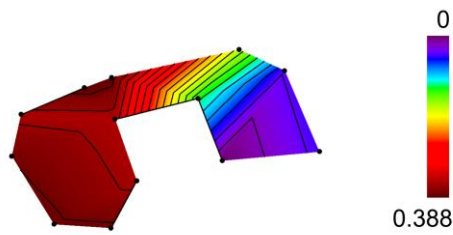
・上の図で赤線で囲った、規則正しい拍動パターンから、伝導の遅延時間を計算し、isochronal map として表示した。上段の野生型では伝導に約 0.18 秒、下段の Cx45 欠損心臓では 2 倍を超える約 0.39 秒を費やしていることが分かる。このことに加え、Cx45 欠損心臓では atrioventricular canal で等高線が密となっており、伝導遅延の主たる原因が atrioventricular canal での伝導障害である

ことも分かる。

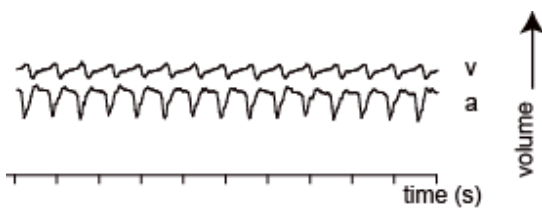
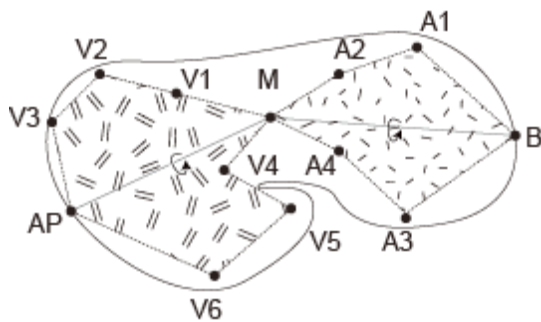
野生型



Cx45 変異型

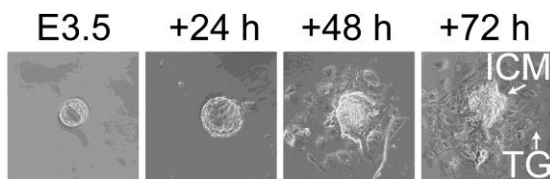


・次に、原始心臓がチューブ状であることを利用し、ビデオから得た2次元座標をB-M軸およびAP-M軸を中心に回転させ、それぞれ心房・心室の体積を推定した。



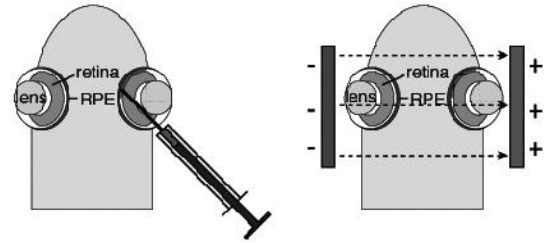
(2) 「胚盤胞培養内の heterogeneity 解析」

胚盤胞培養を行い、培養皿上の支配面積を計測した。

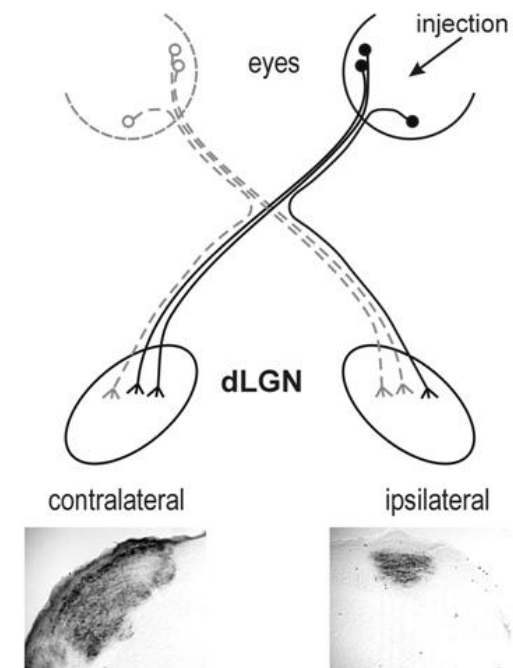


(3) 「網膜神経節細胞の投射における refinement の解析」

・網膜下に DNA 溶液を注入し、tweezer 型電極で頭部を挟んで遺伝子導入した。



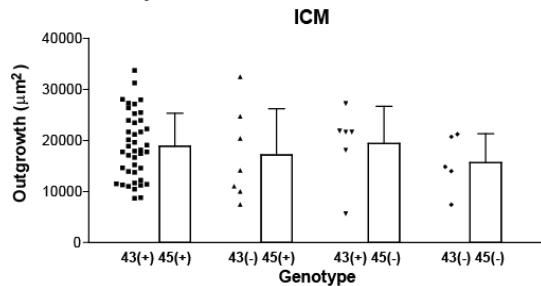
・ラベルされた神経節細胞の神経終末が外側膝状体で形成する特徴的なパターンを解析した。



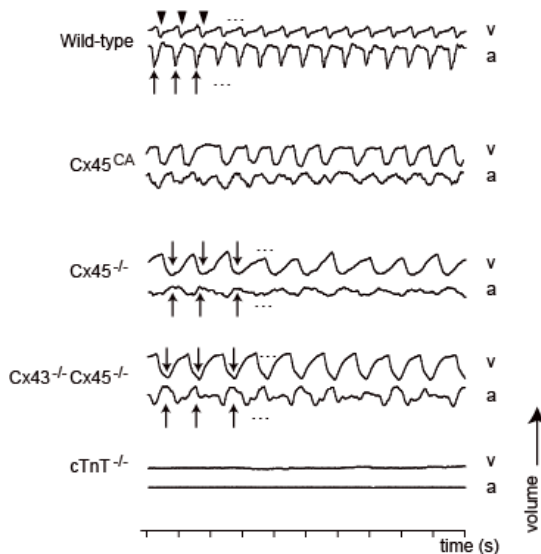
4. 研究成果

(1) Cx45 欠損マウスの多彩な表現型の理解
我々の研究グループは、以前に Cx45 欠損マウスの心臓における異常を報告した。しかし、その後ドイツの研究グループが同じマウスでは血管系の異常があり、心臓の異常は二次的なものであるとの報告を行った。実際に、元となる異常は、心臓から生じるのだろうか、それとも血管から生じるのだろうか？本研究では、心筋層で Cx45 が欠損するマウス、血管内皮層で Cx45 が欠損するマウス、Cx45 と相補的に発現して Cx45 欠損マウスの表現型を修飾すると想定された Cx43 と Cx45 の二重欠損マウス、そして心拍動のない心筋トロポニン T 欠損マウスの表現型をさまざまな手法を用いて比較した。

①Cx43 による相補は、限定的である。Cx43 と Cx45 が大部分のギャップ結合を構成するとされる胚盤胞内細胞塊の発育に、Cx43・Cx45 欠損による影響は見られず、また心拍動の画像解析においても Cx43 欠損による変動はなかった。



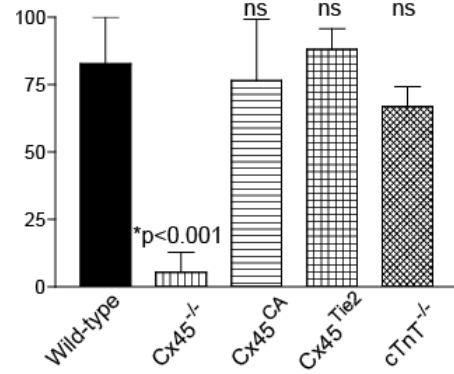
②心筋特異的 Cx45 欠損マウスは、方法欄に示したように、A-V block を示し、致死を示し、内皮特異的 Cx45 欠損マウスが正常に発生すること、また心筋特異的 Cx45 欠損マウスが Cx45 欠損マウスの示す血管表現型をより軽微ながらひととおり示すことから、Cx45 欠損による一次的な異常は、心筋層の刺激伝導障害とそれに起因する心拍出障害であることが結論付けられた。



Cx45^{CA}, 心筋特異的 Cx45 欠損
Cx45^{Tie2}, 内皮特異的 Cx45 欠損
cTnT^{-/-}, 心筋トロポニン T 欠損

③心内膜床障害は、心筋層で Cx45 が完全に欠損したときに起こる。心内膜で心内膜床形成に必要なカルシウム依存転写因子 NFATc1 は、Cx45 欠損マウスにおいてのみ不活性化される。心拍動のない心筋トロポニン T 欠損マウスでは不活性化が起こらないため、Cx45 が構成する心筋層のギャップ結合が、心内膜を活性化させるためのシグナル経路に特異的に絡んでいることが分かる。

NFATc1-active cells



④Cx45 が関与する、心筋層ファクターの正体は何だろうか？DNA マイクロアレイの結果は、心筋層の NFATc2/c3/c4 シグナルの関与を示唆していたため、これらのカルシウム依存転写因子の活性化（核移行）に Cx45 が必要であるのか、培養細胞上で検証した。td-Tomato 融合 NFATc4 を発現する N2A 細胞にパッチピペットから Ca²⁺ または IP₃ を注入したところ、Cx45 発現ベクターによる Cx45 発現のあるときにピペット注入細胞の近隣の細胞で td-Tomato 融合 NFATc4 の活性化（核移行）が起こることが分かった。下の表は、Ca²⁺、IP₃ をそれぞれインジェクションした際に核移行の見られた細胞の分布頻度を計数したものである。

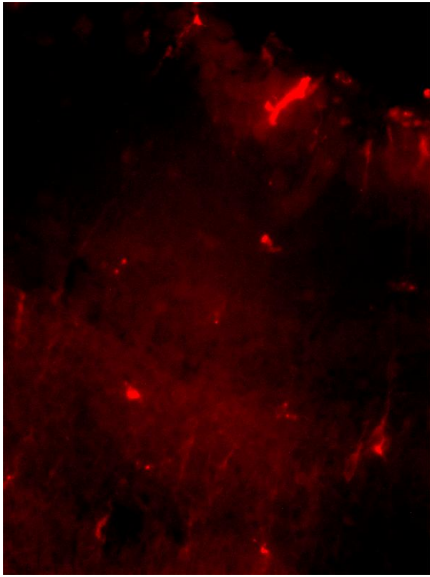
	injected cell only	injected cell + adjacent cells	injected cell + distant cells
Ca ²⁺			
Control (7)	3	2	1
Cx45 (5)	1	3	5
IP ₃			
Control (3)	4	0	0
Cx45 (4)	0	4	3

①～④の所見を総合し、論文投稿中である。

(2) 「網膜神経節細胞の投射における refinement の解析」

本原稿執筆時点で、研究代表者は Harvard 大学 Neurobiology 教室に在籍し、網膜エレクトロポレーション法によりさまざまな発現ベクターを新生児網膜に導入してその効果を解析中である。次の写真に示すように、発現ベクターは網膜の広範囲にまばらに導入させることができた。Cre/loxP 法により、蛍光遺伝子を導入した細胞で遺伝子組換えが起こるようにすれば、遺伝子変異を起こした細胞の挙動を正常細胞に囲まれた環境下で

追跡することが可能となり、今後の解析により解明していく予定である。



防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号： 20264020

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

① 第117回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2012年3月27日 甲府

Cx45ギャップ結合によるNFATc転写因子の細胞内局在制御

西井 清雅、関 明子、小林 靖、柴田 洋三郎

② 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2011年3月28日 横浜

発生初期心拍動に異常を示す遺伝子変異マウスの心拍動画像解析

西井 清雅、関 明子、小林 靖、柴田 洋三郎

③ 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月8日 神戸

胎生初期心拍動に異常を示す遺伝子変異マウスの心拍動パターン解析

西井 清雅、関 明子、小林 靖、柴田 洋三郎

6. 研究組織

(1)研究代表者

西井 清雅 (NISHII KIYOMASA)