

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23370092

研究課題名(和文)冠動脈・心外膜前駆細胞の動態とその制御

研究課題名(英文)The regulation of dynamics of coronary and epicardial progenitor cells

研究代表者

石井 泰雄 (ISHII, Yasuo)

京都産業大学・総合生命科学部・研究員

研究者番号：20582430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：心臓が一生にわたって拍動を続けられるのは、心壁を走る冠動脈が酸素と栄養分を心筋のすみずみに供給するからである。冠動脈の形成には心臓の表面を覆う心外膜が必須である。心外膜は、心臓の外に生じた前駆細胞集団が、ある特定の発生段階に心臓に追加されることによって生じる。われわれは、胚が大きく母体外で発生する鳥類胚の利点を生かして実験発生学的解析や遺伝子導入実験等を行い、主に以下の点を明らかにした。(1) 心外膜前駆体の心臓への融合はEph-ephrinシグナル伝達を介した接触依存性のシグナル伝達の制御を受ける。(2) 心外膜由来間充織の形成と冠動脈の形成はともに血管内皮細胞増殖因子により促進される。

研究成果の概要(英文)：Coronary vessels supply the oxygen and nutrients to the entire heart muscle. Early embryonic heart, however, is avascular. The development of coronary vessels depends on a recruitment of an extracardiac rudiment called the proepicardium (PE). The PE, a villous protrusion that forms on the coelomic surface of the liver, protrudes in the pericardial cavity to fuse to a beating heart and cover its entire surface, forming the epicardium. What regulates the PE fusion and how epicardial cells later contribute to coronary vascular development still remain unclear. Our experimental approaches using the avian model revealed that (a) contact-dependent tissue interactions, mediated by the Eph/ephrin signaling, promotes the PE fusion, and that (b) both the epicardial EMT and coronary vascular development is promoted by epicardial misimpression of vascular endothelial growth factor-A.

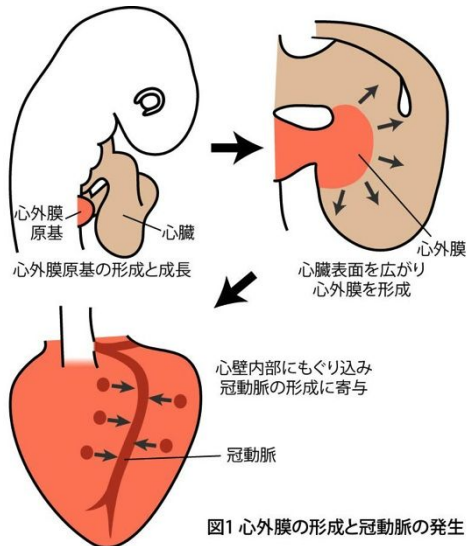
研究分野：発生生物学

キーワード：心臓 冠動脈 心外膜 ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

(1)脊椎動物の器官は、多くの種類の細胞から構成されている。この多様性はしばしば、起源と性質の異なる複数の細胞集団が発生の過程で融合することによってもたらされる。心臓はその好例である。心臓が生涯にわたって拍動を続けることができるのは、冠動脈が心臓の筋肉組織のすみずみに血液を送り届けるからであるが、発生初期の心臓は冠動脈をもたない。冠動脈の形成は、発生のある時期に心外膜原基と呼ばれる細胞集団が心臓に新たに追加されることによって始まる。心外膜原基は肝臓の近傍に生じる中胚葉性の突起であり、原始心臓のむき出しの心筋に向かって成長し、その表面に接着する。その後、心臓表面を広がり、心外膜と呼ばれる新たな細胞層を心臓表面に形成する。心外膜の一部の細胞は、上皮-間充織転換を経て心筋層に向かってもぐり込み、冠動脈の一部やその周囲の結合組織へと分化する (図 1)。

われわれは心臓からの BMP シグナルが、心外膜原基を心臓に向かって成長させることを明らかにしてきた¹。しかし、心筋との接触後に起こる心外膜原基の融合過程そのものを制御するメカニズムについてはよくわかっていなかった。また心臓に進入した後の心外膜細胞の移動や分化がどのような分子機構の制御の下で起こり、それが冠動脈の形成とどのような関係にあるのかもよくわかっていなかった。



2. 研究の目的

- (1) 心外膜原基の心臓への融合を制御する新たな組織間相互作用およびその分子機構を明らかにする。
- (2) 心外膜細胞の移動や分化を制御する分子機構および冠動脈形成との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

ニワトリ胚を主な実験材料として用いた。免疫染色、in situ ハイブリダイゼーション、組織移植、in vitro 培養、遺伝子導入等の

実験手法を用い、心外膜原基細胞の移動や分化およびそれらを制御する組織間相互作用や分子機構を解析した。

4. 研究成果

(1) 接触依存性の組織間相互作用が心外膜原基の心臓への融合を制御する

1 鳥類胚の心外膜原基は常に、心臓の房室接合部と呼ばれる領域に融合し、そこから心外膜として心臓表面を広がっていく。この時期のニワトリ胚心臓を詳しく観察したところ、心外膜原基が、融合の起こる房室接合部だけでなく、融合の起こらない心房とも接していることがわかった (図 2)。この観察結果は、心筋との接触の有無以外に、心外膜原基の融合を制御する何らかの未知のメカニズムがあることを示唆している。

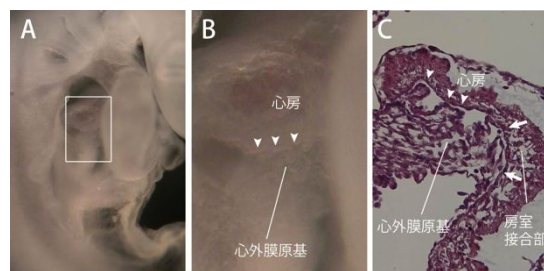


図2 心外膜原基は心房と近接している。(A) 孵卵 2.5 日ニワトリ胚。(B) A を拡大。心外膜原基は心房と接触している (矢じり)。(C) 心外膜原基の心臓への融合。心外膜原基を覆っていた中皮組織が開口し、心臓表面を覆い始める (C, 矢印)。心房ではこの開口は起こらない (矢じり)。

2 心外膜原基の心臓への融合を解析するため、三次元 in vitro 共培養法を確立した (図 3A)。単離した心外膜原基と心筋を接した状態で培養するこの新たな手法を用いることにより、接触後の経時変化をはじめ、心外膜原基の融合過程をより詳しく解析できるようになった。この共培養法を用いた解析によって、心外膜原基の融合が、心房よりも房室接合部に対してより起こりやすいことが明らかとなった (図 3B,C)。それを支持する結果は、in vivo 組織移植による解析からも得られた。接触依存性あるいは短距離の組織間相互作用が、心外膜原基の領域特異的の融合に関与していることが示唆された。

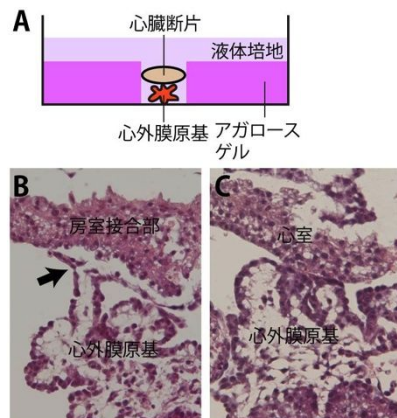


図3 In vitro 共培養法による解析。(A) 方法。単離した心筋と心外膜原基を接した状態で培養する。(B,C) 房室接合部と心室との培養。矢印は心外膜原基の融合部位を示す。

3 上記の組織間相互作用を担うシグナル分子の探索を行った。その結果、膜結合型シグナル分子である EphB3 が、心臓の房室接合部で高レベルに発現することを見いだした。なお、その発現は心房では検出されなかった。一方、心外膜原基では、EphB3 の受容体としてはたらく ephrinB1 および ephrinB2 の発現が検出された。すなわち、EphB-ephrinB シグナル伝達は、心外膜原基が房室接合部と接した時のみ活性化されると考えられる。

4 Eph-ephrin シグナル伝達の活性化が、実際に心外膜原基の融合部位に影響を与えるかどうかを調べるため、遺伝子導入実験を行った。In ovo リポフェクション法¹を用いて、EphB3 の細胞外ドメインを心臓の広い範囲で強制発現させた。その結果、心外膜原基の心房への異所的な融合が認められた (図4)。加えて、Eph-ephrin シグナル伝達を阻害することが予想される ephrinB1 の細胞外ドメインを強制発現させると、心外膜原基の心臓への融合も抑制された。

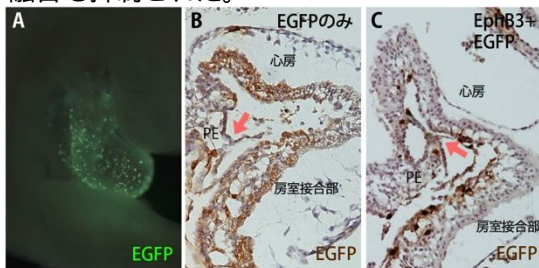


図4 In ovo リポフェクションおよびEphB3強制発現 (A) In ovo リポフェクション。(B) EphB3強制発現による心外膜原基融合部位の変更。コントロール胚 (B)およびEphB3を強制発現させた胚 (C)。赤い矢印は、心外膜原基 (PE)の融合部位を示す。

5 以上の結果は、Eph-ephrin シグナル伝達を介した組織間相互作用の心臓発生における新たな役割を示すものである。われわれの結果は、EphB-ephrinB シグナル伝達が心外膜原基の心臓への融合を促進すること、EphB3 が心房で発現しないことが、心外膜原基が心臓の正しい場所に融合する上で重要であることを示唆している。心外膜原基の融合は、分泌性因子 BMP による心外膜原基の誘引作用¹と、EphB-ephrinB を介した接着依存性の組織間相互作用の、少なくとも二段階の制御を受けているものと思われる。心外膜原基の融合部位が心臓の発生にどのような影響を及ぼすかは現時点では不明である。冠循環と体循環の連絡に重要であることが考えられるが²、これは今後の研究課題と言える。

(2) VEGF-A は心外膜の間充織転換を促進するとともに心異所性血管の形成を引き起こす

¹ 心臓の表面は、一層の細胞層からなる薄い上皮組織によって覆われている。この上皮組織は心外膜とよばれ、冠動脈の発生にとって不可欠である。冠動脈は、その形成段階から心臓の中である程度決まった分布を示すことから³、その時点で既に冠動脈の走行に影響を与える何らかの位置情報が心臓内部に存在することが予想される。そのような位置

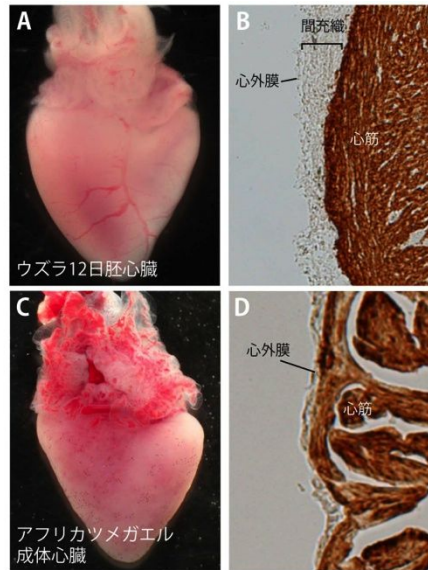


図5 鳥類胚心臓と両生類心臓の比較

情報に関する手がかりを得るため、われわれは明瞭な冠動脈をもつ鳥類胚心臓と冠動脈をもたない両生類の心臓の間で、心壁の組織構築を比較した。鳥類胚心臓の房室溝と室間溝には、心外膜直下に厚い間充織があり、それが冠動脈の形成の場となっている。一方、冠動脈を持たないアフリカツメガエル的心臓にはこの間充織がほとんどない (図5)。われわれは、心外膜下の間充織層の分布が冠動脈の発生に関係していると考え、その仮説を実験に基づくアプローチによって検証することとなった。

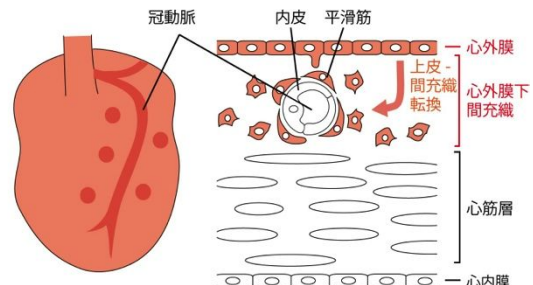


図6 心外膜の上皮-間充織転換による間充織層の形成

² 心外膜下の間充織は、心外膜の一部の細胞が上皮-間充織転換を経て心筋層に向かってもぐり込むことによって生じる (図6)。これまでに VEGF-A, FGF-2, PDGF-B, TGFβ1, TGFβ2 といった成長因子が、培養した心外膜細胞の間充織転換を促進することがわかっている¹。われわれは、ニワトリ胚 cDNA からクローニングしたこれらの成長因子遺伝子を To12 トランスポゾンベクター^{4,5} に組み込み、心外膜への導入用に改良した新たな in ovo リポフェクションプロトコルを用いてニワトリ胚心外膜に導入し、強制発現させた。導入した遺伝子のうち *Vegf-a* が際立った効果を示した (図7)。導入部位では心外膜の上皮-間充織転換が促進され、心外膜下の間充織が肥厚した。その肥厚内部には、内皮と平滑筋に囲まれた血管様の胞状構造が見られた。心筋で *Vegf-a* 遺伝子を強制発現させた場合には、明

瞭な影響は見られなかった。また *Vegf-a* 遺伝子を導入した細胞の多くは異所性血管の近傍に分布していたが、それらが内皮や平滑筋に積極的に寄与することを示唆する結果は得られなかった。

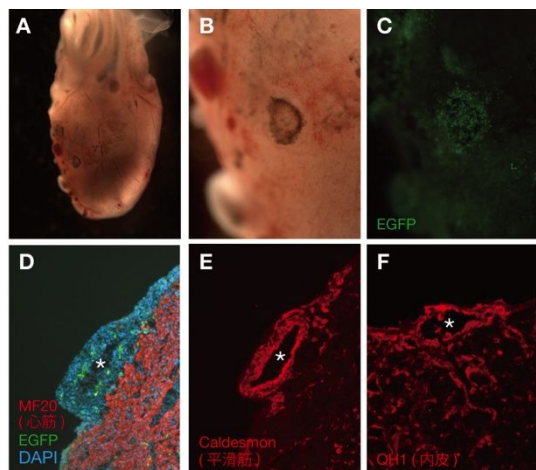


図7 *Vegf-a* 強制発現は異所性血管形成を引き起こす (A-C) *Vegf-a* を強制発現させたニワトリ 10.5 日胚心臓。固定前に墨汁を血管に注入した。心臓表面に墨汁を含んだ隆起が見られる。(D) 隆起の組織切片。* は異所性血管様構造の内腔を示す。(E) 平滑筋マーカーカルデスモンに対する染色。(F) *Vegf-a* を強制発現させた 10.5 日胚ウズラ心臓。血管内皮を認識する QH1 抗体を用いて免疫染色した。

3 以上の結果は、心外膜の上皮-間充織転換と血管形成が、共通のシグナル分子の制御のもとで起こる密接に関連した発生イベントであるという考えを支持する証拠と言える。心外膜由来の間充織の分布と血管形成の間の因果関係を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。間充織は、冠動脈形成をサポートする周囲環境を提供する役割を果たしているのかもしれない。

<引用文献>

- Ishii, Y., Garriock, R. J., Navetta, A. M., Coughlin, L. E. and Mikawa, T. (2010). BMP signals promote proepicardial protrusion necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Dev Cell* **19**, 307-316.
- Icardo, J.M., Guerrero, A., Duran, A.C., Colvee, E., Domezain, A, and Sans-Cooma, V. (2009). The development of the epicardium in the Sturgeon *Acipenser naccarii*. *Anat Rec*, **292**, 1593-1601.
- Kattan, J., Dettman, R. W., and Bristow, J. (2004) Formation and remodeling of the coronary vascular bed in the embryonic avian heart. *Dev Dyn* **230**, 34-43.
- Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., and Takahashi, Y. (2007) Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken

- embryos. *Dev Biol* **305**, 616-624
- Wang, Z., Yasugi, S., and Ishii, Y. (2016). Chx10 functions as a regulator of molecular pathways controlling the regional identity in the primordial retina. *Dev Biol* **413**, 104-111.

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)

[雑誌論文](計 4 件)

- Wang, Z., Yasugi, S., Ishii, Y. (2016). Chx10 functions as a regulator of molecular pathways controlling the regional identity in the primordial retina. *Dev. Biol.* 413, 104-111, 査読あり. doi:10.1016/j.ydbio.2016.03.023
- 石井 泰雄, 板野 直樹: 幹細胞ニッチの形成機構解明と血管再生療法への応用, 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第 14 号, 2015 年, 65-69 頁, 査読なし
- 石井 泰雄, 板野 直樹, 今野 兼次郎: 幹細胞ニッチの形成機構解明と血管再生療法への応用, 京都産業大学先端科学技術研究所所報 第 13 号, 2014 年, 81-88 頁, 査読なし
- 石井 泰雄, 三川 隆: 冠動脈発生の分子メカニズム, *Annual Review 循環器* 2012, 6-14 頁, 2012 年, 査読なし

[学会発表](計 17 件)

- 石井 泰雄, 小西 博郷: 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は心外膜への作用を介して冠動脈形成を促進する. 日仏生物学会第 183 回例会. 2015 年 12 月 19 日. キャンパスプラザ京都 (京都府京都市).
- 石井 泰雄, 小西 博郷: 鳥類胚冠状血管パターン形成における心外膜由来細胞の役割. 日本動物学会第 86 回大会. 2015 年 9 月 17 日~2015 年 9 月 19 日. 朱鷺メッセ (新潟県新潟市).
- Hideaki Iida, Tiantian Yang, Sadao Yasugi, Yasuo Ishii: Multiple developmental timers coordinate vertebrate organ morphogenesis. 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 2015 年 6 月 2 日~2015 年 6 月 5 日. つくば国際会議場 (茨城県つくば市).
- 石井 泰雄: 心臓発生における冠動脈形成細胞の移動と分化. 日仏生物学会第 181 回例会 (招待講演). 2014 年 12 月 6 日. 京都産業大学 むすびわ館 (京都府京都市).
- Yasuo Ishii, Kiyoe Fujimoto, Wang Zi, Sadao Yasugi: Expression of Eph/ephrin family genes in the heart tube and proepicardium of the chick embryo. 47 th Annual Meeting of the Japanese Society

of Developmental Biologists. 2014年5月28日～2014年5月29日. ウィンクあいち (愛知県名古屋市).

石井 泰雄: 器官形成研究のモデル生物としての鳥類胚～心臓発生における器官原基の統合. 第84回日本生化学会大会(招待講演). 2011年9月22日. 京都国際会館 (京都府京都市).

Yasuo Ishii, Shigenobu Sugimoto, Sadao Yasugi: Sustained expression of coronary vessel/epicardial progenitor marker genes in the four-chambered chick embryonic heart. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 2011年5月20日. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~yishii/devbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 泰雄 (ISHII, Yasuo)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号: 20582430