

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249047

研究課題名(和文) 心臓大血管形成における広域器官形成ネットワークの概念と組織構築モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of the concept of broad organ-forming network in cardiovascular formation and models for tissue reconstruction

研究代表者

栗原 裕基 (KURIHARA, Hiroki)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20221947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、心臓大血管形成に関与する新たな起源領域として、鰓弓を中心とする顎顔面骨格の起源となる前耳胞頭部神経堤細胞を冠動脈平滑筋など心臓構成組織の一起源として同定するとともに、新たな中胚葉領域が心筋や血管内皮細胞の分化に関与する可能性を見出した。これらの細胞はエンドセリンやセマフォリンシグナルなどを介した細胞間相互作用によって各々の分化や器官形成に寄与していると考えられる。これらの新しい細胞系譜の同定により、既知の系譜を含めた細胞間ネットワークの解析を進めることで器官形成機構の詳細が明らかになるとともに、組織再生モデルの確立にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the preotic cranial neural crest, which gives rise to craniofacial skeletons especially in the pharyngeal arch-derived structures, as a novel origin of cells constituting the heart to differentiate into coronary artery smooth muscle cells and other various cell types. In addition, we discovered another novel candidate origin of the heart in a region of mesoderm, which may contribute to cardiomyocytes and vascular endothelial cells. These cells from novel origins may participate in cardiovascular differentiation and morphogenesis through cell-to-cell interactions via signaling molecules such as endothelin and semaphorin-plexin. Identification of these cell origins and lineages enables us to analyze a broad cellular network to drive organogenesis and to establish different models for tissue regeneration from a novel viewpoint.

研究分野：発生学・循環器内科学・血管生物学

キーワード：心臓 血管 発生・分化 循環器 再生医学

1. 研究開始当初の背景

心臓の起源は、これまで胚の頭側に生じる心臓半月と呼ばれる中胚葉由来の領域とされてきたが、約 15 年前に鰓弓に由来する二次心臓予定領域が心流出路や右室、両心房の起源として同定されて以来、複数の領域に由来する細胞が集まって心臓原基を形成し、それらの相互作用を経て精緻な器官構造が形成されていくことが明らかになった。また、大血管も二次心臓予定領域を含む中胚葉と外胚葉に由来する心臓神経堤細胞など領域毎に異なる起源をもち、冠血管や一部の心筋は心流入路近くに形成される心外膜前駆組織に由来することが明らかにされた。このように、心臓大血管は、従来考えられていた以上に多様な細胞集団が周辺組織から集まり、全体として合目的な統合性をもった器官として形成されると考えられており、これらの過程で細胞間シグナルがどのように働き、多彩な細胞分化の遺伝子プログラムを作動させるのかが現在極めて注目されている。

一方、胎生期におけるさまざまな器官の形成は、段階的に機能を獲得しつつ、ほぼ同時並行で進行している。その過程では、細胞の移動やシグナルの授受、各臓器の機能によって互いに影響し合いつつ個体の中で各臓器が精妙に位置づけられていく。一方、これまでの器官形成研究は、各器官の自律的な形成プログラムの解明に焦点が当てられ、形成過程での多臓器間の機能的ネットワークの存在は多くの場合捨象されてきた。しかし、例えば国史研究において外交史が欠かすことが出来ないように、各臓器の形成を他の組織・器官とのネットワークの中で捉えることは、器官形成を理解する上で重要な視点である。心臓大血管の形成に関しては、ヒト先天性心疾患は他臓器の異常を合併することが多く、中でも心奇形に顔面や胸腺、副甲状腺の形成異常を伴う染色体 22q11.2 欠失症候群に示されるように、心臓大血管と頭部顔面の形成は細胞の起源や相互作用において密接に関連しているにもかかわらず、その関連については十分検討されていない。しかし最近、顔面筋の多くが二次心臓予定領域に由来することが明らかにされるなど、心臓大血管と頭部顔面形成の複合的研究の必要性が論じられはじめています。

我々はこれまでマウス発生工的研究により、エンドセリン-1(ET-1)/ET-A 受容体(ETAR)シグナル経路が神経堤細胞による鰓弓・心大血管の形成に重要な因子であることを明らかにしてきた(Kurihara Y et al., Nature 368:703, 1994; Kurihara Y et al., JCI 96:293, 1995)。また、Cre-変異 lox 系を用いたりコンビナーゼ依存性遺伝子交換(RMCE)によって ETAR 遺伝子座に外来遺伝子を高い効率でノックインできる系を確立し(Sato T et al., Development

135:755, 2008)、これにより ET-1 がホメオボックス遺伝子 Dlx5/6 の誘導を介して上顎・下顎領域決定の分子スイッチとして機能することを証明した(Sato T et al., PNAS 105:18805, 2008)。さらに、ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスの解析から、ETAR を発現する細胞群が一次心臓領域の腹側に特異的な心臓起源領域を形成することを明らかにした(Asai R et al., Development 137:3823, 2010)。血管系に関しては、血管新生過程の細胞動態を可視化し、新たなコンピューター解析法を確立して樹状構造形成過程での細胞の複雑な振る舞いや先端細胞の入れ替わり現象を明らかにした(Arima S et al., Development 138:4763, 2011)。これらの成果に加え、ET-1/ETAR ノックアウトマウスの解析およびニワトリ胚を用いた実験から、心臓神経堤細胞よりもさらに広い領域の頭部神経堤細胞が冠動脈の形成に重要な役割を果たしていること、鰓弓領域が心臓において新しい役割を担っていること、心流入路の ETAR 発現細胞群が刺激伝導系や肺発生と密接に関係している可能性があることなどが次々と明らかになった。これらの知見は、心臓大血管の形成がより広範囲の領域と深く関与し、器官形成を従来よりも広い領域間ネットワークの観点から捉える必要があることを示唆している。こうした観点から心臓大血管形成の研究を進めることで、「広域器官形成ネットワーク」と呼びうる概念に実質的基盤を与え、器官形成研究に新しい視点を提供することができるのではないかと考えた。さらに、細胞起源の多様性や位置情報、時空間的動態を考慮した細胞分化の最適化を検討することは、細胞移植による組織再構築を目指した再生治療にも大きく貢献しうると考え、本申請を着想するに至った。

2. 研究の目的

胎生期における器官形成は閉じた領域で各々独立して進むのではなく、複数の領域や組織間の細胞移動、種々のシグナルを介した相互作用によって進行し、合目的な諸器官の統合性が築かれていく。本研究では、心臓大血管形成における細胞起源の多様性と動態に着目し、従来知られていた心大血管の起源領域に加え、頭部神経堤や鰓弓、肺形成領域、流入路付近の中胚葉組織など広範囲の領域が関与することを示すとともに、新たな細胞起源と幹細胞/前駆細胞の同定、細胞運命の選択と分化機構、細胞の動態や機能の特異性を明らかにすることにより、心臓大血管を中心とした「広域器官形成ネットワーク」の概念、さらには細胞起源と動態の基盤に立った細胞移植による組織構築モデルを確立することを目標とした。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスと鳥類胚を用いた発生学的実験により、頭部領域の神経堤細胞、鰓弓領域中胚葉、一次心臓領域流入路を中心に、索細胞系譜の標識と追跡、空間的な分布パターンの観察、細胞運命と分化制御シグナルの解析を行った。さらに、組織構築原理を解明するため、マウス大動脈組織片培養による血管新生モデルにおいて、SYTO 蛍光色素による内皮細胞選択的ラベリングと *in vitro* 新生血管のライブイメージングによる単一細胞レベルの動態計測と数理モデリングを行い、心臓血管形成研究の新たな基盤確立を試みた。さらに、これらの実験系において構成細胞の多様性や分化特性を明らかにするため、単一細胞レベルのトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 心臓発生起源としての前耳胞神経細胞とその分化関連シグナルの同定

ロンボメア 6~8 に相当する後耳胞領域由来の神経堤細胞は従来心臓神経堤細胞として大血管の平滑筋や大動脈-肺動脈中隔の形成に寄与することが知られていたが、耳胞よりも頭側にあり、頭部骨格の形成に中心的役割を果たす頭部神経堤細胞（前耳胞神経堤細胞）先行して心臓内に遊走し、一部は冠動脈近位部の平滑筋細胞に分化することを見出した。また、ET-1/ETAR シグナル欠損およびその下流と考えられる G_{12/13} の神経堤特異的欠損によって冠動脈形成異常をきたすことから、前耳胞神経堤細胞による冠動脈平滑筋形成過程に ET-1/ETAR シグナルが関与していることが明らかになった。

さらに、冠動脈近位部の平滑筋に加えて大動脈弁・肺動脈弁を形成する間葉系細胞などに分化するとともに、c-Kit 陽性の未分化細胞として幹細胞の形質を保っている可能性のある細胞として存在することが明らかになった。マウスにおける薬理学的実験により、これらの前耳胞神経堤細胞の心臓への遊走・分化にはレチノイン酸シグナルが関与している可能性が考えられた。

本細胞群は骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化して頭部骨格形成に関与する能力をもつが、この系譜につながる細胞が冠動脈近位部の平滑筋を構成することは、同部位が動脈硬化病変、とくに石灰化の好発部位であることと符合し、臨床的にも興味深い発見となった。

(2) 鰓弓組織に由来する冠動脈および心臓リンパ管の系譜と関連シグナルの同定

第 1, 2 鰓弓領域に由来する中胚葉系細胞が大動脈基部の血管内皮細胞ネットワーク形成に寄与していることが最近明らかになってきたが、本研究でも蛍光ラベル実験でこれを指示する結果が得られた。さらに

遺伝子改変マウスの解析により、冠動脈および大動脈周囲のリンパ管形成において Semaphorin-Plexin シグナルが関与していることが明らかになった。

(3) 一次心臓領域流入路細胞の系譜解析

心臓発生初期において ETAR を発現する細胞群が一次心臓領域の腹側に特異的な心臓起源領域を形成することをすでに明らかにしたが、新しい技術としてマウス 鳥類間のキメラ移植実験による心臓形成の解析系を確立し、マウス心流入路中胚葉が刺激伝導系の形成に寄与する可能性を示した。さらに、タモキシフェン誘導型 Cre 発現マウスの作成により、発生初期の ETAR 陽性細胞が寄与する領域を確認するとともに、単一細胞レベルのトランスクリプトーム解析によりこの細胞群の特性が明らかになりつつあり、新しいテーマへと研究を進展させている。

(4) 血管形成における組織構築原理の解明

マウス大動脈片組織培養による *in vitro* 血管新生のタイムラプスイメージングにおいて、伸長する分枝における細胞運動を伸長方向に対して一次的に投影し、その基本的な動態が細胞の速さと方向に関する 2-状態の確率論的推移によって説明可能であることを見出したが、先端細胞の追い越しについては細胞間の相互作用による束縛条件を加える必要があり、対応する現象を実験的に証明した。これらにより、個々の細胞の自律的運動と細胞間相互作用との組み合わせによって、分枝を想定しない一次的血管伸長過程での追い越し現象や速度変化などを伴う複雑な細胞動態が説明できることを明らかにした。

一方、分枝を伴った血管網の伸長過程や血管新生因子の影響などを含めた血管新生過程のより進んだモデルの確立と対応する血管細胞動態の特徴抽出、株化細胞を用いた血管新生過程の再構成実験系の確立などを行い、分枝形成による組織構築のロジックを明らかにする新たなステップへと研究を進展させた。

(5) 心臓を中心とする広域器官形成ネットワーク

本研究により、頭部形成に中心的役割を果たす前耳胞神経堤細胞が心臓内に流入して冠動脈などの主要組織形成に関与することが明らかになったが、他の研究グループから二次心臓領域の細胞が頭部の骨格筋にも寄与することが明らかにされ、これらの細胞が互いにネットワークを形成しながらそれぞれの領域で特異的な分化方向へと誘導され組織器官形成に関与していることが明らかになってきた。さらに、前耳胞神経堤細胞と後耳胞神経堤細胞が、心臓へと遊

走する過程でそれぞれ異なる機序で甲状腺の形成に寄与することも、研究分担者の富田を中心とする研究によって明らかになった。

一方、こうした細胞間ネットワークが形成する頭部器官の一つである中耳構造の形成機構の比較発生学的研究から、理研の倉谷滋博士らとの共同研究が進展し、哺乳類と単弓類（爬虫類、鳥類）の鼓膜は進化の過程でそれぞれ独立に獲得されたという進化生物学上の仮説を実験発生学的に証明することができた。本研究は、器官形成における細胞間ネットワークが進化の過程でどのように新形質を獲得していったのかを実証的に解明可能であることを示したのもであり、今後の器官形成研究の基盤としても新たな視点と方法論を与えるものと考えられた。

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24件)

Maeda K, Asai R, Maruyama K, Kurihara Y, Nakanishi T, Kurihara H, Miyagawa-Tomita S. Postotic and preotic cranial neural crest cells differently contribute to thyroid development. *Dev. Biol.* 409:72-83, 2016.

Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki SO, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-Ya K, Mimori K, Suzuki A. Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in *Mob1a/1b*-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113:E71-80, 2016.

Takechi M, Kitazawa T, Hirasawa T, Hirai T, Iseki S, Kurihara H, Kuratani S. Developmental mechanisms of the tympanic membrane in mammals and non-mammalian amniotes. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 56:12-17, 2016.

Sugihara K, Nishiyama K, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by

experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep.* 13(9):1814-27, 2015.

Kitazawa T, Takechi M, Hirasawa T, Adachi N, Narboux-Nême N, Kume H, Maeda K, Hirai T, Miyagawa-Tomita S, Kurihara Y, Hitomi J, Levi G, Kuratani S, Kurihara H. Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids. *Nat. Commun.* 6:6853, 2015.

Kitazawa T, Fujisawa K, Narboux-Nême N, Arima Y, Kawamura Y, Inoue T, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Kodama T, Kim K-S, Sato T, Uchijima Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Minoux M, Rijli FM, Levi G, Kurihara Y, Kurihara H. Distinct effects of *Hoxa2* overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratochyl boundary maps within the styloid process. *Dev. Biol.* 402(2):162-174, 2015.

Laumonnerie C, Bechara A, Vilain N, Kurihara Y, Kurihara H, Rijli FM. Facial whisker pattern is not sufficient to instruct a whisker-related topographic map in the mouse somatosensory brainstem. *Development* pii: dev.128736, 2015.

Hidaka T, Shimada A, Nakata Y, Kodama H, Kurihara H, Tokihiro T, Ihara S. Simple model of pH-induced protein denaturation. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 92(1-1):012709, 2015.

Gordon CT, Weaver KN, Zechi-Ceide RM, Madsen EC, Tavares AL, Oufadem M, Kurihara Y, Adameyko I, Picard A, Breton S, Pierrot S, Biosse-Duplan M, Voisin N, Masson C, Bole-Feysot C, Nitschké P, Delrue MA, Lacombe D, Guion-Almeida ML, Moura PP, Garib DG, Munnich A, Ernfors P, Hufnagel RB, Hopkin RJ, Kurihara H, Saal HM, Weaver DD, Katsanis N, Lyonnet S, Golzio C, Clouthier DE, Amiel J. Mutations in the

endothelin receptor type A cause mandibulofacial dysostosis with alopecia. *Am. J. Hum. Genet.* 96(4):519-31, 2015.

Hamamoto H, Urai M, Ishii K, Yasukawa J, Paudel A, Murai M, Kaji T, Kuranaga T, Hamase K, Katsu T, Su J, Adachi T, Uchida R, Tomoda H, Yamada M, Souma M, Kurihara H, Inoue M, Sekimizu K. Lysocin E is a novel antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. *Nat. Chem. Biol.* 11(2):127-133, 2015.

Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M, Kawamura Y, Sakurabashi A, Shirane A, Morita Y, Isono W, Oishi H, Koga K, Oda K, Kawana K, Yano T, Kurihara H, Osuga Y, Fujii T. SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 155: 3079-3087, 2014.

Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. *Nat. Commun.* 5: 4552, 2014.

Kushiyama A, Sakoda H, Oue N, Okubo M, Nakatsu Y, Ono H, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kikuchi T, Fujishiro M, Nishiyama K, Aburatani H, Kushiyama S, Iizuka M, Taki N, Encinas J, Sentani K, Ogonuki N, Ogura A, Kawazu S, Yasui W, Higashi Y, Kurihara H, Katagiri H, Asano T. Resistin-like molecule β is abundantly expressed in foam cells and is involved in atherosclerosis development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33:1986-1993, 2013.

Zhang J, Nakatsu Y, Shinjo T, Guo Y, Sakoda H, Yamamotoya T, Otani Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Iwashita M, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1 (IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *J. Biol. Chem.* 288: 20692-20701, 2013.

El Azzouzi H, Leptidis S, Dirx E, Hoeks J, van Bree B, Brand K, McClellan EA, Poels E, Sluimer JC, van den Hoogenhof MM, Armand AS, Yin X, Langley S, Bourajaj M, Olieslagers S, Krishnan J, Vooijs M, Kurihara H, Stubbs A, Pinto YM, Krek W, Mayr M, da Costa Martins PA, Schrauwen P, De Windt LJ. The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. *Cell Metab.* 18: 341-54, 2013.

Tonami K, Hata S, Ojima K, Ono Y, Kurihara Y, Amano T, Sato T, Kawamura Y, Kurihara H, Sorimachi H. Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration. *PLoS Genet.* 9: e1003668, 2013.

Minoux M, Kratochwil CF, Ducret S, Amin S, Kitazawa T, Kurihara H, Bobola N, Vilain N, Rijli FM. Mouse Hoxa2 mutations provide a model for microtia and auricle duplication. *Development* 140: 4386-4397, 2013

Kim K-S, Arima Y, Kitazawa T, Nishiyama K, Asai R, Uchijima Y, Sato T, Levi G, Kitanaka S, Igarashi T, Kurihara Y, Kurihara H. Endothelin regulates neural crest deployment and fate to form great vessels through Dlx5/Dlx6-independent mechanisms. *Mech. Dev.* 130: 553-566, 2013.

Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux M, Rijli FM, Nishiyama K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery

smooth muscle involving endothelin signalling. *Nat. Commun.* 3: 1267, 2012.

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat. Med.* 18: 1531-1538, 2012.

〔学会発表〕(計48件)

Kurihara H. Cranial neural crest cells contribute to coronary artery development involving endothelin signaling. Basic Cardiovascular Sciences (BCVS) 2013 Scientific Sessions, American Heart Association, July 22-25, 2013, Las Vegas.(USA)

Kurihara H. Endothelin signaling in craniofacial and cardiac development. 13th International Conference on Endothelin, September 8-11, 2013, Tokyo.(JAPAN)

Kurihara H. The preotic neural crest: A novel origin of coronary artery smooth muscle. 7th TAKAO International Symposium, July 13-15, 2013, Tokyo.(JAPAN)

Kurihara H. Craniofacial morphogenesis by neural crest cells and epigenetic regulation. 7th Annual Meeting of Japanese Society for Epigenetics, May 30-31, 2013, Nara.(JAPAN)

Kurihara H. Multicellular networks in coronary artery formation and their pathophysiological implication. 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 27-29, 2013, Yokohama.(JAPAN)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ <http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・栗原 裕基 (KURIHARA, Hiroki)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20221947

(2) 研究分担者

・富田 幸子 (TOMITA, Sachiko)
ヤマザキ学園大学・動物看護学部・教授
研究者番号：8039821

(3) 連携研究者

・栗原 由紀子 (KURIHARA, Yukiko)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80345040

・西山 功一 (NISHIYAMA, Koichi)
熊本大学・国際先端医学研究拠点・特任
准教授
研究者番号：90272426

・内島 泰信 (UCHIJIMA, Yasunobu)
東京大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：90272426

・河村悠美子 (KAWAMURA, Yumiko)
FMI研究所・Biomedical Research・
海外特別研究員
研究者番号：70599779

・浅井 理恵子 (ASAI, Rieko)
カリフォルニア大学・C V R I・海外特
別研究員
研究者番号：90625526