

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 5月31日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770204

研究課題名（和文）脊椎動物心臓形成時におけるヒアルロン酸依存的シグナル経路の解明

研究課題名（英文）Analysis of the hyaluronan-dependent signaling in vertebrate heart formation

研究代表者

伊藤 弓弦（ITO YUZURU）

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：30500079

研究成果の概要（和文）：ヒアルロン酸経路上にあると予想され、心臓での発現が検出された新規遺伝子を6種類、心臓形成に関与しうる血管での発現が検出された新規遺伝子を6種類、肝臓での発現が検出された新規遺伝子を4種類、血球での発現が検出された新規遺伝子を12種類同定した。それらの中から、心臓形成に正の制御を行っていると思われるMA107、MA135、MA140にまずは注目し、これらの遺伝子の心臓原基への過剰発現を行ったところ、心臓形成への影響が示唆された。

研究成果の概要（英文）：I identified many novel genes expected as factor belong to hyaluronan-dependent signaling pathway. 7 genes were detected in heart. 6 genes were detected in blood vessel. 4 genes were detected in liver. 12 genes were detected in blood cells. These three tissues are known as region participates in cardiogenesis. Moreover, MA107, MA135, MA140, expected as positive inducer for cardiogenesis, were overexpressed in cardiac primordium, suggesting that these genes has expected ability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学・細胞外基質

キーワード：発生・分化、マイクロアレイ、糖鎖、再生医学、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓発生は、他の臓器の発生と比べて比較的早い時期から開始されるため、短いサイクルで検証実験を繰り返すことが可能であり、形態形成研究のモデル系として優れている。心房・心室といった形状の違いが判別されやすいこと、拍動をともなうため見つけやすいこともこの系の有利性を高めており、心

臓発生の研究が形態形成研究に共通する学術的興味（軸形成の問題、物質の濃度勾配に関する問題、時期・場所特異的な転写制御の問題）の解明を促進すると考えられる。

(2) 心筋梗塞といった再生医療の対象になりうる心臓疾患を抱える患者数は、国内だけでも90万人に達すると言われている。さら

に、先天性臓器不全のうち、心臓に関する疾患が最も多種類にわたって報告されている。これらの状況を打開する上で、心筋細胞さらには心臓そのものの再生医療技術の確立は有用であると考えられる。

2. 研究の目的

脊椎動物の心臓原基誘導には、ヒアルロン酸が必要である。しかしながら、細胞外マトリクスとして存在するヒアルロン酸の支配下にある細胞内シグナルに関しては殆ど分かっていない。本研究では、心臓原基の細胞に対して、ヒアルロン酸マトリクスが及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 初期尾芽胚期の心臓原基において、ヒアルロン酸マトリクスの存在により発現維持もしくは発現誘導される遺伝子を同定する。
① 以下の4条件に合致する遺伝子を、マイクロアレイを用いて探索する。全てのスクリーニングは心臓原基の周辺にヒアルロン酸マトリクスが存在している初期尾芽胚期(st. 23)に行う。

- (A) 「非心臓誘導条件のアニマルキャップ」と比べて「心臓誘導条件のアニマルキャップ」において発現量が上昇する遺伝子。
 - (B) 「非心臓誘導条件の腹側帯域」と比べて「心臓誘導条件の腹側帯域」において発現量が上昇する遺伝子。
 - (C) 「心臓誘導条件のアニマルキャップ」と比べて「ヒアルロン酸合成を阻害した心臓誘導条件のアニマルキャップ」において発現量が減少する遺伝子。
 - (D) 「心臓誘導条件の腹側帯域」と比べて「ヒアルロン酸合成を阻害した心臓誘導条件の腹側帯域」において発現量が減少する遺伝子。
- ② 各候補遺伝子の発生過程を通じての詳細な発現解析(WISH法)、過剰発現・翻訳阻害(mRNA、モルフォリノオリゴのマイクロインジェクション法)による機能解析を行う。

(2) 初期尾芽胚期の心臓原基において、ヒアルロン酸マトリクスの存在により活性化されるシグナル経路を同定する。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイを用いたヒアルロン酸依存的シグナル経路の候補遺伝子の探索
心臓形成におけるヒアルロン酸依存的シグナル経路を解明すべく、本研究室で作製したツメガエルのDNAマイクロアレイを用いて、3. に記載の方針で行った実験サンプルの網羅的遺伝子発現解析及び絞り込み作業を行った。用いたアレイには約28000種の遺伝子を搭載し、これはツメガエルの遺伝子をほぼ網羅していると考えられる。その結果、4つ

のカテゴリー(I-IV)にそれぞれ当てはまる候補遺伝子を同定した。

カテゴリーIでは、「uninjected VMZ と比べて *dkk1* VMZ で2倍以上発現が上昇」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1* をマイクロインジェクション後4-MU処理した VMZ で2倍以上発現が減少」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1+Xhas2-MO* VMZ で1.5倍以上発現が減少」した遺伝子が338種類同定された。これらの遺伝子は、心臓形成に対して正の制御を行い、*dkk1*、ヒアルロン酸からも正の制御をされていると想定される。実際にこの遺伝子群中には、すでに心臓形成への関与が報告されている *Tbx20*、*mef2c*、*c1dn5* を始めとする31種類の心臓形成関連遺伝子が含まれていた。それ以外にも、肝臓や腎臓、血球など心臓周囲の器官への関与が報告されている45種類の遺伝子が同定された。

カテゴリーIIでは、「uninjected VMZ と比べて *dkk1* VMZ で2倍以上発現が上昇」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1* をマイクロインジェクション後4-MU処理した VMZ で2倍以上発現が上昇」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1+Xhas2-MO* VMZ で1.5倍以上発現が上昇」した遺伝子が47種類同定された。これらの遺伝子は、心臓形成に対して正の制御を行い、*dkk1* からは正の制御を、ヒアルロン酸からは負の制御をされていると想定される。この遺伝子群中には、2種類の心臓形成への関与が報告されている遺伝子が含まれていた。それ以外にも、脳への関与が報告されている9種類の遺伝子が同定された。

カテゴリーIIIでは、「uninjected VMZ と比べて *dkk1* VMZ で2倍以上発現が減少」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1* をマイクロインジェクション後4-MU処理した VMZ で2倍以上発現が上昇」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1+Xhas2-MO* VMZ で1.5倍以上発現が上昇」した遺伝子が248種類同定された。これらの遺伝子は、心臓形成に対して負の制御を行い、*dkk1*、ヒアルロン酸からも負の制御をされていると想定される。この遺伝子群中には、心臓形成への関与が報告されている遺伝子はなかった。またその他には、血球や脳、骨格筋などへの関与が報告されている遺伝子が15種類同定された。

カテゴリーIVでは、「uninjected VMZ と比べて *dkk1* VMZ で2倍以上発現が減少」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1* をマイクロインジェクション後4-MU処理した VMZ で2倍以上発現が減少」し、「*dkk1* VMZ と比べて *dkk1+Xhas2-MO* VMZ で1.5倍以上発現が減少」した遺伝子が11種類同定された。これらの遺伝子は、心臓形成に対して負の制御を行い、*dkk1* からは負の制御を、ヒアルロン酸からは正の制御をされていると想定される。この遺伝子群中には、心臓形成及びその他の器官形

成に対して報告のある遺伝子は同定されなかった。

② ヒアルロン酸依存的シグナル経路の候補遺伝子の発現パターン解析

マイクロアレイによって、多くのヒアルロン酸依存的シグナル経路の候補遺伝子を同定した。そこで、心臓形成に対する既知遺伝子が多く同定されてきたカテゴリー I を今後の解析対象とした。カテゴリー I で同定された 338 種類の遺伝子の内、92 種類は断片的な配列情報しかない EST であるため、これらの遺伝子については解析対象外とした。さらに、残りの 246 種類の遺伝子の内、すでにツメガエルの各器官形成に対する機能が分かっている遺伝子が 163 種類あり、これらの遺伝子においても解析対象外とした。その結果、83 種類の遺伝子が残った。これらの遺伝子は「ツメガエル以外で心臓形成に関与が示されているもの」、「全生物において機能未知なもの」である。よって、これらの遺伝子を今後の解析対象とし、MA69 から MA155 とナンバリングした。

さらに、候補遺伝子の中でも心臓で発現している遺伝子および心臓形成との関与が示される血管・血球・肝臓で発現している遺伝子についてより絞込みを行うために、これらの全遺伝子に対して Whole mount *in situ* hybridization を行い、それぞれの発現領域を解析した。解析には、stage8、10、12、15、18、23、28、34、38、44 のツメガエル胚を用いた。その結果、心臓での発現が検出された遺伝子は、MA74、MA115、MA121、MA128、MA135、MA140 の 6 種類であった。また、心臓形成に関与していると思われる血管での発現が検出された遺伝子は MA74、MA93、MA103、MA107、MA108、MA128 の 6 種類であった。さらに、Xhas2 の翻訳が重要であると示唆された肝臓での発現が検出された遺伝子は MA100、MA125、MA145、MA148 の 4 種類、血球での発現が検出されたのは MA69、MA83、MA88、MA93、MA109、MA112、MA118、MA120、MA122、MA126、MA128、MA133 の 12 種類であった(図 1)。(発現領域のカウントには重複あり)

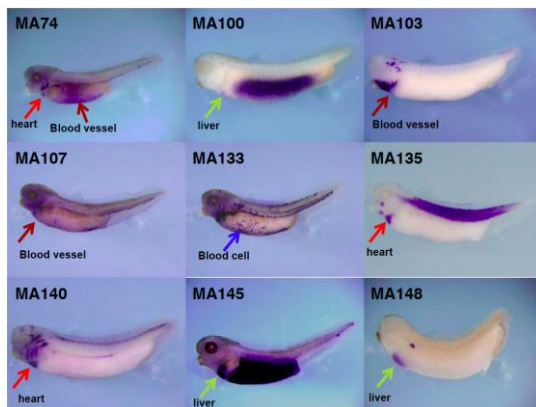


図 1 候補遺伝子の発現解析

他にも心臓形成とは直接関係ないが、ヒアルロン酸経路に関連すると思われる遺伝子も多数クローニングされた。Xhas2 由来の HA が存在する器官での発現が検出された遺伝子は、目では MA75、MA86、MA88、MA91、MA94、MA95、MA105、MA118、MA119、MA123、MA125、MA144、MA146、MA147 の 9 種類、体節では MA75、MA76、MA88、MA91、MA102、MA105、MA107、MA115、MA116、MA117、MA118、MA124、MA125、MA126、MA135、MA144、MA147、MA153、MA155 の 19 種類、鰓弓では MA91、MA105、MA107、MA116、MA117、MA118、MA125、MA140、MA144、MA147、MA153、MA155 の 11 種類であった。また、MA77、MA84、MA96、MA97、MA99、MA101、MA149、MA150 に関しては、生体内での発現量が少なく、クローニングすることができなかった。これらの結果から、マイクロアレイによって同定した遺伝子の中でも、心臓形成においてヒアルロン酸の制御化にあり、かつ心循環系で発現している新規の遺伝子が明らかとなった。よって、今後はこれらの遺伝子の機能解析を行っていく必要がある。

③ ヒアルロン酸合成阻害胚における候補遺伝子の発現解析

マイクロアレイによって得られた候補遺伝子の発現パターンを解析することで、さらに心臓及び心臓形成に関与していると思われる遺伝子の選別を行った。その中で、心循環系での発現が検出された MA107、MA135、MA140 に着目し、これらの遺伝子のヒアルロン酸合成への関与を明らかにするため、4-MU 処理胚における各遺伝子への影響を whole mount *in situ* hybridization 法によって解析した(図 2)。

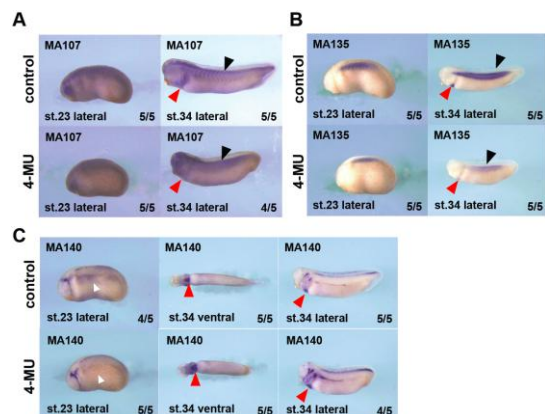


図 2 ヒアルロン酸合成阻害による MA107、MA135、MA140 発現変化

MA107 の発現を見ると、stage 23 では control 胚と比べて 4-MU 処理した胚では、目や体節での発現が弱くなっており、MA107 の発現が抑制されていることが分かった(図 2 A)。stage 34 でも同様に、MA107 の発現が抑制されていた。また、4-MU 処理を行った胚で

は、はっきりとした体節の境界が見られず、正常な体節の形成が阻害されていることが分かった。MA135 の発現を見ると、stage 23、stage 34 共に、4-MU 処理した胚では体節での発現が抑制され、stage 34 においては心臓での発現も抑制されていた (図 2B)。よって、MA135 の発現には、心臓、体節ともにヒアルロン酸の合成が必要であることが分かった。MA140 の発現を見ると、4-MU 処理した胚では、control 胚と比べて背側内胚葉での弱い抑制が見られた (図 2C)。しかし、stage 34 になると、検出された発現は control 胚よりも 4-MU 処理した胚で強くなった。

この結果から、選別した 3 つの遺伝子の内、MA135 が最もヒアルロン酸合成阻害の影響を受ける事が分かった。また、MA140 は心臓での強い発現が検出したにもかかわらず、MA140 自体の発現にはヒアルロン酸合成による影響を受けないことが分かった。さらに、MA107、MA135 の結果から、4-MU 処理胚では体節の境界が曖昧になっていた。よって、4-MU 処理胚の体長が著しく短くなっていた原因が、ヒアルロン酸合成阻害により、正常な体節形成が阻害されたためであることが分かった。

④ 候補遺伝子の過剰発現による心臓形成解析

MA107、MA135、MA140 の心臓形成における機能を解析するために、各遺伝子の過剰発現実験を行った。stage 4 の背、植物極側 (将来の心臓原基) の 2 割球にそれぞれの遺伝子をマイクロインジェクションし、各 stage でサンプリングを行った。その後、whole mount *in situ* hybridization 法により心臓マーカー遺伝子の発現を調べ、心臓形成への影響を解析した (図 3)。

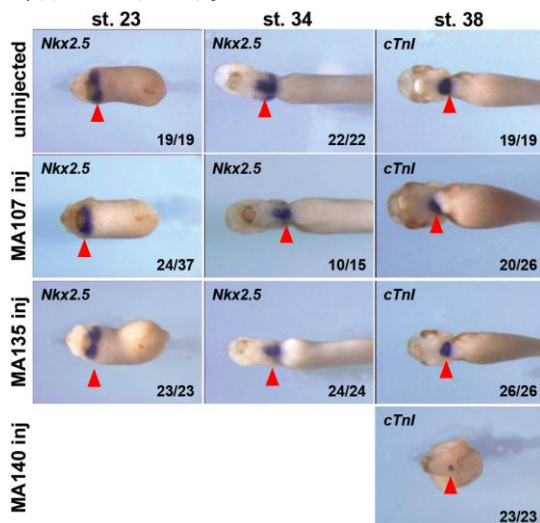


図 3 MA107、MA135、MA140 の過剰発現による心臓形成への影響

stage 23 において、MA107 をマイクロイン

ジェクションした胚のうち約 1/3 は、uninjected 胚と比べて、心臓マーカーの発現量、発現領域共に減少が見られた (図 3)。さらに約 1/3 の胚では心臓マーカー発現量の減少が見られた。stage 34 になると、MA107 をマイクロインジェクションした胚では、ほぼすべての胚で形成された心臓の縮小が見られ、中には心臓原基の融合が阻害された胚もあった。stage 38 においても、心臓の縮小が見られた。この結果から、MA107 には、心臓形成に対して負に働く機能があることが分かった。MA135 をマイクロインジェクションした胚では、stage 23、stage 34、stage 38 のいずれの時期でも、control 胚と比べて心臓形成に異常が見られなかった (図 3)。よって、発生初期に MA135 を過剰発現しても、心臓形成には影響を及ぼさないことがわかった。MA140 をマイクロインジェクションした胚では、stage 38 において心臓マーカー遺伝子の発現がほとんど検出されなかった (図 3)。しかし、この胚では、原腸陥入が正常に行われなかったことから、MA140 の過剰発現は、心臓形成に限らず胚の発生自体に影響を及ぼすことが分かった。

各遺伝子の過剰発現実験により、心臓形成に対する機能を予想することができた。今後は、DNA のインジェクションによる発生後期での過剰発現実験や、MO を用いた機能欠失実験により更なる解析を進めていく必要がある。また、今回過剰発現実験を行った MA107、MA135、MA140 以外の候補遺伝子においても、同様に機能解析を進め、既知の心臓関連遺伝子との相互作用や、同定した候補遺伝子同士の相互作用を明らかにする必要がある。

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 15 件)

① Onuma Y, Tatenno H, Tsuji S, Hirabayashi J, Ito Y, Asashima M, (2013) A lectin-based glycomic approach to identify characteristic features of *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One* 8, e56581. (査読あり)

DOI: 10.1371/journal.pone.0046630

② 浅島誠, 伊藤弓弦, 栗崎晃 (2011) 発生学から見た再生医療、再生医療 10(3), pp17-33 (査読なし)

URL: http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J27_10_3_17-33.html

③ Yamagishi, M., Ito, Y., Ariizumi, T., Komazaki, S., Danno, H., Michiue, T., Asashima, M. (2010) Claudin5 genes encoding tight junction proteins are

required for *Xenopus* heart formation. *Dev. Growth Differ.* 52, 665-675. (査読あり)
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01204.x

〔学会発表〕 (計 27 件)

- ① Yuzuru Ito, Global gene expression analysis of *Xenopus* cells cultured in the International Space Station (KIBO). 14th International *Xenopus* Conference, 2012. Sep. 9-13, Hotel Belambra (Giens Peninsula, France)
- ② 岩本 麻未、初期心臓形成に関与するヒアルロン酸経路の解析 第 11 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2012 年 1 月 31 日、産総研 (茨城)
- ③ Ito, Y., Challenge the establishment of new fundamental technology in the regenerative medicine, 2nd Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys), 2010. Oct. 4, AIST (Tokyo)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Asashima M, Michiue T, Ohnuma K, Nakajima Y, Ito Y, Springer, Chapter 3 Mechanobiology During Vertebrate Organ Development, *Mechanosensing Biology*, 2010, 総ページ 11 (pp39-49)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 弓弦 (ITO YUZURU)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号 : 30500079