

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20734

研究課題名（和文）Delta-Notchシグナル経路による形態形成原理の解明～胆管形成数理予測のin vivo実証～

研究課題名（英文）Elucidation of a morphogenic mechanism via Delta-Notch signaling pathway - an in vivo examination of a mathematical prediction on biliary formation

研究代表者

吉原 雅大 (Yoshihara, Masaharu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60963618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、Notchシグナルのマウス生体内可視化および肝内胆管形成機序の解明を目的とした。前者（Notchシグナルのマウス生体内可視化）については、査読付き英文科学雑誌に総説（1編）として、その方法を報告したほか、査読付き英文科学雑誌に原著論文（2編）において腎臓や精巣での可視化を具体的事例として報告した。後者（肝内胆管形成機序の解明）については、査読付き英文科学雑誌に原著論文（1編）において、シングルセル解析を行って報告した。具体的には、Notchシグナルが門脈周囲の胆管上皮前駆細胞に局限する機構として、エピジェネティクスレベルでの制御や造血細胞によるバリアを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝臓の中にある胆管が形成される仕組みとして、Notchシグナル経路に着目した。具体的には、マウスの中で、Notchシグナルを受容する細胞を可視化して同定する技術の確立を目指した。実際、この可視化技術の詳細、並びに、腎臓や精巣においてこの可視化技術が有効であることを論文で報告した。さらに、特定の細胞（門脈とよばれる肝臓内の静脈に隣接した未分化な細胞）だけがNotchシグナルを受容して、胆管になっていく仕組みとして、Notchシグナルを構成する遺伝子の発現が分子レベルで制御されていることや、肝臓の中の造血細胞がNotchシグナルの伝播を空間的に阻害することも別の論文で報告した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I tried to visualize Notch signaling in vivo and to elucidate the mechanism of intrahepatic biliary development. I published one English peer-reviewed review paper to summarize the methodology of Notch signaling visualization and showcased two examples using the kidney and testis in two English peer-reviewed original paper. In addition, I carried out single-cell ATAC seq analysis and reported the epigenetic regulation of Notch signaling and barrier function of hematopoietic cells in the spread of Notch signaling in the developing liver.

研究分野：発生生物学

キーワード：Notchシグナル 遺伝子組換えマウス シングルセル解析 エピジェネティクス バイオインフォーマティクス 組織学 解剖学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

門脈周囲に局限する肝内胆管上皮は Notch シグナル依存的に分化することが知られていた。他方で、この Notch シグナルは、古典的には、ショウジョウバエの神経分化に見られるような、「ごま塩状パターン形成」(シグナルを受け取る細胞を送る細胞が最終的に交互に配列するような空間パターン)を引き起こすことも知られていた。この状況に対し、Notch シグナルの数理モデル解析により、このシグナル経路の構成分子の遺伝子発現の細胞ごとの差異(すなわち Notch シグナル経路の使われ方ないしは外因)が、この単一のシグナル経路を介したさまざまなパターン形成に重要である可能性が示されていた。他方で、その分子生物学的基盤は明らかでなかった。

2. 研究の目的

Notch シグナル経路を介した肝内胆管形成の分子機構の解明に向けて、本研究では、(1) マウスにおいて Notch シグナルを受容する細胞を可視化して同定する技術の確立、並びに、(2) 発生中の肝臓において Notch シグナルが門脈周囲の未分化細胞に局限する分子生物学的機構の解明、を目的に設定した。

3. 研究の方法

(1) マウスにおいて Notch シグナルを受容する細胞を可視化して同定する技術の確立ため、新規に遺伝子組換えマウス (Cr1:CD1(ICR)-Tg(UAS-cre/T2A/miRFP670)216Staka (RBRC11716)) を作製した。このマウスは、すでに作製されている Notch1-Gal4VP16 マウスと組み合わせることで、Notch1 がその内因性リガンド分子と結合した場合にのみ遺伝子組換え酵素 Cre と近赤外光蛍光タンパク miRFP670 を発現する。実際、この両者を組み合わせることで、腎臓や精巣における Notch1 シグナルを評価することができた。

(2) 発生中の肝臓において Notch シグナルが門脈周囲の未分化細胞に局限する分子生物学的機構の解明のため、single-cell ATAC seq 解析を行なった。その結果、門脈細胞では Notch 受容体の代表的なリガンド分子である JAG1 のクロマチン領域が開いていたのに対して、肝細胞・胆管上皮細胞の共通前駆細胞では NOTCH2 のクロマチン領域が開いていた (JAG1 のクロマチン領域は開いていなかった)。さらに発生中の肝臓に豊富に含まれる造血細胞での JAG1・NOTCH2 それぞれのクロマチン領域の解析を追加することで、これらが開いていないために造血細胞が NOTCH シグナル伝播を空間的に阻害していること、そしてそれが門脈周囲の未分化細胞に NOTCH シグナルが局限する一翼を担っていることを明らかにした。

4. 研究成果

本研究課題では、Notch シグナルのマウス生体内可視化および肝内胆管形成機序の解明を目的とした。前者 (Notch シグナルのマウス生体内可視化) については、査読付き英文科学雑誌に総説 (ref1) として、その方法を報告したほか、査読付き英文科学雑誌に原著論文 (ref2,3) において腎臓や精巣での可視化を具体的事例として報告した。後者 (肝内胆管形成機序の解明) については、査読付き英文科学雑誌に原著論文 (ref4) において、シングルセル解析を行って報告した。具体的には、Notch シグナルが門脈周囲の胆管上皮前駆細胞に局限する機構として、エピジェネティクスレベルでの制御や造血細胞によるバリアを見出した。

References

1. Yoshihara M, Takahashi S. Recent advances in *in situ* Notch signaling measurement. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jul 28;11:1244105. doi: 10.3389/fcell.2023.1244105. PMID: 37576594; PMCID: PMC10416437.
2. Sugiura R, Nakayama T, Nishino T, Sambe N, Radtke F, Yoshihara M, Takahashi S. Notch1 signaling is limited in healthy mature kidneys in vivo. *BMC Res Notes.* 2023 Apr 17;16(1):54. doi: 10.1186/s13104-023-06326-x. PMID: 37069662; PMCID: PMC10111784.
3. Sambe N, Yoshihara M, Nishino T, Sugiura R, Nakayama T, Louis C, Takahashi S. Analysis of Notch1 signaling in mammalian sperm development. *BMC Res Notes.* 2023 Jun 19;16(1):108. doi: 10.1186/s13104-023-06378-z. PMID: 37337280; PMCID: PMC10280896.
4. Yoshihara M, Nakayama T, Takahashi S. Chromatin accessibility analysis suggested vascular induction of the biliary epithelium via the Notch signaling pathway in the human liver. *BMC Res Notes.* 2023 Dec 21;16(1):379. doi: 10.1186/s13104-023-

06674-8. PMID: 38129911; PMCID: PMC10734141.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sugiura Ryosuke, Nakayama Takahiro, Nishino Teppei, Sambe Naoto, Radtke Freddy, Yoshihara Masaharu, Takahashi Satoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Notch1 signaling is limited in healthy mature kidneys in vivo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 54-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-023-06326-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshihara Masaharu, Nakayama Takahiro, Takahashi Satoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Chromatin accessibility analysis suggested vascular induction of the biliary epithelium via the Notch signaling pathway in the human liver	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 379-379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-023-06674-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sambe Naoto, Yoshihara Masaharu, Nishino Teppei, Sugiura Ryosuke, Nakayama Takahiro, Louis Chandra, Takahashi Satoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Analysis of Notch1 signaling in mammalian sperm development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 108-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-023-06378-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara Masaharu, Takahashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent advances in in situ Notch signaling measurement	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1244105-1244105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1244105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学卓越大学院ヒューマニクス学位プログラムホームページ
<https://www.phd-humanics.tsukuba.ac.jp/other/230419.php>
筑波大学プレスリリース
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20231225140000.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------