

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08140

研究課題名(和文) 心臓発生過程でおこる心外膜前駆細胞分化でのレチノイン酸の役割

研究課題名(英文) Roles of retinoic acid in the proepicardium organ formation during chick heart development

研究代表者

山岸 敏之 (Yamagishi, Toshiyuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60255122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心外膜前駆細胞は、胚心臓の静脈洞に形成され、発生の進行にともない胚心臓をおおひ、成人心臓の心外膜や冠状血管になる。本研究では、心外膜前駆細胞の分化過程でのレチノイン酸の作用について調べた。心外膜原基形成過程において、マーカー分子のWT1とTBX18タンパク質は心外膜原基の隆起が形成される以前に局在が観察された。培養系を用いて調べたところ、ニワトリ胚ステージ14、15の臓側中胚葉の外植体は心外膜前駆細胞に分化したが、ステージ11-13の臓側中胚葉を培養したときには分化の低下が見られた。この培養系にレチノイン酸を加えたところ外植体のWT1とTBX18の発現は増加した。

研究成果の概要(英文)：The proepicardial organ (PEO) arises in the sinus venosus region, and then the cells of the PEO spread over the myocardium. These cells differentiate into the epicardium, the fibroblast, the smooth muscle and the endothelial cells of the coronary vessels. The markers of the PEO, such as WT1 and TBX18, were detected in the PEO presumptive region at stage 14. In vitro PEO assay using stage 11-13 showed the reduce of the differentiation into the PEO. When retinoic acid was administrated in the culture medium of the assay, the expression of WT1 and TBX18 protein was increased.

研究分野：発生学

キーワード：心臓 心外膜 胚

1. 研究開始当初の背景

心外膜前駆細胞(proepicardium)は、胚心臓の静脈洞に形成され、発生の進行にともない胚心臓をおおい、成人心臓の心外膜や冠状血管になる。近年、心外膜前駆細胞は冠状血管の平滑筋細胞・内皮細胞、心臓線維芽細胞、血球だけでなく、心筋細胞へ分化する可能性も示唆されている。心外膜前駆細胞が多分化能をもつことから、心外膜前駆細胞発生の仕組みを明らかにすることは「心臓の形づくり」の解明につながるばかりではなく、将来的な心外膜前駆細胞を利用した疾病治療の開発に寄与する。しかしながら、心外膜前駆細胞がいつ、どこで、どのようにして形成されるのかは明らかでない。本研究の目標は心外膜前駆細胞の決定の仕組みを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

Mikawaらは、心外膜前駆細胞の形成に肝臓原基が関与していることをニワトリ全胚培養法で明らかにした。一方、Brandらはニワトリ胚の培養系を用いて BMP (bone morphogenetic protein)と FGF (fibroblast growth factor)が心外膜原基の形成に関与する可能性を示した。しかし、これらの報告よりも早い発生段階で心外膜前駆細胞の分化が決定される可能性を見出した。本研究の目的は、初期心外膜前駆細胞の培養法の確立と心外膜前駆細胞の分化過程でのレチノイン酸の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 正常胚での心外膜(前駆)細胞マーカーの局在

免疫組織化学法により心外膜原基の形

成過程における WT1 と TBX18 の局在を調べた。

(2) 心外膜前駆細胞の invitro 培養法の確立

ニワトリ胚予定心外膜領域を微小外科手術により切り出し、培養する生物検定法を試み、その条件検討を行った。また、切り出した組織片から内胚葉を分離する条件も検討した。心外膜前駆細胞への分化の有無は分化マーカーである WT1、TBX18、Cytokeratin などに対する抗体を用いて免疫組織化学法により判定した。

(3) 分化誘導因子の検討

(2) で検討した培養法を用いて、培養液中にレチノイン酸を加え、心外膜前駆細胞への分化を判定した。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚心外膜原基形成過程での WT1, TBX18 タンパク質の局在

心外膜原基形成過程でのマーカー分子の

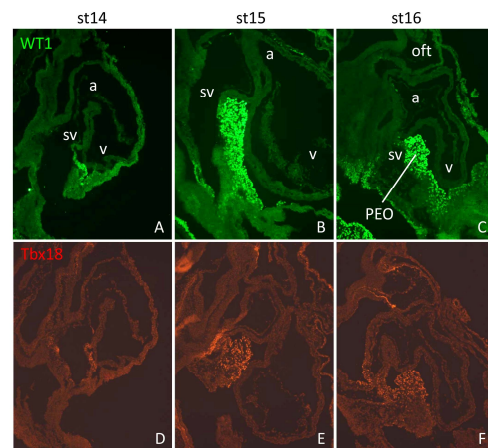


図1 ニワトリ胚心臓発生過程での WT1、TBX18 タンパク質の局在

(A, D) は st14、(B, E) は st15、(C, F) st16 の心臓領域の矢状断面を示す。

a, atrium; oft, outflow tract; PEO, proepicardial organ; sv, sinus venosus; v, ventricle

発現時期を明らかにするために WT1、TBX18 タンパク質の局在を調べた。その結果、ステージ (stage: st) 12 までは WT1、TBX18 タンパク質の局在は観察できなかった。ステージ 14 になると静脈洞領域の臓側中胚葉にシグナルが観察できた (図 1A, D)。この陽性シグナルはステージ 15 になると強くなった (図 1B, E)。ニワトリ胚の心外膜原基は、ステージ 16 頃より静脈洞領域の臓側中胚葉が隆起し形成される。この時期になると WT1、TBX18 のシグナルは心外膜原基の隆起に強く局在した (図 1C, D)。これらの結果から、心外膜原基を形成する細胞 (心外膜前駆細胞) は、心外膜原基の隆起が形成される以前に分化していることが明らかになった。

(2) 生物検定による心外膜前駆細胞分化時期の決定

(1) の結果に基づき微小外科手術によりニワトリ胚予定心外膜原基形成領域 (静脈洞 [sinus venosus]) を切り出し、培養した。心外膜が形成された場合には外植体の周囲に細胞の広がりが観察された (図 2A)。培養

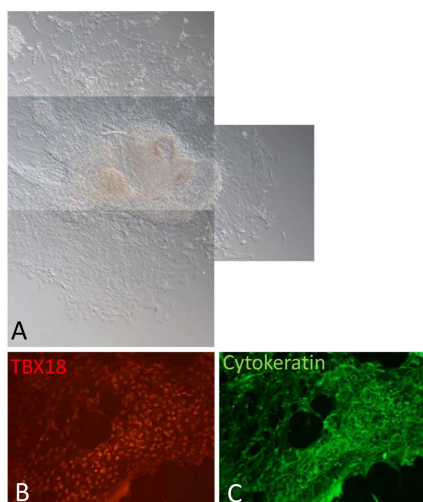


図2 st12 胚の予定心外膜形成領域の培養実験

(A) 微分干渉による像。細胞の広がりが見られた。(B) TBX18 抗体による免疫組織化学。(C) Cytokeratin による免疫組織化学。B, C とも陽性のシグナルが観察できた。

後、外植体を TBX18、cytokeratin 抗体などの心外膜前駆細胞のマーカー分子に対する抗体で染色し、分化の有無を検討した (図 2B, C)。

各発生段階について調べたところ、臓側中胚葉と内胚葉を同時に切り出し、培養した場合には外植体は 100% 心外膜前駆細胞に分化した (表 1)。しかし、臓側中胚葉だけを培養

表 1 外植体の心外膜前駆細胞への分化

	stage				
	11	12	13	14	15
SV mesoderm + SV endoderm	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (6/6)	100% (3/3)	100% (5/5)
SV mesoderm	25% (1/4)	25% (1/4)	66% (6/9)	100% (3/3)	100% (5/5)

() : 心外膜前駆細胞の分化マーカーを発現した外植体数 / 外植体数
SV: sinus venosus

した場合、心外膜前駆細胞に分化した外植体は、ステージ 14、15 では 100% であったのに対し、ステージ 13 では 66%、ステージ 11、12 では 25% であった。この結果は、ステージ 13 より早い時期においては、臓側中胚葉の心外膜前駆細胞への分化には内胚葉が必要であることを示している。さらにステージ

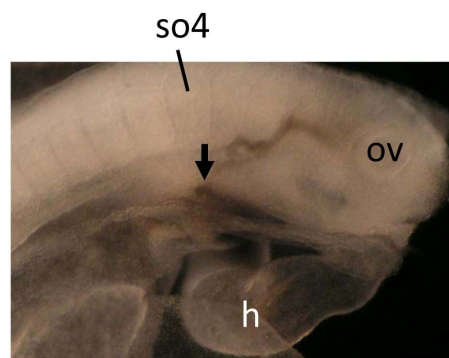


図3 静脈へのインク注入による総主静脈と静脈洞結合位置の同定

胚を右から見た図。頭部は切断してある。矢印は総主静脈と静脈洞結合位置を示す。
h, heart; ov, otic vesicle; so, somite

10 より早期の胚では、予定心外膜形成領域が不明瞭であることから、切り出す領域を明確にすることを試みた。心外膜原基は総主静脈と静脈洞の結合部位に形成されることから胚静脈にインクを注入し、それらの結合位置と体節の位置関係を調べた(図3)。その結果をもとに、第4体節を指標に組織片を切り出し、生物検定を行ったが、検定の不安定さは十分に解消されなかった。今後も検定法の改良が必要であると考えている。

(3) レチノイン酸の作用

ステージ 11の胚の外植体にレチノイン酸を作用させたところ、コントロールに比べ外植体の細胞は広がった。これらの細胞には心外膜前駆細胞のマーカーである WT1 と TBX18 の局在が見られた(図4)。この結果は、レチノイン酸が心外膜原基の形成過程に関与している可能性を示している。

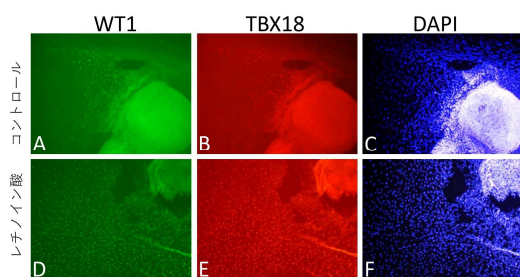


図4 レチノイン酸添加実験

(A, B, C) コントロールとして DMSO を加えた培養液のみで培養。(D, E, F) 培地にレチノイン酸を加えて培養した外植体。

(4) 今後の展望

生物検定が不安定であることから、さらなる培養条件の検討が必要と考えている。また微小外科手術による切り出し位置を最適化するためにも発生段階の早い胚の予定心外膜原基の領域を詳細に調べる必要がある。

今回の結果からレチノイン酸が心外膜前駆細胞の分化にかかわっている可能性が得られたが、既知の因子である BMP2 や FGF4 と

の関係は不明のままである。今後これらの因子との関係を明らかにしておくことで心外膜前駆細胞の分化メカニズムが明らかになると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Kamimura T, Yamagishi T, Nakajima Y. Avian coronary endothelium is a mosaic of sinus venosus- and ventricle-derived endothelial cells in a region-specific manner. Dev Growth Differ. 査読有. 2018. 60:97-111. doi: 10.1111/dgd.12422

Kamimura T, Yamagishi T, Nakajima Y. Heterogeneous origin of coronary endothelial cells in avian embryonic heart. Mech of Dev. 査読無. 2017. 145: S148-S149. doi.org/10.1016/j.mod.2017.04.418

Narematsu M, Kamimura T, Yamagishi T, Fukui M, Nakajima Y. Impaired development of left anterior heart field by ectopic retinoic acid causes transposition of the great arteries. J Am Heart Assoc. 査読有. 2015. 30: pii: e001889. doi: 10.1161/JAHA.115.001889.

〔学会発表〕(計10件)

山岸敏之 ニワトリ胚心内膜床形成で起こる内皮 - 間葉形質転換での Msx1 の役割. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018年

Kamimura T, Yamagishi T, Nakajima Y. Heterogeneous origin of coronary endothelial cells in avian embryonic heart. 18th International Congress of

Developmental Biology 2017

山岸敏之 心臓弁や心臓中隔原基である心内膜床の形成機構 . 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年

山岸敏之 心外膜原基の細胞移動におけるカドヘリン-11 の役割 . 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年

上村竜也、山岸敏之、中島裕司 鳥類キメラ、蛍光色素標識、EGFP-ToI2 システムを用いた冠状血管内皮細胞の起源の検討 . 第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2016 年

Narematsu M, Kamimura T, Yamagishi T, Fukui M, Nakajima Y. Impaired development of left anterior heart field by ectopic retinoic acid causes transposition of the great arteries. 大阪市医学会 2016 年

Narematsu M, Kamimura T, Yamagishi T, Fukui M, Nakajima Y. Impaired development of left anterior heart field by retinoic acid causes transposition of the great arteries in chick embryonic heart. Society for Developmental Biology 75th Annual Meeting 2016

山岸敏之 ニワトリ胚心外膜発生過程におけるカドヘリン-11 の役割 56 回日本先天異常学会学術集会 2016 年

馴松麻悠、上村竜也、山岸敏之、中島裕司 左前方咽頭弓に存在する心臓領域の発生異常によって完全大血管転位(TGA)が起こる 第 91 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2015 年

馴松麻悠、上村竜也、山岸敏之、中島裕

司 左前方咽頭弓の二次心臓領域の発生異常によって完全大血管転位が起こる 55 回日本先天異常学会学術集会 2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山岸 敏之 (YAMAGISHI, Toshiyuki)
大阪市立大学大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 60255122