

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790151
 研究課題名（和文）カルシトニンホルモンを分泌するC細胞の発生・分化に必要な遺伝子は何か？
 研究課題名（英文）Identification of genes necessary for the generation and differentiation of C cell that secretes the calcitonin hormone.
 研究代表者
 三浦 正明（MIURA MASAOKI）
 北里大学・医学部・講師
 研究者番号：60276053

研究成果の概要：鰓後体C細胞の発生・分化に必要な遺伝子を調べるために、孵卵12日令と孵化後1日令のニワトリ鰓後体を用いて、DNAマイクロアレイを行った。その結果、孵卵12日令においてbHLH因子CASH1やアクチビン遺伝子の発現がみられた。鰓後体C細胞の発生・分化においてCASH1やアクチビン遺伝子に関係していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：鰓後体，C細胞，マイクロアレイ，アクチビン

1. 研究開始当初の背景

C細胞はカルシトニンという、血液中のカルシウム濃度を下げる作用を持つホルモンを産生している内分泌細胞である。ニワトリ - ウズラのキメラ実験により神経堤細胞が鰓後体C細胞に侵入することが示され、C細胞の発生原基は神経堤細胞であるといわれていた。しかし、当研究室の新しい知見として、実は哺乳類以外の脊椎動物では神経堤細胞由来であるが、哺乳類では神経堤細胞由来ではないことを発見した。哺乳動物は

進化の過程で発生原基を変えたと考えられる。

2. 研究の目的

我々は、ニワトリの鰓後体C細胞を培養し、長期間神経細胞様の性質を保持していることを明らかにした。しかし、生体内において神経細胞様の特徴は、孵卵14日を境として徐々に失われる。つまり、孵卵14日後に何らかの誘導シグナルを受け、前駆細胞

から内分泌細胞であるC細胞が分化すると考えられる。本研究の目的は、これらの知見を元にC細胞の発生・分化に必要な遺伝子は何なのかを分子レベルで明らかにすることにあった。

3. 研究の方法

(1) 未分化なC細胞であるC細胞前駆細胞と、すでに成熟したC細胞より RNA を抽出しニワトリマイクロアレイを行い、C細胞の発生・分化にどのような遺伝子が働いているかを網羅的に探る。

(2) リアルタイム PCR により発現変動遺伝子の確認を行う。

(3) 発現変動遺伝子のノックダウンを行い培養C細胞の形態変化を確認する。

(4) 発現変動遺伝子の強制発現を行い培養C細胞の形態変化を確認する。

4. 研究成果

(1) 孵卵 12 日令と孵化 1 日令から得た鰓後体 mRNA を使用してマイクロアレイを行った。発現解析用アレイには Affymetrix 社製の GeneChip® Chicken Genome Array を用いた。解析はバイオマトリックス研究所に依頼した。得られたデータの解析には Signet Viewer を使用した。孵化 1 日令(1D)の鰓後体 mRNA をコントロールサンプルとし、孵卵 12 日令(E12)の鰓後体 mRNA と比較した。これより、細胞分化に関係した遺伝子の中から以下の遺伝子をそれぞれ選択した。

- ① 2 倍以上発現量が増加している遺伝子群 (孵卵 1 2 日で多く発現)
- ② 0.5 倍以下に減少している遺伝子群 (孵化 1 日で多く発現)

その結果、Signet Viewer に登録されている発生に関わる遺伝子では以下数の変動があった。

- ① 37 遺伝子 (孵卵 1 2 日で多く発現)
 - ② 33 遺伝子 (孵化 1 日で多く発現)
- 分化に関わる遺伝子は以下の数の変動があった。

- ① 41 遺伝子 (孵卵 1 2 日で多く発現)
- ② 40 遺伝子 (孵化 1 日で多く発現)

これらの遺伝子の中から発現変動が見られ、特に発生・分化に重要であると言われている遺伝子を選び出した。

- ① achaete-scute homologue mRNA (CASH1)
inhibin beta A (INHBA)
- ② inhibin beta B (INHBB)
paired box gene 9 (PAX9)

(2) DNA マイクロアレイの結果より選択した遺伝子のリアルタイム PCR を行った。

①

	E12	1D
CASH1	100	1
INHBA	1200	1

②

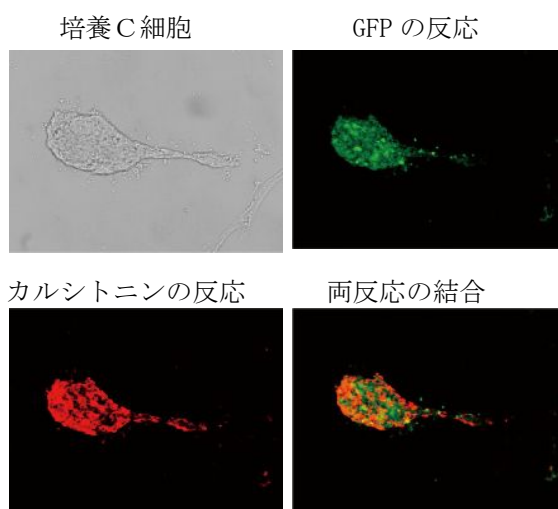
	E12	1D
INHBB	1	145
PAX9	1	34

*それぞれの数値は相対値にしてある。

その結果、孵卵 1 2 日令において CASH1 , INHBA 遺伝子は孵化 1 日令と比べるとそれぞれ 100 倍以上遺伝子の発現があることが分かった。一方、INHBB, PAX9 遺伝子は孵化 1 日令において発現量が増えていることが分かった。

(3) 孵卵 12 日令に鰓後体C細胞を使用して、培養C細胞を作成した。その培養C細胞に対して、CASH1 , INHBA 遺伝子のノックダウンを行った。今回は RNA 干渉法を用いて遺伝子をノックダウンすることを試み

た. shRNA 発現用レンチウイルスベクターを用意し、各遺伝子に対して3種類の異なるshRNA 発現レンチウイルスベクターを作成した. これらのレンチウイルスベクターのウイルス粒子を作成し、培養C細胞に感染させた. レンチウイルスベクターには GFP レポーター遺伝子が組み込まれており、GFP の蛍光を観察することで、感染を確認した. また、カルシトニン抗体による蛍光免疫染色を行い、GFP の反応とカルシトニンの反応を同時に観察した.



しかし、培養C細胞の導入は確認されたが培養C細胞の形態変化は特に観察されなかった.

(4) 遺伝子ノックダウンにおいて形態変化が観察できなかったため、現在強制発現の実験を行い培養C細胞の形態変化を確認している.

鰓後体C細胞の発生・分化は、神経堤細胞が鰓後体源基に侵入することで行われる. しかし、当研究室は、マウスなどの哺乳類では神経堤細胞は鰓後体源基には侵入しないことを明らかにした. マウスなどの哺乳動物は進化の過程で発生原基を変えたと考えられる. 本研究で、ニワトリ鰓後体は、孵

卵 12 日に bHLH ファミリーに属する CASH1 や アクチビンの遺伝子を発現していることを明らかにした. CASH1 は神経細胞の方向付けと分化、あるいは嗅覚神経細胞と自立神経細胞の発生において重要な役割を持っている. 内分泌細胞であるC細胞においてもこの遺伝子が発現していることは、C細胞の発生・分化において重要な役割を果たしていることが示唆される. 孵卵 12 日以降のC細胞は、神経細胞において発現するタンパクやペプチドを発現する. これは CASH1 遺伝子が発現していることで神経細胞様の性質を獲得していると考えられる. また、孵卵 12 日令の培養C細胞は培養すると神経細胞と同様な神経突起を持ち、さらに神経細胞様の形態・性質を獲得する. これは培養することで内分泌細胞の方向付けを行う別の遺伝子の働きが弱まっているからであると考えられる. アクチビンは細胞の役割分化の促進に関わると言うことが知られている. 本研究において、鰓後体C細胞では異なる時期に異なるアクチビン遺伝子が発現していることが分かった. 鰓後体C細胞の発生・分化においてアクチビンが大きく関わっていることが示唆された. 培養C細胞において神経細胞様の形態・性質を強く表すと言うことはこのアクチビン遺伝子の発現変化が起こっていると思われる.

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 三浦正明, 亀田英子, 日本解剖学会, Mash1 ノックアウトマウスを用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析, 2009/03/30, 岡山理科大

② 三浦正明, 亀田英子, レンチウイルスを用いたニワトリ鰓後体細胞分化に関与する遺伝子の細胞内遺伝子導入の試み, ニワトリ鰓後体細胞分化に関与する遺伝子の DNA マイクロアレイによる解析
2008/03/29, 大分大学

③ 三浦正明, 亀田英子, ニワトリ鰓後体細胞分化に関与する遺伝子の DNA マイクロアレイによる解析, 日本解剖学会,
2007/03/28, 大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 正明 (MIURA MASAOKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号 : 60276053