

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H01022

研究課題名(和文) 情報・形態イメージングによる左右非対称性形成機構の解明

研究課題名(英文) Clarifying left-right asymmetry by imaging of cell signaling and tissue development

研究代表者

望月 直樹 (Mochizuki, Naoki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究所長

研究者番号：30311426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：臓器配置の決定機構の頭尾軸・背腹軸・左右軸の3軸の中で左右非対称性の研究を行った。一過性に出現する結節(マウスのノード、ゼブラフィッシュのクッパー胞)の形成依存性あるいは被依存性に将来の非対称性を検討した。クッパー胞の繊毛の回転とカルシウムの左右差、クッパー胞形成前の左右決定可能性をシグナル活性化可視化レポーター個体(カルシウムイメージング、転写活性化部位同定、繊毛運動可視化個体、細胞の系譜解析個体)を用いて調べた。クッパー胞内でのカルシウムシグナルの左右差はなかったが、クッパー胞形成後にSpawの発現がクッパー胞に近い部位から吻側と左側に広がることからクッパー胞依存性がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の臓器・組織の空間的配置を決定する体軸決定は、ひと疾患の発症要因となるだけでなく生物の根源的な形態形成として重要な研究課題である。このなかで左右軸を決定する器官としてのマウスのノード、ゼブラフィッシュのクッパー胞の重要性とその内部に存在する繊毛による胞内の流れの重要性が報告されてきた。本研究ではクッパー胞の形成前後の内胚葉細胞の左右差の検討、またクッパー胞からのシグナルが左側のみに発現するSpaw遺伝子の発現をもたらしかについて検討した。その結果、遺伝子の発現だけでなくSpaw分子が右側に広がらない機構の重要性を調べるのが不可欠であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our group focused on the mechanism underlying left-right asymmetry during zebrafish development. Kupffer's vesicle (KV) corresponding to mouse node is an left-right organizer by evoking Ca²⁺ oscillation of endodermal cells that constitute KV. Although we observed Ca²⁺ oscillation of dorsal forerunner cells (DFCs) that become KV-constituting cells, there was no asymmetric oscillation in the left or right side of DFCs. There was no cavity of DFCs group, while KV have a cavity and motile cilia in the cavity. Thus, cilia-dependent and cilia-independent Ca²⁺ oscillation were present in the endodermal cells. However, we could not clarify the contribution of Ca²⁺ oscillation in the endodermal cells for left-right asymmetry. We further observed the spaw expression started from the region close to KV and gradually extended toward left side, indicating the some signal that was determined by KV. We finally tried to visualize how spaw molecule secreted in the left side but not in the right side.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称性 クッパー胞 繊毛 カルシウム カルシウム 発生 ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 「生体の左右非対称性の原理の解明」のための Kupffer's vesicle (KV)の役割の解析
内部の繊毛、側板中胚葉 (Lateral plate mesoderm (LPM))の Nodal 分子の左右非対称性発現が、左右非対称性臓器(心臓、肝臓、膵臓、腸管等)形成に不可欠である。KV 形成過程でも内腔と繊毛による流れが、左右非対称性に必須である。また、KV を形成するための内胚葉由来 Dorsal forerunner cells (DFCs)が集団遊走して体節形成の移動先端として存在することも解剖学的に明らかである。この DFCs がどのような情報伝達系の制御を受け、他の細胞に作用しているのか？は明らかではない。KV 内の繊毛形成が不可欠であることは、繊毛の構成蛋白質(tubulin)と輸送分子 (dynein, kinesin) の欠損による様々な左右非対称性疾患の発生から証明されている。また KV 内の繊毛の左回転も突き止められているが、どの時期からその繊毛が DFC 内で形成され、また KV 内で左右非対称なシグナルが発生しているのか？また、繊毛回転依存性のシグナルがあるのならば、KV 内胚葉細胞が左右非対称情報を伝える細胞群となっているのか？など、未だに未解明な因子が多い。また、哺乳類でもノードに繊毛のない動物の左右差決定機構も明らかになっていない。

(2) 「生体の左右非対称性の原理の解明」のための情報伝達系

左右差調節機構として、Nodal シグナルの重要性は明らかになっているが、遺伝子発現の解析が行われているだけである。Nodal シグナル (Nodal-related 1 (Cyclops), 2 (Squint), 3(Southpaw, Spaw)) の中でも Spaw が左右非対称性発現に関わることが示されている。Spaw により発現制御を受ける転写因子 Pitx2 の LPM (lateral plate mesoderm) での左右非対称性発現に関しても、KV から側板中胚葉まで距離を考えると、沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm (PAM)) 細胞間のシグナルあるいは、未同定分子の濃度勾配依存性の発現制御機構が存在するはずであるとの仮説が成立する。Spaw が分泌因子であるにもかかわらず、正中線を越えて対側の右側の中胚葉あるいはほかの胚葉細胞に影響を及ぼさない理由も明確になっていない。

2. 研究の目的

(1) 左右非対称性を誘導するシグナルを受容・発信する細胞を形態学的観察ならびに、転写活性化シグナル可視化技術により明らかにして、心臓をモデルにして左右非対称配置のメカニズムを解明する。

(2) 左右決定器官としての KV 形成と左右差発現の因果関係を明らかにする。DFCs 形成期、KV/繊毛形成、PAM/LPM 左右非対称形成段階、非対称臓器形成期のすべての時期での細胞集団の形態観察とシグナル伝達の相関を明らかにすることで、左右非対称を生む機構を明らかにすることができると思う。

(3) 左右軸決定だけではなく、前後軸・背腹軸の決定因子の左右差決定への影響を突き止める。他の軸決定機構で機能する Wnt, BMP, Notch シグナルも左右差決定に関わることを想定している。KV で発現する FoxJ1 が β Catenin (β Ctn)の転写依存性、Notch 依存性であることも報告されているからである。これらのシグナルが、DFC の移動、KV 形成、LPM のいずれかで機能するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 初期発生段階でのシグナル調節の解明

発生の各段階(DFCs 形成期から非対称臓器形成期まで)のすべての時期において、Wnt, BMP, Notch, Yap/Taz 依存性の転写活性化がどこで起きるのか？DFCs, KV, PAM, LPM, 心筋前駆細胞 (cardiac precursor cells; CPCs)で活性化するのか？を突き止めるために各シグナル可視化個体を作製する。これらの可視化個体を観察しレポーター蛍光を検出することでこれらのシグナルの左右差決定機構での関与を明らかにする。

Signal	Tissue specific-reporter system Gal4/UAS	②General reporter (Tandem reporter)
Wnt	Tg(promoter X:TCF8C/Gal4DBD);(UAS:EGFP)	Tg(Top flash-EGFP)
Notch	Tg(promoter X:RBPj/Gal4DBD);(UAS:mVenus)	Tg(Tp1:VenusPest)
BMP	Tg(promoter X:Gal4DBD-hSmad4);(UAS:mCherry)	Tg-BRE
Yap/Taz	Tg(promoter X:Gal4DBD-Tead8N);(UAS:mTurquoise)	Tg-IIC

(2) 繊毛可視化と Ca^{2+} シグナルの内胚葉での可視化

DFCs 遊走から KV 形成期にかけての繊毛形成と Ca^{2+} シグナルの有無を検証するとともに、LPM の左右差形成時期を調べることで、DFCs の移動時に既に左右差を生じるのか、または KV 形成が左右非対称性の起点なのかを明らかにする。Arl13b-EGFP を全ての細胞で可視化する Tg ラインの作製、Tg(sox17:Foxj1-DBD-mCherry) による内胚葉細胞での発現と左右差

の確認、Tg(sox17:Gal4FF);(UAS:GCaMP7)により、Ca²⁺ oscillation をイメージングして調べる。

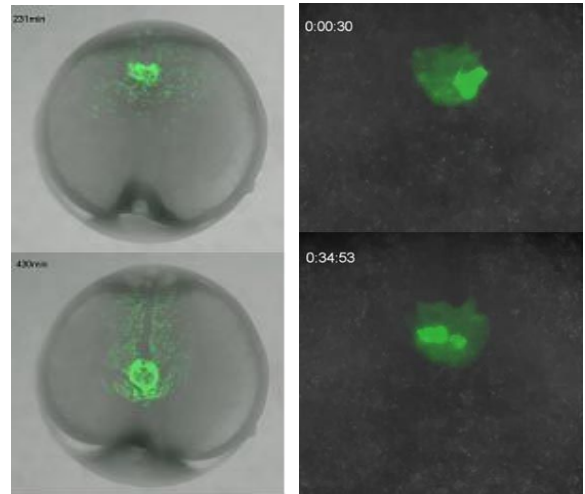
各年度ごとに、動物実験委員会での承認を得るとともに、遺伝子組換え実験についても機関内の承認を得て届けて実験を実施した（毎年承認番号を取得後に実験を開始した）。

4. 研究成果

(1) KV 内の Ca²⁺の可視化

Tg(sox17:EGFP)による KV の形態観察と DFCs の時間軸による追跡を実施した。また、

Tg(sox17:gal4FF)Tg(UAS:GCaMP7)の交配により、KV 内の Ca²⁺の活性化も可能であった。Ca²⁺ の活性化を時間経過とともに観察すると DFCs が頭側に位置している初期のほうが Ca²⁺ oscillation が頻回にみられ、尾側に DFCs が移動するとともに Ca²⁺ oscillation が減弱することが判った。KV 形成後も Ca²⁺ の左右差を検討したが、これまでの報告と異なり左右差は明らかではなかった（繊毛可視化



左 Tg(sox17:EGFP) による DFCs のイメージング
右 Tg(sox17:gal4FF)Tg(UAS:GCaMP7)による Ca²⁺ イメージング

(2) 中胚葉細胞の観察

KV の形成と Ca²⁺の可視化とともに、同時に中胚葉形成を可視化できる TgBAC (draculin:mCherry) を作製して中胚葉臓器の左右差を確認することを試みた。Draculin が両側中胚葉で陽性になり、その後片側臓器で陽性になることから、Draculin 陽性細胞の移動を調節する分子が左右を決定する因子となっていることを突き止めた。

(3) Wnt Smad Notchシグナルの可視化

KV, PAM, LPM, 心筋前駆細胞 (cardiac precursor cells; CPCs)で活性化するのか？を検討した。Tg(ベータアクチンプロモーター:TCF ベータカテニン結合部位/Gal4DBD);(UAS:EGFP),Tg(ベータアクチンプロモーター:Gal4DBDhSmad4;(UAS:mCherry), Tg(promoter X:Gal4DBD-Tead N末端);(UAS:mTurquoise)を作製してKV, PAM, LPMでそれぞれβCtn依存性の転写が活性化に左右差があるかどうかを調べた。

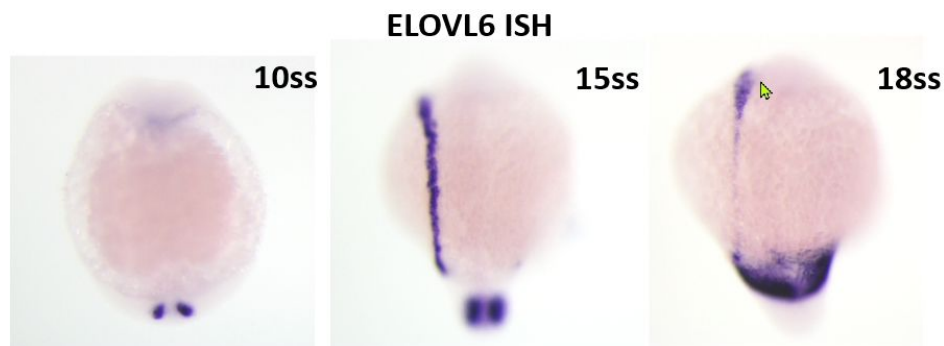
KV形成前からこれらのシグナルの活性化の左右差があるか？また形態変化があるかを検討したが、CPCが特に発生早期ではシグナルに左右差はみられず、smad, Notch, Wntが超早期から活性化して左右差を決定しているような所見は得られなかった。KV形成にともないDand5 (Nodal抑制分子) がKVで発現することから、Dand5の発現可視化個体を作製して、ラインにする過程で観察したところ、KV周囲でEGFPを発現することから、これまで報告されているようにDand5によるSpaw (nodal)の調節系が機能していることが予想できた。KVからのNodal signal の左右差については、Dand5の左右差があると報告されており、われわれもこのレポーターフィッシュを独自に作製して検討したが左右差は認めなかった。明確な左右差を示しておらず、Nodal シグナルによる左右差形成機構の関与はあるが、Spawのあきらかな左右発現の差を説明できる結果とはならなかった。

(4) Tg(spaw:sfEGFP) によるSpaw発現の詳細な検討

Spawの発現が前方でも後方でもほぼ同時に見られることから、spaw発現すなわち、左右差を誘導するシグナルが早期から決定している可能性を強く示唆しており、KVの形成以前にSpawの左右差決定機構の存在が考えられた。ただし、この結果はTg(spaw:EGFP)で得られた結果であり、KVとSpawの発現の時空間的解析はなされていなかった。そのために、foldingが早く蛍光を早期に発するTg(spaw:sfEGFP)を用いて、どこで早期に発現するかを調べた。EGFPがKVの周囲から発現を開始して、その後徐々に吻側に向かってその発現が見られることを明らかにすることができた。すなわち、KVからの何らかのシグナルがSpaw発現を調整し、さらにSpaw発現依存性にSpawの発現が吻側に広がることが予想できた。

(5) Elov16 の左側特異的発現

長鎖脂肪酸延長酵素 (elongation of very long chain fatty acids, ELOVL) ファミリーのうち Elov16が左側で発現することを発見した。ただし、ELOVL6のノックアウトマウスの2/3が embryonic lethal であり、TALENを用いたELOVL6ノックアウトゼブラフィッシュが致死とならないために、脂肪酸だけで左右非対称が説明できないことが予想できた。Chickenでは、右側での発現がみられ、ゼブラフィッシュとは異なることが報告された。



Spaw依存性に左側で発現が見られるPitx2と同様にElov16もSpawの転写制御を受けることが報告されたために、Spawの発現に注力して、Spaw-EGFPのノックインを作製して、Spawが正中を越えない理由を検討することが重要であると考えた。

(6) 新規の左側発現遺伝子、右側発現遺伝子探索

これまでに明確に左右差を検出できているのは Spaw や一部のNodalシグナルだけであり、これが中胚葉臓器・内胚葉臓器の左右差を持った配置にどのように関わるかは不明である。したがって、spawを含めて左右差発現が顕著な分子の発現制御過程を解明することが不可欠であり、KV形成から遺伝子の発現左右差は遺伝子転写調節によると考えて探索を行うことにした。京都大学(現、熊本大学)の沖博士に相談し、ゼブラフィッシュでPhoto-Isolation Chemistry (PIC) 手法で確認できないかを検討した。KVの形成からゼブラフィッシュの早期胚では、PICで選択できる細胞数が非常に少ないために困難を極めることが予想された。

まとめ 本研究期間内で、KVでのシグナルの左右差を決定する機構の解明には至らなかったが、KVでのCa²⁺の左右差は少なくとも関係なく、DFCsのCa²⁺oscillationはKV腔ができる前から盛んに観察されることがわかった。Notch, Wnt, Smadのシグナルの早期での左右差もないことがわかった。ただ、これまで報告されているSpawの左右差によってPitx2, Elov16などが転写制御を受けて左右差を生じていることがわかった。Tg(spaw;sfEGFP)とKI(spaw-EGFP)は今後、左右差検討をおこなう上では重要な試料となることがわかった。KVのRNA-seqを可能とさせるTg(sox17:EGFP)の作製によりKV細胞を分取して今後の解析にも使用可能であり、Spawの下流分子をSpaw陽性細胞を用いて遺伝子解析できる系も確立できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakajima H, Ishikawa H, Yamamoto T, Chiba A, Fukui H, Sako K, Fukumoto M, Mattonet K, Kwon HB, Hui SP, Dobrova GD, Kikuchi K, Helker CSM, Stainier DYR, Mochizuki N.	4. 巻 58
2. 論文標題 Endoderm-derived islet1-expressing cells differentiate into endothelial cells to function as the vascular HSPC niche in zebrafish.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dev Cell	6. 最初と最後の頁 224-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2022.12.013.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui H, Chow RW, Xie J, Foo YY, Yap CH, Minc N, Mochizuki N, Vermot J	4. 巻 374
2. 論文標題 Bioelectric signaling and the control of cardiac cell identity in response to mechanical forces.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 351-354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abc6229.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe-Takano H, Ochi H, Chiba A, Matsuo A, Kanai Y, Fukuhara S, Ito N, Sako K, Miyazaki T, Tainaka K, Harada I, Sato S, Sawada Y, Minamino N, Takeda S, Ueda HR, Yasoda A, Mochizuki N.	4. 巻 36
2. 論文標題 Mechanical load regulates bone growth via periosteal Osteocrin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 109380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109380.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kondrychyn I, Kelly DJ, Carretero NT, Nomori A, Kato K, Chong J, Nakajima H, Okuda S, Mochizuki N, Phng LK	4. 巻 11
2. 論文標題 Marcks11 modulates endothelial cell mechanoreponse to haemodynamic forces to control blood vessel shape and size	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19308-5.	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 Bornhorst Dorothee, Xia Peng, Nakajima Hiroyuki, Dingare Chaitanya, Herzog Wiebke, Lecaudey Virginie, Mochizuki Naoki, Heisenberg Carl-Philipp, Yelon Deborah, Abdelilah-Seyfried Salim	4. 巻 10
2. 論文標題 Biomechanical signaling within the developing zebrafish heart attunes endocardial growth to myocardial chamber dimensions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12068-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 Rho Seung-Sik, Kobayashi Isao, Oguri-Nakamura Eri, Ando Koji, Fujiwara Masakazu, Kamimura Naomi, Hirata Hiromi, Iida Atsuo, Iwai Yoshiko, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 49
2. 論文標題 Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 681 ~ 696.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2019.03.023	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hiroyuki Nakajima, Hiroyuki Ishikawa, Didier Stainier, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Endoderm-derived endothelial cells constitute a stem cell niche in zebrafish
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋 洋行、石川 博之、望月 直樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ血管内皮細胞の新規多様性創出機構
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Deciphering cardiovascular development by live-imaging of zebrafish
3. 学会等名 International Symposium of Pediatric Heart and Lung transplantation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Endodermal-mesodermal transition for vascular development
3. 学会等名 International Vascular Biology meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Cloche -independent blood vessel formation in zebrafish
3. 学会等名 International Society of Vascular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Endoderm-derived endothelial cells become veins in zebrafish.
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 洋行、石川 博之、望月 直樹
2. 発表標題 体節形成期に尾側の血管内皮細胞を供給する新たな起源細胞の同定
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>造血幹細胞ニッチを形成する新たな血管起源の解明 https://www.ncvc.go.jp/pr/release/pr_36511/ 国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部 http://www.z-cv.jp/renewal/ 循環微小画像医学 http://www.z-cv.jp/research/ http://www.z-cv.jp/index.html</p>

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
研究分担者	中嶋 洋行 (Nakajima Hiroyuki) (10467657)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
研究分担者	迫 圭輔 (Sako Keisuke) (50786291)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級 研究員 (84404)	
研究分担者	福井 一 (Fukui Hajime) (80551506)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

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			
ドイツ	Max Planck Institute	European Center for Angioscience	Philipps-University Marburg	他2機関
英国	Imperial College London			
ドイツ	MPI Bad Nauheim			
ドイツ	MPI Bad Nauheim			
ドイツ	ポツダム大学	マックスプランク研究所		