

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06677

研究課題名(和文) 椎間板の髄核形成に甲状腺ホルモンシグナルは関与しているのか？

研究課題名(英文) Is thyroid hormone signals involved in the formation of nucleus pulposus of intervertebral disc?

研究代表者

中島 圭介(Nakajima, Keisuke)

広島大学・両生類研究センター・助教

研究者番号：60260311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：両生類の変態現象は甲状腺ホルモンによって引き起こされる。無尾両生類の変態において尾の消失は最大のイベントであり、アポトーシスの典型例でもある。哺乳類の脊索は発生と共に消失し、椎間板の髄核となることが知られている。しかし、両生類の尾の消失にともなって消失する脊索がその後、どのような運命を辿るかは不明な点が多い、本研究は両生類の変態に伴う脊索の崩壊機構を明らかとするために、脊索消失に関わる分子機構の一部を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両生類の変態現象は甲状腺ホルモンによって引き起こされる。無尾両生類の変態において尾の消失は最大のイベントであり、アポトーシスの典型例でもある。哺乳類の脊索は発生と共に消失し、椎間板の髄核となることが知られている。本研究は甲状腺ホルモンと脊索消失の関係の分子機構を明らかとすることにより、椎間板の発生や病気の治療に新たな視点を与えるきっかけとなり得る研究である。

研究成果の概要(英文)：Amphibian metamorphosis is induced by thyroid hormone. The disappearance of the tail is the largest event in metamorphosis of anuran amphibians and is also a typical example of apoptosis. It is known that the notochord of mammals disappears with development and becomes the nucleus pulposus of the intervertebral disc. However, it is unclear what the fate of the notochord, which disappears with the disappearance of the amphibian tail. In order to clarify the mechanism of notochord collapse associated with amphibian metamorphosis, this study revealed a part of the molecular mechanism involved in notochord disappearance.

研究分野：発生生物学

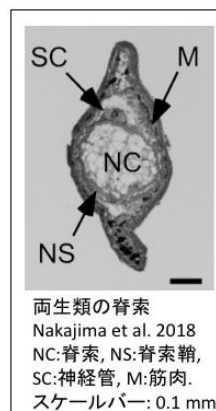
キーワード：甲状腺ホルモン 変態 脊索 髄核 RNA-Seq olf4 甲状腺ホルモン受容体 scppa2

## 1. 研究開始当初の背景

脊索は中脳の前端から尾の先までに渡って体軸を貫く、脊索動物・脊椎動物特有の器官である。脊椎動物では発生初期から神経管の腹側に位置し、強靱な繊維からなる脊索鞘の中に巨大な空胞を持つ空胞化細胞が発達し、流体静力学的に骨格の役割を果たして胚の伸長を引き起こす。哺乳類では胎児期に脊索が脊椎骨で分断されて椎間板の髄核となる。新生児では髄核の中に脊索で見られた空胞化細胞が多数観察されるが、成体になると空胞は小さくなる。この空胞化細胞の制御の乱れが椎間板の異常を引き起こす可能性が示唆されている。

両生類の変態は甲状腺ホルモン(Thyroid Hormone: TH)によって制御されており、変態と哺乳類の出生は発生過程において相同な現象であると提唱されている。短期間に血中 TH 濃度の一過的で急激な上昇と下降が起こり、水棲(哺乳類では子宮の中)から陸棲生活へ適応するために全身の器官や組織で劇的な変化が観察される。エラ呼吸(哺乳類では胎盤からの酸素供給)から肺呼吸への変化、腸の上皮細胞やヘモグロビンの幼生型から成体型への変化、神経系や尿素回路の発達など多くの重要な変化が両者で共通している。これらの現象を研究する際に哺乳類では胎児期の観察や操作が困難だけでなく、胎児が母体と胎盤で繋がっているために血中 TH 濃度を操作することが極めて困難である。一方両生類は変態期の観察や操作が容易であり、飼育水に TH や TH 合成阻害剤を加えて変態を調整することが簡単にできる優れた実験動物である。

哺乳類の髄核は個体発生時に脊索から作られ、空胞が小さくなっていく。両生類の尾の脊索は空胞化細胞で埋め尽くされており、TH によって変態期に消失する。哺乳類の出生と両生類の変態の類似性の高さから髄核の形成に TH が関わっている可能性は十分に考えられる。本研究課題ではホルモン制御の研究に適した両生類を用いてこの問題に取り組む。



## 2. 研究の目的

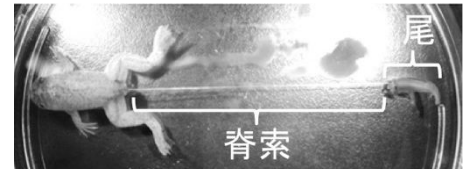
本研究は椎間板の形成に関わる分子機構を明らかにする事を目的とする。本研究課題は基礎研究と臨床研究の両面を持つ。基礎的側面としては TR 1 と TR 2 二つのアイソフォームの異なる役割はどのように区別されているのかを明らかとし、さらにこれまで注目されていなかった変態期の尾の退縮における脊索消失及び脊柱形成の分子機構を解明する。この実現のために既に脊索を単離する新たな技術を開発しており、学術的に極めて新規性・独自性に富む研究である。臨床的側面としてはこれまで考えられていなかった椎間板の髄核の形成と維持に TH シグナルが関与している可能性について着目している点に新規性および独自性がある。TR 1 が髄核の形成と維持に関わっていた場合、本研究は髄核の異常を原因とする疾病の治療方法の開発に新たな視点を加えることのできる創造性の高い研究である。

## 3. 研究の方法

本研究では TR KO 動物で脊索の消失が抑制された分子機構を解明し、さらに椎間板の髄核の形成と維持に TH シグナルが関与しているか否かを明らかにするために、以下の研究を行う。

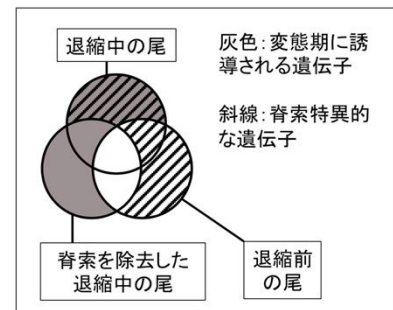
#### [1] 脊索では TR の発現量の方が TR よりも多いのか？

TR と TR は構造が似ているために in situ hybridization や免疫組織化学的区別が困難であり、さらにこれらの手法は定量性が低い。定量のためには外科的に脊索を分離し、定量的 RT-PCR で TR と TR の発現量を測定する必要がある。本研究代表者は既に退縮が最も激しい発生段階の尾から脊索を分離する手法を開発している(下図)、脊索から取れる mRNA は微量なため、50 匹程度の幼生から脊索を分離して RNA 抽出を行い、TR と TR の発現量を定量する。



#### [2] 脊索で TR の発現量が多い場合の脊索消失分子機構

この問題を解明するためには変態最盛期に TR によって脊索で特異的に発現が変化する遺伝子を同定する必要がある。発現が減少して脊索の崩壊を起こす可能性もあるが本調書では発現上昇に限定して説明を行う。この遺伝子を同定するために野生型と TR KO 動物の尾における mRNA の発現を比較する方法が考えられるが、TR KO 動物では尾の退縮そのものが抑制されてしまうので、適切な比較時期を決めることが困難である。そこで退縮中の尾と退縮前の尾の脊索の RNA を抽出し、RNA-seq を用いて退縮中の尾の脊索で特異的に発現量が高まる遺伝子を同定する。しかし本研究代表者は今のところ退縮前の尾で脊索を外科的に分離できていない。仮に退縮前の尾で脊索を外科的に分離できない場合は RNA-seq を用いて「退縮中の尾」と「脊索を除去した退縮中の尾」、「退縮中の尾」と「退縮前の尾」の二つの比較を行い、両方の比較において退縮中の尾で発現量が増加している遺伝子を同定する(右図)。興味深い遺伝子が取れた場合は KO 動物を作製して脊索の崩壊が抑制されるか否かを確認する。ノックダウン F0 個体が性成熟できない場合は生殖細胞で優先的に標的遺伝子を破壊する手法を用いて体細胞における変異が少ない F0 を作成する。この F0 同士の交配により KO ホモ個体を作製し、変態期の解析を行う。



#### [3] 脊索で TR の発現量が多くない場合、TR KO 動物のみで脊索消失が抑制される理由

この場合も上述[2]の方法で変態期の脊索で特異的に発現が上昇する遺伝子を同定する。この遺伝子のプロモーター解析を行い、TH 応答配列を特定し、TR 特異的にこの遺伝子が誘導されるか否かを検討する。TR 特異的に発現誘導を示す応答配列の報告は現在までになく、このような配列が見つければ TH シグナル研究に一石を投じる大きな発見となる。

#### [4] TR KO 動物では変態期における体幹部の脊柱の形成に表現型の変化は観察されるのか？

ネットイツメガエルのみならず、長年研究材料として使われてきたアフリカツメガエルでさえも脊柱形成に関してはほとんど研究報告例がない。本研究代表者が変態終了後の小ガエルの脊柱を観察したところ背側は骨化していたが、腹側は閉じていない未完成の状態であった。このことから変態終了後に時間をかけて脊柱の形成は完成するものと思われる。ツメガエルの血中 TH 濃度は成体になっても変態最盛期の 1/3 程度は存在していることから、変態終了後の脊柱の形成にも TH が関わっている可能性は十分に考えられる。本研究では研究分担者の田澤が野生型及び TR KO 動物の脊柱形成の様子を詳しく観察・比較して、脊柱形成における TR の役割を考察する。

[5] TR KO 動物では成体の髄核に表現型の変化は観察されるのか？

哺乳類では胎児期に脊索が分断されて椎間板の髄核となる。新生児では髄核の中に脊索で見られた空胞化細胞が多数観察されるが、成体になると空胞は小さくなる。本研究では野生型及び TR KO 動物成体の髄核、特に空胞の大きさに着目し、研究分担者の田澤が組織学的観察を行う。TR が空胞を持つ細胞の矮小化に関わっているならば KO 動物の成体では哺乳類の新生児のように大きな空胞化細胞が存在していることが期待される。成体の髄核の細胞形態に TR が関与していることが明らかとなれば、背中や腰の痛みの原因となる椎間板の異常の解析に TH シグナルの関与という新たな視点を加える発見となる。

#### 4 . 研究成果

K. Nakajima, I. Tazawa and Y.B. Shi

A unique role of thyroid hormone receptor $\beta$  in regulating notochord resorption during *Xenopus* metamorphosis

General and Comparative Endocrinology 2019; 277(1): 66-72

Impact Factor-2018: 2.445

これまでの我々の研究により、甲状腺ホルモン受容体の二つのアイソフォーム(、)のうち、を破壊した時のみ尾の退縮が顕著に抑制され、中でも脊索の退縮が強く抑制されている事が明らかとなった (Nakajima 2018, Endocrinology)。そこで本研究では、脊索を外科的に分離する方法を開発し、変態期の脊索で発現量が上昇する遺伝子を解析した。その結果、尾の退縮前は と の発現量はほぼ 1:1 であるが、尾の退縮中は 1:3 まで上昇すること、脊索ではこの比が 1:8 まで大きくなっていることが明らかとなった。さらに、細胞死に関わると考えられている細胞外基質分解酵素である *mmp2*, *mmp9-th*, *mmp11*, *mmp13*, *mmp14* 遺伝子の発現量を RT-PCR を用いて定量的に調べたところ、*mmp9-th* と *mmp13* が変態期の脊索において局所的に発現が誘導されていることが判明した。

Keisuke Nakajima, Yuta Tanizaki, Nga Luu, Hongen Zhang, Yun Bo Shi

Comprehensive RNA-Seq analysis of notochord-enriched genes induced during *Xenopus tropicalis* tail resorption

General and Comparative Endocrinology 2020; 287: 113349

退縮前の尾、退縮中の尾、脊索を除去した退縮中の尾から RNA を抽出し、RNA-Seq により遺伝子発現パターンを比較した。退縮前後の比較により、変態期に発現量が増大する遺伝子群を同定した。また、脊索を除去した退縮中の尾と脊索を含む退縮中の尾の比較により、尾の退縮中に脊索で発現量が多い遺伝子群を同定した。次に、これら二つの遺伝子群の中で共通する遺伝子群を「変態期に脊索で発現量が増大する遺伝子群」と判断した。この解析により、*mmp9-th*, *mmp13*, *olfm4*, *scppa2* の4つの遺伝子が、変態期の脊索で発現が誘導され、かつ、多量に発現していることを明らかとした。MMP は細胞外基質分解酵素であるため、脊索の退縮に関与しているであろうことは容易に想像がつく。しかし、*olfm4* は小腸の幹細胞のマーカとして知られており、*scppa2* は骨や歯の形成に関わる遺伝子群の仲間である。これらの遺伝子が、どのように脊索の退縮に関与しているのかを今後解析することにより、未知の作用機序が明らかとなる事が期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakajima Keisuke, Tanizaki Yuta, Luu Nga, Zhang Hongen, Shi Yun Bo	4. 巻 287
2. 論文標題 Comprehensive RNA-Seq analysis of notochord-enriched genes induced during <i>Xenopus tropicalis</i> tail resorption	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113349 ~ 113349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2019.113349	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 Keisuke Nakajima, Ichiro Tazawa and Yun-Bo Shi	4. 巻 277
2. 論文標題 A unique role of thyroid hormone receptor in regulating notochord resorption during <i>Xenopus</i> metamorphosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 66-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2019.03.006	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 圭介、田澤 一朗、Yun-Bo Shi
2. 発表標題 ゼノバス変態期の脊索退縮における甲状腺ホルモン受容体ベータの特異的な役割
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 圭介
2. 発表標題 変態期における脊索退縮の分子機構
3. 学会等名 第13回ツメガエル研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 圭介、田澤 一郎、谷崎 裕太、Luu Nga, Zhang Hongen, Yun-Bo Shi
2. 発表標題 両生類尾部消失を支配する脊索退縮の分子機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	田澤 一郎  (Tazawa Ichiro)	広島大学・両生類研究センター・助教	
	(10304388)	(15401)	

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
---------	---------