

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570207

研究課題名(和文) 前腸形成と内胚葉領域化の統合的解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of the foregut formation and regionalization of the endoderm

研究代表者

福田 公子 (FUKUDA KIMIKO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：40285094

研究成果の概要(和文)：消化管内胚葉がそれぞれの器官領域に分化する分子機構には、未だ不明な点が多い。これを明らかにするために、初期胚内胚葉で局所的に発現する遺伝子をスクリーニングし、それらの機能を調べた。すると、*sizzled* は BMP シグナルに関与し、肝臓や胃の領域分化に関わること、また *APOA1* は膵臓域に肝臓を誘導できることが分かった。また胃と腸の境界形成機構に両者に発現する転写因子が重要であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Much about molecular mechanisms involved in regionalization of the gut endoderm remain unknown. To clarify this we isolated genes expressed in the early endoderm locally, and analyzed their function. We found that *sizzled* modified gradient of BMP ligand and regulated liver and stomach differentiation. Also, *APOA1* induced liver endoderm at the pancreas region. In addition, the mechanism of boundary formation between the stomach and the intestine were controlled by two transcriptional factors, which are expressed in each region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成，消化管，内胚葉，シグナル分子

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の消化管は口から肛門を結ぶ1本の管であり、外部からの栄養吸収をつかさどる唯一の管関係である。消化管では各部分が形態的、および機能的に高度に分化した消化器官に分化している。前後軸に沿った各器官、咽頭、食道、胃、肝臓、膵臓、十二指腸、小腸、大腸などの並びは厳密に決まっており、そこには遺伝的なコントロールが存在していることが示唆される。また消化管からは呼吸器である肺や、内分泌器官である甲状腺等

も前後軸、背腹軸上の決まった場所に分化することが知られている。消化管は主に、内胚葉性の上皮、中胚葉性の間充織から成るが、各器官で特に特徴的な分化を示すのは内胚葉である。ニワトリ胚では我々を含めた多くのグループの研究により、内胚葉は形態分化が起こるかなりまえである、体節期にあたるステージ5からステージ10くらいの間に咽頭、肺、胃、肝臓、膵臓、腸などのどこになるかが決定され、その際、それぞれ特異的な転写因子を発現することが知られている。し

かし、それらの転写因子が決まった場所に発現を開始するのに関わる分子機構についての知見は少ない。消化管後方の膵臓、小腸域の領域化には、この頃胚後方で強く発現している *wnt* および *fgf* が後方で強く、前方に行くほど弱くなるという勾配を作っており、その強さによってコントロールされているという知見がある。この頃胚では、腸域および膵臓域はまだ管を作っていない中・後腸域に位置しており、この勾配モデルで分化が説明できるものと考えられる。一方、これよりも前方の咽頭、肺、胃、肝臓域は、前腸内で領域化する。前腸はステージ 6 で内胚葉の前端からできる袋状の構造で、徐々に後方に伸長してゆくことが知られている。しかもその伸長には複雑な細胞運動、特に **convergent and extension** が関わっているという可能性を我々は見つけている。この伸長しつつある袋状構造である前腸内での領域化がどのように調節されているのかは全く研究がない。

2. 研究の目的

研究では、前腸における内胚葉の領域化の分子機構を探るため以下の研究を行った。

(1) 各領域のマーカー遺伝子以外に初期内胚葉に局所的に発現する遺伝子が殆ど知られ例がないため、我々は消化管内胚葉に局所的に発現する遺伝子の単離を試みた。これは 2005 年から 2007 年の科学研究費基盤研究(C)「前腸形成のダイナミクス」で行った研究の継続である。

(2) 上で単離された遺伝子の中から、前腸内の領域化と関わると考えられる発現パターンを示すものを取り上げ、その機能を解析することで、前腸内領域化の分子機構に迫った。

(3) これまでの研究では消化管領域化の仕組みの理解を目的とするものが多かったが、消化器官同士の境界の形成の仕組みは殆ど研究されてこなかった。消化器官は機能や形態の全く違う器官がとなりあっており、その境界部分は極めて厳密でほぼ 1 つの細胞を境界に別の組織が広がっている。本研究では胃／小腸境界の形成についてそれぞれの上皮で発現する転写因子 *Sox2* と *CdxA* の発現解析、境界の細胞のふるまい、および相互作用を調べ、その分子機構の理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) 2005 年から 2007 年の科学研究費基盤研究(C)「前腸形成のダイナミクス」でステージ 5 の内胚葉全体、ステージ 8-10 の後腸内胚葉、ステージ 10-12 の前腸内胚葉を集め、それぞれから mRNA を抽出し、ニワトリ DNA チップを用いて、マイクロアレイ解析を行った。その研究では、後腸または前腸内胚葉特異的

な発現を示す遺伝子を同定したが、今回の実験では初期内胚葉特異的な遺伝子も解析に加え、胚でのそれぞれ遺伝子の発現を **Whole mount in situ hybridization** で解析した。

(2) (1)の解析で興味深い発現を示した遺伝子を取り上げ、その機能を解析した。機能解析には遺伝子を *in ovo* 電気穿孔法で内胚葉特異的に異所的に発現させ、領域分化への影響を調べた。また遺伝子の機能を失わせるために、*siRNA* も同様に内胚葉へ導入し、解析した。さらに **BMP** シグナルに関わるさまざまな分子(リガンド、アンタゴニスト、ドミナントネガティブ受容体など)も導入しその影響を調べた。

(3) 胃／小腸境界形成機構の解析は以下の方法で行った。

① 胃・食道上皮特異的な転写因子 *Sox2* と腸上皮特異的な転写因子 *CdxA* の発現を詳細に解析した。

② 境界領域にある細胞に **GFP** コンストラクトを *in ovo* 電気穿孔法で導入することでラベルし、その細胞の子孫がどのような遺伝子発現し、どこに位置しているかを詳細に調べた。

③ *Sox2* を初期胚内胚葉の後方、将来 *CdxA* 発現する細胞に導入、または *CdxA* を初期胚内胚葉前方の予定 *Sox2* 発現域に導入し、それぞれ *CdxA*, *Sox2* に対する発現の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚初期内胚葉特異的遺伝子の探索

マイクロアレイ解析 (Kimura et al., *in press*) の候補遺伝子のうち、本研究では初期内胚葉で発現する遺伝子の同定と発現パターンの解析を行った。候補遺伝子 200 に対し、**RT-PCR** を用いて、二次的なスクリーニングを行った。その結果、多くの遺伝子は中胚葉に発現していたが、48 の中胚葉に比べ、内胚葉で発現の強い遺伝子を同定することができた。このうち、20 遺伝子について初期胚ではつげんをしらべたところ、内胚葉特異的発現を示す 2 つの遺伝子が見つかった。このうち、**APOA1**(ApolipoproteinA1)遺伝子は高重量脂質コア結合タンパク質として知られており、内胚葉および胚体外内胚葉で特異的に発現していた。内胚葉では原腸陥入期(ステージ 4 から 4+)では内胚葉全域に発現していたが、その後発生の振興に伴い、前方内胚葉への限局が見られた。最終的にはステージ 8 頃から前腸の最も後方にある肝臓領域で特異的に発現することがわかった。もう一つの遺伝子 **ADRP**(adipose differentiation-related protein) 遺伝子は

Adipophilin と呼ばれ、脂肪粒の表面に結合し、細胞内への脂肪の取り込みに関わる分子をコードすることが知られている。ADRP は原腸陥入期のステージ 4 で内胚葉の最も前方でのみ発現し、ステージ 5 までは発現が見られるものの、ステージ 6 になると発現が消失することが分かった。

(2) 内胚葉発現遺伝子の機能解析

① APOA1 遺伝子の機能解析

APOA1 遺伝子は体節期に肝臓領域に発現が限定することから、肝臓領域化に関わっているかどうか調べた。APOA1 を強制発現させるベクターを初期ニワトリ胚 (ステージ 4-6) の肝臓以外の領域に発現させると、肝臓領域以外の内胚葉にも肝臓領域マーカー遺伝子 Hex の発現を誘導した (図 1)。このことから、APOA1 は内胚葉において肝臓領域化に関わる初期因子である可能性が高い。Hex の発現調節に関わる内胚葉因子は、初めての報告となる。しかし、様々な内胚葉領域に APOA1 を強制発現する実験をすると、その Hex 誘導能は極めて限定的であることが明らかになった。APOA1 が Hex を誘導するのは、もともと肝臓の隣接領域から分化し、何かの刺激で肝臓へと分化することが知られている膵臓領域のみであった。しかもその誘導効率は 50%ほどであった。そもそも非常に拡散性が高いうえに、胚体外領域で高い発現を見せる APOA1 をある場所で強制発現することでなぜ Hex を誘導できるのかは不明である。また、高重量脂質コア結合因子がどのような作用機序で Hex を誘導するのかも分かっていない。Drosophila を使った研究で低重量脂質コアタンパク質の一種が共受容体に作用することで、wnt シグナルや HH シグナルに関わっているという報告があるため、APOA1 もそのような作用でシグナル分子に影響し、Hex を誘導している可能性がある。

② BMP シグナル阻害因子 sizzled の機能解析

前述のマイクロアレイ解析で前腸特異的遺伝子として同定された sizzled の機能解析を行った。sizzled は体節期初期のステージ 8 から内胚葉に発現を開始する。このとき、sizzled は前腸内胚葉の腹側に特異的に発現している (図 2)。ステージ 10, 11 では同様に前腸内胚葉の腹側に発現するが、その発現は前腸前方に限定され、前腸最後方の前腸門付近の内胚葉では発現が見られない (図 5)。この時期に sizzled の発現しない前腸門付近から領域化するのは予定肝臓領域である。sizzled は分泌型 frizzled の一種であるが、他の分子と違い、wnt シグナルではなく、Bmp

シグナルに関与することが知られている。Bmp リガンドは Chordin と結合することで Bmp 受容体に結合できなくなり、Bmp シグナルを抑えられることがよく知られている。この Chordin を分解することで不安定化し、結果的に Bmp シグナルを活性化するのがメタロプロテアーゼである Tolloid であるが、sizzled はこの tolloid に結合し、その酵素活性を抑制し、結果的に chordin を安定化することで Bmp シグナルを抑制するとされている。

さて sizzled を前腸腹側内胚葉全体に強制発現したところ、肝臓マーカー Hex の発現が抑えられた (図 3)。次に siRNA を用いて sizzled の発現を抑えた (ノックダウン) と、Hex の発現は心臓の前端まで伸長した (図 4)。このことから sizzled は肝臓領域化を抑え、肝臓分化を前腸の後方に限局するのに関わっていることが示唆された。この sizzled の機能に Bmp シグナルが関わっているかどうか調べるために、Bmp シグナル関連因子との関係を調べた。まず、マウス Bmp4 を前腸全体に強制発現すると、sizzled のノックダウン胚と同様に、Hex の発現が心臓の前端まで伸長した。また、マウス Bmp4 と同時に sizzled の強制発現を行うと、その表現形はレスキューされ、Hex は前腸後方だけに発現した。次に sizzled の機能に chordin が関わっているかどうかを調べた。chordin の強制発現の表現形は sizzled の強制発現と同様に Hex の発現がなくなる。また、sizzled のノックダウンの表現形は chordin の強制発現によりレスキューされる。これらの結果から、sizzled は chordin を介して、Bmp シグナルをコントロールすることで Hex 発現および肝臓領域化に関わることがわかった。

以上の結果をまとめ、肝臓領域分化と Bmp シグナルに関して以下のモデルを提唱した。肝臓領域化には Bmp シグナルと心臓からのシグナルの両方が必要であることが知られている。マウスではこの心臓からのシグナルは FGF であることが知られているが、ニワトリでは不明である。ニワトリ胚では Bmp リガンドは前腸全体に発現しているため、この両方で誘導される肝臓領域は心臓の前端から前腸最後方の領域となる。しかし、前腸前方では sizzled が発現しているため、脊索から分泌される chordin が安定化し、Bmp シグナルが抑制されるため、肝臓領域は分化できず、sizzled の発現のない最後方の前腸門付近でのみ Bmp シグナルが活性化し、肝臓領域が分化できると考えられる (図 5)。このように前腸内ではシグナル分子が細胞外で修飾され、複雑な勾配を作るためにさまざまな領域が比較的短期間に分化できると考え

られる。

(3) 器官境界形成の分子機構

成体の消化管では、各消化器官の境界が厳密に決まっている。特に食道/胃、胃/十二指腸では境界を境に上皮がそれぞれの特徴をもって並んでいる。領域形成の研究に比べ、この境界の形成に関する研究は少なく、その分子機構は殆ど分かっていない。胃/十二指腸の境界では、発生の比較的早い時期（10日胚）に胃上皮マーカーである転写因子 Sox2 と腸上皮マーカーである転写因子 CdxA の発現境界と、胃/十二指腸の境界が一致することが知られていた (Ishii et al., 1998)。そこで特に胃/十二指腸境界の形成機構に関し、次の3項目を研究した。

- ① Sox2 と CdxA の発現開始以後、明確な境界を形成するまでの詳細な発現を解析する
- ② Sox2/CdxA の境界付近での細胞動態の観察をする
- ③ Sox2 と CdxA の相互作用の解析をする。

① Sox2 と CdxA の発現解析

Sox2 はステージ 8 より前腸領域で発現することが知られている (Ishii et al., 1998)。また、CdxA の発現開始はステージ 10+ で、中腸領域であるため (Matsushita et al., 2002)、両者は発現開始時には離れて発現していることが分かっている。その後、ステージ 15+ でもその発現は重ならないが、ステージ 16+ で一部重なっている (図 6)。その後、ステージ 20 からは前から Sox2 強発現域、Sox2 弱発現域、Sox2/CdxA 共発現域 (どちらも弱い)、CdxA 強発現域が見られる。ステージ 29 からはステージ 20 の領域に加え、Sox2/CdxA 共発現域と CdxA 強発現域の間に CdxA 弱発現域が見いだされた (図 7)。ステージ 34 になると Sox2/CdxA 共発現域がなくなり、Sox2 と CdxA の発現には境界が形成された (図 8)。

② Sox2/CdxA の境界付近での細胞動態解析
消化管が形成される時期には胚体全体が伸びる時期でもある。この胚体の伸長により、基本的には消化管内胚葉は後方へ向かって移動している。しかし、この運動に領域差があるのかと言った解析は全く行われていない。そこで、境界付近の領域を①Sox2 のみ発現する領域、②Sox2/CdxA 共発現域、③CdxA のみ発現する領域に分け、GFP コンストラクトを導入してラベルし、1日後、2日後の細胞の動きおよび細胞の発現する転写因子を調べた。

まず①の領域では、ラベルされた細胞領域は伸長したが、ラベルされた時と同様に Sox2 を発現し続けることが分かった。また②の領域では始めは Sox2/CdxA の両方を発現する

ものの、発生が進むと伸長し、後方の細胞は CdxA のみを発現した。さらに③の領域では境界から離れるように後方へ移動するもの、領域自身は伸長せず、CdxA の発現にも変化がなかった。これをまとめると、Sox2 発現領域は伸長するが、境界を越えて後方に移動することはないこと。Sox2/CdxA 共発現領域の細胞は、その一部が後方へと伸長しながら移動し、CdxA のみは発現する細胞に変化すること。CdxA 発現細胞は後方へ移動するが、伸長しないことが分かった。このことから、Sox2/CdxA 共発現領域はこの時期に起こる中腸領域の後方伸長の起点となっている可能性が示唆される。

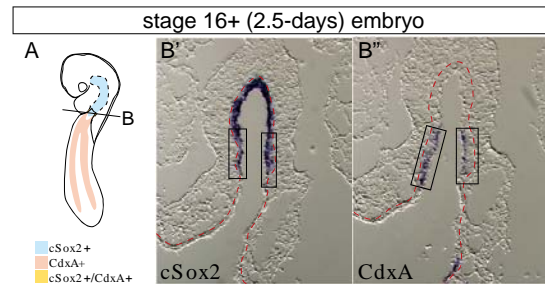
③ Sox2 と CdxA の相互作用の解析

胚体内の領域形成ではしばしば転写因子の相互作用が重要な役割を果たすことが知られている。例えば中脳、後脳境界の形成にはそれぞれの領域で発現する転写因子 Otx1 と Gbx2 の相互抑制が重要である。そこで、胃/十二指腸境界形成でも Sox2 と CdxA が相互抑制をしている可能性を示す実験を行った。

まず、Sox2 をステージ 5 の予定腸領域に強制発現させたところ、Sox2 が発現している細胞では CdxA の発現が抑えられた (図 9)。一方、CdxA を予定胃領域に発現させたところ、前腸内で CdxA が発現し、その領域で Sox2 の発現が抑制された。これらの結果から、Sox2 と CdxA は相互抑制作用があり、この作用によって一度できた境界が維持されることが考えられる。

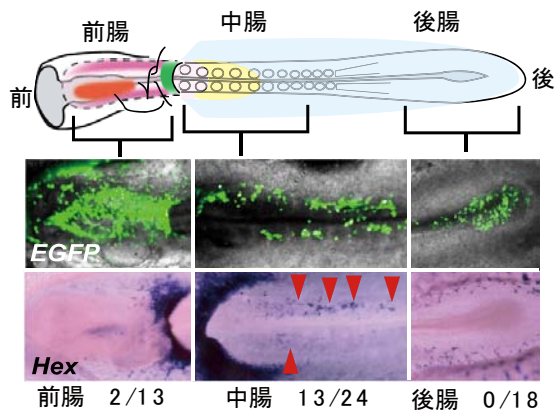
これらの結果から、Sox2 と CdxA の作用がどのように消化器官の境界形成に関わるかを解明できた。

図 13 : Sox2 と CdxA はステージ 15 では発現が重ならない。



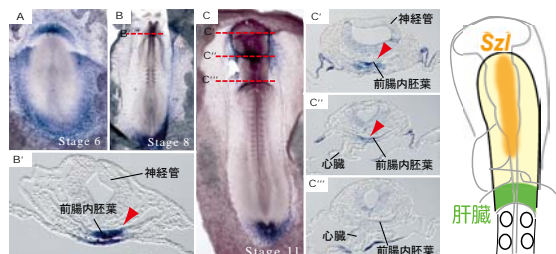
隣接切片で2つの遺伝子の発現を調べると Sox2 の発現後端は B のレベルで、CdxA の発現前端は C のレベルなので2つの発現は重ならない。

図 1 : APOA1 の強制発現による Hex の誘導



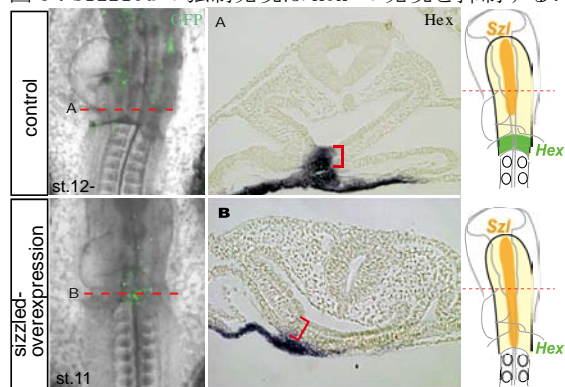
APOA1 を内胚葉に強制発現すると肝臓マーカーである Hex が誘導される。その発現頻度は中腸域、膵臓予定域で最も高い

図 2: sizzled の発現パターン



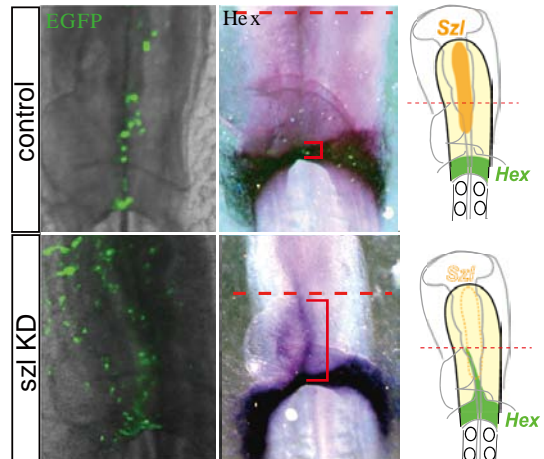
Sizzled は前腸内胚葉の腹側で特異的に発現する。ステージ 10 では前腸最後方の予定肝臓域を除く腹側内胚葉で発現する。

図 3: sizzled の強制発現は Hex の発現を抑制する。



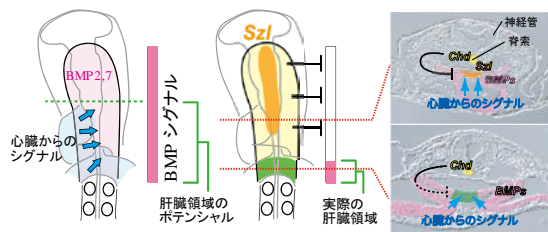
Sizzled を前腸全体に強制発現すると、前腸最後方の肝臓領域に発現する Hex の発現がなくなる。

図 4: sizzled のノックダウンにより Hex の発現が前方に伸長する。



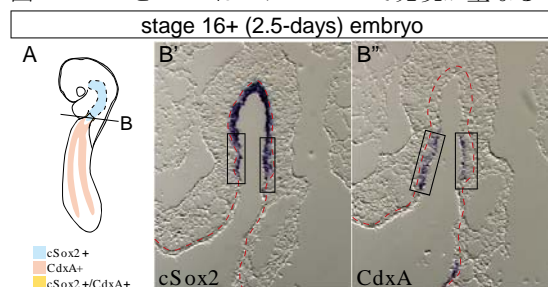
Sizzled を SiRNA によって発現抑制すると、Hex が心臓の前端部まで伸長して発現する。

図 5: sizzled は BMP シグナル勾配を修飾し、前腸内の領域化に関わる。



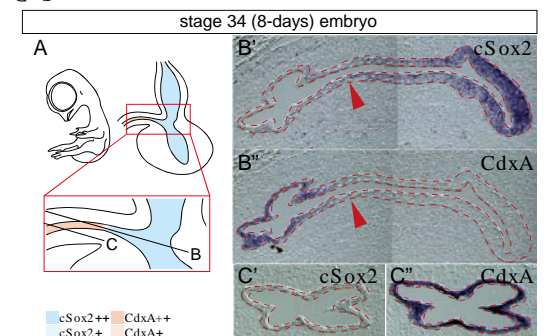
Sizzled は肝臓分化に必要な BMP シグナルと心臓からのシグナルのうち、BMP シグナルを前腸前方で抑え、肝臓を前腸最後方に限局している。

図 6: Sox2 と CdxA はステージ 16 で発現が重なる。



隣接切片で 2 つの遺伝子の発現を調べると B のレベルで、sox2 と CdxA の発現が重なっていることが分かる

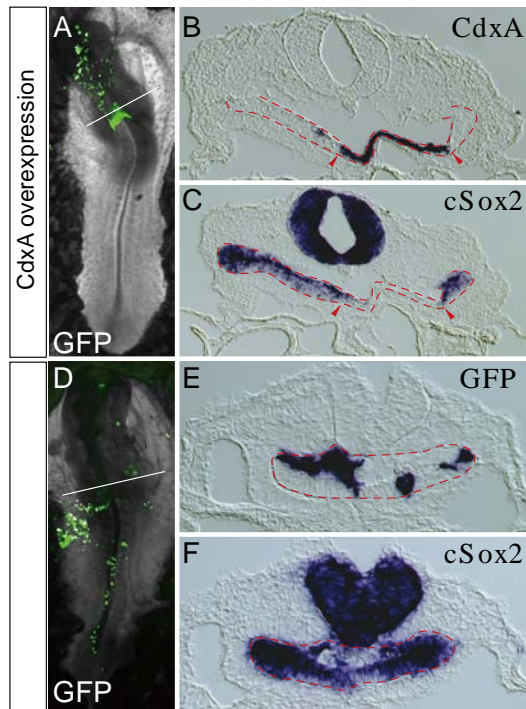
図 8: Sox2 と CdxA はステージ 34 で発現境界ができる。



隣接切片で 2 つの遺伝子の発現を調べると

Sox2+/CdxA+領域がなくなっている。

図9：CdxAはSox2の発現を抑制する。



Sox2発現域にCdxAを強制発現するとSox2の発現が抑えられる。

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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kimura, W., Cantas, A. Sheng, G. Jakt, M., Yasugi, S. and Fukuda, K. (2011) Identification of region specific genes in early chicken endoderm. Gene Exp. Patterns (in press).
- ② Matsuura, K., Katsumoto, K., Fukuda, K., Kume, K. and Kume, S. (2009) Conserved origin of the ventral pancreas in chicken. Mech. Dev. 126, 817-827.
- ③ Katsumoto, K., Fukuda, K., Kimura, W., Shimamura, K., Yasugi, S. and Kume, S. (2009) Origin of pancreatic precursors in the chick embryo and the mechanism of endoderm regionalization. Mech. Dev. 126, 539-551.

[学会発表] (計13件)

- ① Watanabe K. and Fukuda, K. (2010) The mechanisms of the boundary formation between the stomach and intestine endoderm in chicken embryo. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting jointly with the Japanese Society

of Developmental Biologists, Albuquerque.

- ② Okayama, Y., Kimura, W., Yasugi, S. and Fukuda, K. (2010) Sizzled in the foregut restricts liver region into anterior intestinal portal in the chicken embryo. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society for Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, Kyoto.
- ③ 渡辺健太, 福田公子 (2009) ニワトリ胚内胚葉において胃/腸の境界形成に関わるSox2とCdxAの相互抑制作用. Repressive interaction between Sox2 and CdxA is involved in the establishment of stomach/intestine boundary in chicken embryonic endoderm. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜.
- ④ 武政 智恵, 木村 航, 八杉 貞雄, 福田公子 (2008) ニワトリ胚における消化管上皮分化に関わる遺伝子の探索. 第31回日本分子生物学会, 神戸

[図書] (計1件)

- ① Electroporation of nucleic Acids into chick endoderm both in vitro and in ovo. Kimiko Fukuda Electroporation and sonoporation in developmental biology (H. Nakamura ed.), Springer (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 公子 (FUKUDA KIMIKO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：40285094

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし