

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590201

研究課題名（和文）心臓発生過程の心内膜床形成でおこる心内皮形質転換で浸潤を誘導する転写因子の探索

研究課題名（英文）Roles of transcription factors during endothelial-mesenchymal transformation in the developing chick heart

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

研究成果の概要（和文）：心内膜床形成過程で間葉を誘導する転写因子について、sox9 に注目し解析を試みた。ニワトリ胚の心内膜床形成過程で sox9 遺伝子は心内皮細胞と間葉細胞に発現し、sox9 遺伝子の機能阻害は心内皮細胞の間葉への分化を抑制した。また心内皮細胞への sox9 の遺伝子導入は遊走を誘導したが、間葉を形成しなかった。しかし、転写因子 slug を sox9 とともに導入すると間葉が形成された。sox9 は slug と協調的に心内皮細胞の上皮-間葉形質転換過程を制御する因子である可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：I examined role of sox9 in the endothelial-mesenchymal transformation (EMT) during cushion tissue formation using chick embryonic hearts. First, we examined their expression patterns in the developing heart by in situ hybridization. sox9 was expressed in the activated-endothelial and mesenchymal cells of the outflow tract and the atrioventricular canal regions. Second, sox9 siRNA inhibited endothelial transformation in vitro assay. Endothelial cells transfected with sox9 showed cell migration, but did not invade into the gel lattice. However endothelial cells transfected with sox9 and slug transformed to mesenchymal cells. Taken together, results suggest that sox9 and slug may play an important role during endocardial epithelial-mesenchymal transition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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（含組織学・発生学）

キーワード：心臓発生・心内膜床・上皮-間葉形質転換・転写因子・sox9

## 1. 研究開始当初の背景

心内膜床は房室管（心房と心室の間）および流出路に形成され、将来の中隔や弁を形成する原基である。心内膜床は原始心筒の心内皮細胞が心筋細胞より分泌される未知の誘導因子により間葉に分化し（上皮-間葉形質転換）、形成される。これまでに研究代表者は心内膜床形成での TGF $\beta$ ファミリーの働きに注目し、その分子機構を明らかにしてきた。心筋細胞から分泌される BMP（骨形成因子）は TGF $\beta$  と協調的に作用し心内皮細胞を形質転換した。さらに間葉に発現するホメオボックス遺伝子 Msx1 の研究から、間葉への形質転換には BMP とは別の心筋からの液性因子が必要であることが推測された。そしてその因子は wnt シグナルを活性化することを明らかにしつつある。しかし、これらの成長因子が心内皮細胞にどのような変化をもたらして形質転換を誘導するのかは分かっていない。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、胚心臓に発現する遺伝子の網羅的解析を行い、心内膜床形成領域特異的に発現する遺伝子を同定した。生物検定の結果、転写因子 sox9 は心内皮細胞に形質転換の初期形態（細胞同士の分離、遊走）を誘導した。しかし細胞外基質内部への「浸潤（完全な間葉化）」を誘導することはできなかった。研究代表者はこのことから別の転写因子の存在を予想した。本研究の目的は、心内皮細胞の形質転換過程で「浸潤」を誘導する転写因子を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) sox9 の心内膜床形成過程での発現

心内膜床発生過程での sox9 の発現を明らかにするため、in situ ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法を行った。

(2) 心内膜床での sox9 遺伝子の機能阻害実験

sox9 遺伝子が心内膜床形成に必要な因子なのかどうかを明らかにするため、機能阻害実験を行った。機能阻害には簡便性と有効性から siRNA を使用した。具体的には、心内膜床の器官培養を行い、その培養液中に siRNA を投与した。48 時間培養した後、ゲル内部の間葉の有無で形質転換能を判定した。

(3) 心内膜床領域特異的に発現する転写因子の遺伝子の単離

タンパク質を発現させるため、単離する遺伝子はその全長をクローン化した。マウス胚心内膜床形成領域特異的に発現する転写因子 (slug、sox11、twist、Id、smad6、HeyL、Hand2、GATA4、klf2) のニワトリ相同遺伝子を、PCR 法により単離し、塩基配列を決定後、得られた遺伝子を発現ベクター (pCS2+) に組み込んだ。

(4) 器官培養系を用いた機能の検定

3 で得られた遺伝子の機能を、ニワトリ胚心臓から準備した初代心内皮培養細胞に遺伝子導入して間葉形成能を調べた。具体的には、sox9 が心内皮細胞の遊走を誘導したことをから、3 で得られた遺伝子と sox9 を同時に心内皮細胞に導入し、ゲル内部に浸潤する細胞（完全な間葉）が誘導されるかどうかを調べた。このとき間葉細胞のマーカーである  $\alpha$  平滑筋アクチンの発現も調べた。

(5) 3 で得られた遺伝子の心内膜床形成過程で局在の解析

3 で得られた遺伝子の胚心臓発生過程での局在を免疫組織化学法により調べた。

## 4. 研究成果

(1) 研究の主たる成果

### ① sox9 の心内膜床形成過程での発現

ステージ 14 において、sox9 遺伝子は、流出路の心筋細胞に発現したが房室管領域には検出できなかった。ステ

ージ 16 では、流出路の心筋と房室管の心内皮細胞に発現が見られた。ステージ 18 では、流出路と房室管の心内皮細胞、間葉細胞に発現が見られたが、心筋細胞には見られなかった(図 1)。ステージ 23 では、流出路と房室管の心内皮細胞、間葉細胞により強く発現した。ステージ 27 では、心内膜床の心内皮細胞と間葉細胞に発現した。このとき、房室管の周囲の心外膜にも sox9 の発現が見られた。ステージ 33 では、心内膜床の弁を形成する領域の心内皮細胞と間葉細胞に発現した。

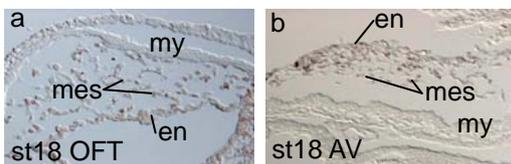


図 1. 房室管での sox9 遺伝子の発現

a. ステージ 18 の流出路 (OFT) b. ステージ 18 の房室管 (AV). 流出路と房室管領域に形成された心内膜床の心内皮細胞と間葉に sox9 の発現は観察された。

AV:房室管、en:心内皮細胞、mes:間葉、my:心筋、OFT:流出路

## ②心内膜床での sox9 遺伝子の機能阻害実験

ニワトリ胚ステージ 13<sup>+</sup>の心臓より房室管を切り出し、コラーゲンゲル上で 48 時間培養した。心筋と心内皮細胞を共培養したときには、ゲル表面の心内皮細胞は紡錘形に突起をのぼし遊走し、またゲル内には浸潤した間葉が観察された。培養液中に sox9 siRNA を投与したとき心内皮細胞の遊走は抑制され、ゲル内に浸潤した細胞も減少した。

## ③心内膜床領域特異的に発現する転写因子の遺伝子の機能検定

心内膜床領域において発現する転写因子

のうち、slug は単独では心内皮細胞に形態変化を誘導しなかった。しかし、sox9 とともに遺伝子導入したところ、コラーゲンゲルに侵入する細胞 (間葉) を誘導した。この細胞には  $\alpha$  平滑筋アクチンの発現が認められた。このことは sox9 と slug が協調的に間葉を誘導できることを示している(表 1)。

表 1. sox9 と slug の心内皮細胞への遺伝子導入による形態変化

	心内皮細胞の遊走	間葉
pCS2(+)	-	-
pCS2(+)/slug	±	-
pCS2(+)/sox9	+++	±
pCS2(+)/slug+pCS2(+)/sox9	+++	+

④slug 遺伝子の心内膜床形成過程での局在  
心内膜床形成が始まるステージ 17 の胚心臓の房室管領域での sox9 と slug の発現を調べた。その結果、sox9 タンパク質は心内皮細胞と間葉に局在した。一方、slug タンパク質も心内皮細胞と間葉に局在した。重ねあわせた画像を作成したところ sox9 と slug は多くの細胞で同時に発現していることが明らかになった。

以上の結果をまとめると、sox9 は心内皮細胞の形質転換の初期過程での遊走を誘導し、slug と協調的に間葉形成を誘導している、と考えられた。

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究において sox9 と slug は心内膜床形成過程で協調的に間葉を誘導している可能性が明らかになった。心内膜床形成に関してマウス胚を使った研究では、胚の微小外科手術が困難なことから、おもに機能阻害実験が行われてきた。心内膜床研究で間葉形成を転写因子で誘導できたのは本研究が初めてである。上皮-間葉形質転換は、個体発生やガ

ン化においても見られる。これらの現象がおこる領域には、心内膜床形成過程と同様に sox9 や slug が発現していることが報告されており、同様の仕組みが働いている可能性がある。実際、神経堤細胞が形成される時に sox9 と slug が協調的に働いていることが示されている。

### (3) 今後の展望

今回の研究により、心内膜床形成過程で sox9 は slug とともに間葉を誘導することが明らかになった。しかしながら形成される間葉の数は生体に比べ少ない。このことはさらに未知の転写因子・機構が働いている可能性がある。今後この点を明らかにしたい。

心内膜床形成でおこる上皮-間葉形成をモデルにその仕組みを明らかにすることで、個体の発生過程や病態で重要な上皮の間葉化の分子機構の解明が可能になると考えている。

## 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 Expression of the Tgfb2 gene during chick embryogenesis. Yamagishi T, Ando K, Nakamura H, Nakajima Y. 査読有 Anat Rec (Hoboken). 2012. 295(2):257-67. doi: 10.1002/ar.22400.

② Yamagishi T, Yanagawa N, Takahashi M, Ando M, Nakamura H, Nakajima Y. Role of sox9 during valvulo-septal endocardial cushion formation. 査読無. J Physiol Sci 2011. 61: S143.

③ Ando K, Nakajima Y, Yamagishi T, Nakamura H. Immunohistochemical studies of aortic smooth muscle cells in quail embryo. 査読無. 2011. J Physiol Sci 61: S144.

[学会発表] (計7件)

① 山岸 敏之, 高橋 真樹子, 柳川 成章, 甲斐 理武, 中島 裕司. 心臓弁・中隔原基である心内膜床形成過程における上皮-間葉形成質転換での sox9 の役割. 第117回日本解剖学会全国学術総会. 2012年3月26日. 山梨大学 甲府.

② Takahashi M, Yanagawa N, Kai M, Yamagishi T, Nakajima Y. Epicardial TGFβ Signal Is Required for Myocardial Maturation Before the Onset of Coronary Circulation. 2011年12月6日. デンバー. アメリカ.

③ 山岸敏之, 中島裕司. 心臓弁・心臓中隔原基形成過程における転写因子 Msx1 の役割. 2011年7月23日. シェーンバッハ砂防. 東京.

④ 山岸敏之, 柳川成章, 高橋真樹子, 安藤克己, 中村裕昭, 中島裕司. 胚心臓における心内膜床形成過程での sox9 の役割. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会全国学術総会 合同大会. 2011年3月28日. 東日本大震災のため誌上開催.

⑤ 安藤克己, 中島裕司, 山岸敏之, 中村裕昭. ウズラ胚の大動脈中膜平滑筋細胞に関する免疫組織化学的研究. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会全国学術総会 合同大会. 2011年3月28日. 東日本大震災のため誌上開催.

⑥ Yanagawa N, Yamagishi T, Nakajima Y. Nodal signal is required for morphogenetic movements of epiblast cells pre-streak

chick blastderm. Society for  
Developmental Biology 69th Annual Meeting.  
2010年8月6日. アルバカーキ. アメリカ.

⑦山岸敏之, 柳川成章, 寺迫優美, 中村裕  
昭, 中島裕司. 心内膜床形成での sox9 の役  
割: 心臓弁・中隔原基形成の分子機構. 第85  
回日本解剖学会 近畿支部学術集会. 2009年  
11月28日. 奈良県立医科大学 奈良.

#### 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

##### (2) 研究分担者

該当者なし

##### (3) 連携研究者

該当者なし