

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570234

研究課題名(和文)両生類胚における血島の分化制御に関する総合的研究

研究課題名(英文)Comprehensive approaches to mechanisms underlying the development of blood islands in amphibian embryo

研究代表者

前野 貢 (Maeno, Mitsugu)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10190315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アフリカツメガエル胚における血島および骨髄球の発生に関するいくつかの新たな知見を得た。第一に、心臓原基に付随して出現する骨髄球の分化制御に働く転写因子Nkx2.5およびGATA4が骨髄球の分化にかかわることを示した。第二に、血管形態形成にかかわる新規分泌因子rdd (repeated D domain-like)の胚体内における分布を明らかにした。第三に、幼生の中腎原基付近に、これまでに報告のない骨髄球のクラスターを発見した。

研究成果の概要(英文)：The present research has attempted to elucidate development of the blood islands and myeloid cells in *Xenopus* embryo. First, we found a physiological role of Nkx2.5 and GATA4, which are the transcription factors for heart specification, are involved in the myeloid cell differentiation in the anterior blood islands. Second, we showed the distribution of Rdd (repeated D domain-like) protein in the developing embryo. Third, we discovered a novel population of myeloid cells in the mesonephric rudiment at an early tadpole stage.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 両生類 骨髄球 中腎 血島 抗体 血管 心臓

1. 研究開始当初の背景

造血は脊椎動物共通の基幹系であり、動物種間でこの発生のしくみを比較すれば、調節系の普遍性や多様性を論ずる良い題材に発展する。ヒトやマウスで見いだされた造血発生のシステムは、胎生であるが故に、複雑に母性因子と胎子因子が影響しあう、また解析方法に限界があるなどの理由で、胚における解析が困難な面がある。一方で、親と独立して発生する両生類アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、胚から成体に至るまで造血のしくみの推移を解明するための理想的なモデル動物である。さらに、ツメガエルは、半世紀以上にわたり、発生学分野で脊椎動物のからだの作り方について、大きな功績を残してきたこと、また脊椎動物のなかでは、ニワトリとともに、最初に胚中の二次造血場所を特定したことなど、初期発生から器官形成の過程を研究するのに最も優れた材料のひとつである。この材料を用いて得られる知見は、逆にヒトを含む哺乳類における血球発生システムの新たな発見につながる可能性がある。一方でツメガエルの血球解析手段はまだ限られている。その理由のひとつは、マウスなどとは異なり、遺伝学的なアプローチに制約があること、そしてもうひとつは、様々な血球系譜細胞の特異的なマーカーの整備が十分になされていないことである。本申請研究は、これらの問題点をどのように克服するかを念頭において、トランスジェニックカエルを利用した実験や新たな造血マーカーの確立を含めて、胚における骨髓球分化のしくみの解明を試みた。

2. 研究の目的

(1) 心臓原基に付随して出現する骨髓球の分化制御に働く転写因子の役割を明らかにする。(2) 新規分泌因子 rdd の生化学的な解析を進め、細胞外での生理学的な役割を明らかにする。(3) 幼生の中腎原基付近に見出した骨髓球のクラスターの胚体内起源を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Nkx2.5 および GATA4 に対するモルフォリノを胚に顕微注入することにより、これらの遺伝子をノックダウンした。また各遺伝子の過剰発現により、骨髓球の分化に最低限必要な転写因子の組み合わせを調査した。
(2) 内在性の Rdd タンパク質を検出する抗 rdd 抗体を作成し、内在性 Rdd の局在を様々な方法を用いて検出した。
(3) 骨髓球特異的なペルオキシダーゼ (Mpo) に対する抗体を作成し、胚および幼生における Mpo 陽性細胞の分布を調べた。また骨髓球クラスターの胚体内起源を明らかにするため、異種間での組織移植および細胞追跡実験をおこなった。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル胚の前方から分化してくる骨髓球の分化制御のしくみを解析した。モルフォリノによる内在性 Nkx2.5 および GATA4 の発現阻害実験から、骨髓球の分化には、心臓原基の形成に重要であることが知られているこれらの転写因子が必要であることが示された。骨髓球の分化に決定的な役割を担っていることがわかっている CEBP α および Nkx2.5、GATA4 はいずれもカノニカル Wnt の阻害因子である dkk1 により誘導されることから、これら複数の転写因子の協調的な働きにより中胚葉の未分化細胞から骨髓球への分化が運命づけられると結論された。

(2) カエル胚において新たに発見された新規分泌因子 Rdd の発現解析を行なった。このタンパク質のアミノ酸配列をもとに合成したペプチドを免疫し、ウサギ抗血清を得た。この抗体は、Rdd3 および Rdd4 を検出したのに対し、Rdd2 を検出しなかった。ウエスタンブロットによると、約 28 kD の内在性のタンパク質がこの抗体により検出された。このタンパク質は、mRNA の発現の上昇に合致して、胚に一過性に発現していた。また、タグ標識したリコンビナント Rdd タンパク質を胚細胞に発現する実験から、Rdd には N-グリカン型糖鎖が結合していること、非還元下では高分子にシフトすること、分泌されたタンパク質は細胞間隙に局在して存在することなどを明らかにした。ホールマウント抗体染色によると、Rdd は血管内皮細胞の分布と一致して局在しており、Rdd が胚における血管形成に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。

(3) ミエロペルオキシダーゼに対する抗体を用いた免疫組織学的な解析により、生後 7 日めの幼生の中腎原基付近 (成体の血球の分化領域) に多数の骨髓球が集積していることが明らかにされた。これらの細胞は、移植実験の結果、腹部血島、背側部中胚葉とは異なり、尾芽に由来することが結論された。

(4) アフリカツメガエル G-CSF (x/G-CSF) の大腸菌発現系およびヒト細胞株発現系を構築した。この組換え G-CSF 存在下で造血器官由来の細胞を培養すると、成熟した好中球が出現することを確認した。成体における x/G-CSF mRNA の発現は、哺乳類と同様にリポ多糖投与による白血球産生刺激によって上昇したことから、造血発生から成体造血の各時期において、白血球産生に参与していることが示唆された。

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 8件)

(1)Nagasawa, K., Meguro, M., Sato, K., Tanizaki, Y., Nogawa-Kosaka, N., Kato, T.: The Influence of artificially introduced N-glycosylation sites on the *in vitro* activity of *Xenopus laevis* erythropoietin. PLoS One. 10(4):e0124676., 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0124676.

eCollection 2015. 査読あり

(2)Tanizaki, Y., Ishida-Iwata, T., Obuchi-Shimoji, M., Kato, T.: Cellular characterization of thrombocytes in *Xenopus laevis* with specific monoclonal antibodies. Exp Hematol. 43(2): 125-136, 2014. doi: 10.1016/j.exphem.2014.10.005. 査読あり

(3)Lim, J. C., Kurihara, S., Tamaki, R., Mashima, Y., Maeno, M.: Expression and localization of Rdd proteins in *Xenopus* embryo. Anat. Cell Biol., 47(1):18-27. 2014. doi: 10.5115/acb.2014.47.1.18. 査読あり

(4)Sakata, H., Maeno, M.: Nkx2.5 is involved in myeloid cell differentiation at anterior ventral blood islands in the *Xenopus* embryo. Dev Growth Differ., 56(8): 544-554, 2014. doi: 10.1111/dgd.12155. 査読あり

(5)Maekawa S., Iemura, H., Kato, T.: Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. J. Exp. Biol. 216 (Pt 15): 901-908, 2013; doi: 10.1242/jeb.076760. 査読あり

(6)Okui, T., Yamamoto, Y., Maekawa, S., Nagasawa, K., Yonezuka, Y., Aizawa, Y., Kato, T.: Quantification and localization of erythropoietin receptor expressing cells in the liver of *Xenopus laevis*. Cell Tissue Res. 353 (1): 153-164, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1624-8. 査読あり

(7)Maeno, M., Komiyama, K., Matsuzaki, Y., Hosoya, J., Kurihara, S., Sakata, H., Izutsu, Y.: Distinct mechanisms control the timing of differentiation of two myeloid populations in *Xenopus* ventral blood islands. Dev. Growth Differ. 54(2): 187-201, 2012. doi: 10.1111./j.1440-169X.2011.01321.x. 査読あり

(8)Maekawa, S., Iemura, H., Kuramochi, Y., Nogawa-Kosaka, N., Nishikawa, H., Okui, T., Aizawa, Y., Kato, T.: Hepatic confinement of newly-produced erythrocytes caused by low-temperature exposure in *Xenopus laevis*. J. Exp. Biol. 215 (Pt 17): 3087-3095, 2012. doi: 10.1242/jeb.072488. 査読あり

〔学会発表〕(計 25件)

(1)平田昭人ほか: アフリカツメガエルエリスロポエチン受容体を認識するモノクローナル抗体による血球細胞のフローサイトメトリ解析. ポスター番号 P-71, 第 67 回日本動物学会関東支部大会, 早稲田大学, 2015 年 3 月 14 日

(2)Takashi Kato et al.: Environmental responses of hematopoiesis in *Xenopus laevis*. Symposium 3 Adaptation, Organizers; Takashi Kato and Yumi Izutsu, Niigata University, Niigata, Japan The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan, Nov. 8, 2014

(3)加藤尚志: 生物の進化と赤血球造血. 教育講演 59, 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場, 2014 年 11 月 2 日 (招聘)

(4)本多岳人ほか: The structure and biological activity of G-CSF in African clawed frogs. ポスター49 造血制御3; ポスター番号 PS-2-3, 第 75 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場, 2014 年 11 月 1 日

(5)野部 遼ほか: ツメガエル骨髓球特異的遺伝子のエンハンサーの同定 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 11 September, 2014.

(6)近藤 匠, 前野 貢: ゼノパス卵母細胞特異的な発現に関わるエンハンサーの解析 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 11 September, 2014.

(7)八木美波ほか: リボ多糖を投与したアフリカツメガエル末梢血球のフローサイトメトリ解析. 口演番号 111715 (形態・細胞, その他), 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月 11 日

(8)細沢咲湖ほか: 変態期におけるツメガエル肝臓の赤血球前駆細胞数の推移. 口演番

号 1H1045 (内分泌), 日本動物学会第 85 回大会, 仙台, 2014 年 9 月 11 日

(9)Yuta Tanizaki et al.: Characterization of immature multipotent progenitors by cell transplantation in frog model. 43rd Annual Scientific Meeting of ISEH-Society for Hematology and Stem Cells. Poster presentation P1156, Exp Hematol 2014; 42 (Suppl 1), page S55, The Hyatt Regency Montréal, Montréal, Canada, Aug 23, 2014

(10)加藤尚志ほか: 造血をツメガエルから俯瞰する: 血球はどこからやってくるのか? . シンポジウム 12 「生物実験材料としてのネッタイツメガエルの長所と有用性」, オーガナイザー: 加藤尚志, 柏木昭彦. 日本動物学会第 84 回大会, 岡山大学, 2013 年 9 月 28 日

(11)近藤 匠, 前野 貢: ゼノパス卵母細胞特異的な発現に関わるエンハンサーの探索 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 26 September, 2013.

(12)イムジョンチャンほか: ゼノパス胚における Rdd 蛋白質の分布から推測される本質的な役割 日本動物学会第 84 回大会, 岡山, 26 September, 2013.

(13)竹島功将ほか: アフリカツメガエルの赤血球膜蛋白質群の同定. ポスター番号 2P-302. 第 86 回 日本生化学会大会, 横浜パシフィコ, 2013 年 9 月 12 日

(14)入江達也ほか: アフリカツメガエル未熟赤血球を認識するモノクローナル抗体の作出. ポスター番号 1P-256. 第 86 回 日本生化学会大会, 横浜パシフィコ, 2013 年 9 月 11 日

(15)Yasutaka Imai et al.: Multiple origins of myeloid cells in *Xenopus* embryo. 日本発生生物学会第 46 回大会, 松江, 28 May, 2013.

(16)Lim Jong-Chan et al.: Characterization of a novel secretory protein in vasculogenesis in frog embryo. The 2nd international Congress on Natural Science. Sun Yat-Sen University, Kaohsiung, Taiwan. 24 October, 2012.

(17) Mitsugu Maeno: Two distinct origins of myeloid cells in early frog embryo. The 2nd international Congress on Natural Science. Sun Yat-Sen University, Kaohsiung, Taiwan. 24 October, 2012.

(18)Yuta Tanizaki et al.: Long-term maintenance of thrombocytic progenitors supported by thrombopoietin alone. Oral Session 50 (OS-2-116); Platelets, Megakaryocytes, Imaging. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第 74 回日本血液学会学術集会), Kyoto, 2012, Oct. 20.

(19)Satoka Kohama et al.: Dynamics of erythropoiesis in *Xenopus* larval liver during metamorphosis. Oral Session 8 (OS-1-42); Erythropoiesis, The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第 74 回日本血液学会学術集会), Kyoto, 2012, Oct. 19.

(20)今井康貴ほか: 抗 mpo 抗体によるアフリカツメガエル骨髄球の検出. 日本動物学会第 83 回大会. 大阪. 2012 年 9 月 15 日, 2012.

(21)加藤尚志: 実験血液学研究における可視化技術の二ーズ. 第 13 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 血液からの創薬を考える, シンポジウム 2 「『眼に見える』分子機能研究へ向けた新展開」, オーガナイザー 船津高志. 加藤尚志, 日本薬学会 生物学系薬学部会, 東京: 日本薬学会長井記念ホール, 2012 年 6 月 16 日

(22)Jong-Chan Lim et al.: Biochemical and functional analyses of rdd, novel secretory proteins, in *Xenopus* embryo. Joint Meeting of JSDB 45th & JSCB 64th, Kobe, 31 May, 2012.

(23)Hiroyuki Sakata et al.: Involvement of Nkx2.5 and GATA4 in the differentiation of anterior VBI-derived myeloid cells in *Xenopus laevis*. Joint Meeting of JSDB 45th & JSCB 64th, Kobe, 31 May, 2012.

(24)加藤尚志: 造血解析モデルにおけるプロテオミクス. 基生研研究所 研究会 「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」, オーガナイザー 上野直人・加藤尚志, 基礎生物学研究所岡崎コンファレンスセンター大会議室, 2012 年 5 月 14, 15 日

(25)加藤 尚志: 造血研究の新展開をめざす ~なぜカエルなの? なんて, もう訊かないで. 日本動物学会 第 64 回関東支部大会公開講演会, 2012 年 3 月 17 日, 東邦大学, 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前野 貢 (MAENO MITSUGU)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：10190315

(2) 研究分担者

加藤 尚志 (KATO TAKASHI)
早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授
研究者番号：80350388
(H25 H26：連携研究者)

(3) 連携研究者

熊野 岳 (KUMANO GAKU)
東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：80372605