

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570238

研究課題名(和文)細胞外因子によって作られるBMPシグナル勾配形成機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms to establish the gradient of BMP signal by extracellular factors

研究代表者

福田 公子(FUKUDA, KIMIKO)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：40285094

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)：前腸内胚葉からは多くの消化器官が発生するが、そのうち肺、胃、肝臓に分化する内胚葉は前腸腹側正中で前後に並ぶ。前腸内胚葉ではBMPシグナルが肺領域で高く、胃領域で低く、肝臓領域で最も高いこと、BMPアンタゴニストsizzledが胃領域でBMPシグナルを低くすることを明らかにした。また、肝臓領域で発現するAPOA1が肝臓マーカーの誘導に関わること、APOA1は細胞自立的にBMPシグナルを上昇させることがわかった。APOA1はBMPに誘導されるので、APOA1とBMPシグナルはポジティブフィードバックでBMPを上昇させ、肝臓領域に確立に働くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Presumptive lung, stomach and liver endoderm are regionalized in the ventral foregut antero-posteriorly. There are reports showing BMP signals are important for their specification, while mechanisms of regulation of BMP signaling in the foregut endoderm is largely unknown. We found that BMP signaling activity in the foregut endoderm has two peaks, at the lung and the liver endoderm. It is revealed that sizzled inhibits BMP signaling in the stomach region, promotes stomach differentiation and restricts liver regionalization at the caudal-most endoderm in the foregut. APOA1, a member of the apolipoproteins, was expressed in the presumptive liver endoderm. We showed that APOA1 was essential to induce Hex, liver maker, in the liver endoderm and that APOA1 could enhance BMP signaling cell-autonomously. APOA1 was induced by BMP signaling. Taken together, positive feedback between APOA1 and BMP signaling enhances BMP signaling which is required for the liver differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：内胚葉 消化管 肝臓 胃 BMPシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

消化管は口と肛門を結ぶ一本の管だが、前後軸に沿って機能の異なるいくつもの消化器官、付属腺がつながっている。これらの器官や腺がどのようにして正しい位置に分化するのは未だに分かっていないことが多い。有羊膜類胚の消化管は、原腸陥入で成立した腹側にシート状に広がる内胚葉が前方で折れ曲がり、袋状の前腸という構造を作る所からスタートする。前腸は後方に伸長し、最終的には咽頭、食道、胃、さらに肝臓や膵臓が生じる。つづいてできる後方の袋状構造である後腸からは小腸、大腸が分化する。それぞれの器官の内胚葉は、器官形成の遙か前の st.5 (孵卵 24 時間胚) -st.10 (孵卵 40 時間胚) までに分化が決定 (領域化) されるとされており、同じ時期にそれぞれの領域では特異的な転写因子を発現する。

これらの領域化がどのようなしくみで起こるかは、後腸での仕事が行先している。後腸後端にちかい胚後方では、FGF や wnt などが発現していることが分かっており、これらのシグナル分子はまだ平面的な予定後腸内胚葉で、後方に強く、前方に弱いという勾配を持って分布していると言われており、この勾配が小腸 / 大腸の分化を決定していることが報告されている。一方前腸は既に管になっており、後腸と比べて狭い領域にも関わらず、多くの領域が分化するが、その詳細は調べられていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、前腸内での領域化機構を明らかにすることを目的とした。とくに前腸腹側正中に注目した。前腸腹側正中内胚葉は、前方から肺、胃、肝臓の順で並んで領域化され、それぞれ領域特異的転写因子である Nkx2.5, Sox2, Hex が発現する。既にこれらの転写因子の発現には BMP シグナルが関わっていることが知られている。これまでの報告によると BMP シグナルは Nkx2.5 および Hex の発現を誘導し、Sox2 の発現を阻害することが知られている。しかしこのように隣り合う狭い領域で BMP シグナルがどのように調節されて正しく領域化が進むのかに関しては全く知見がないため、前腸腹側正中内胚葉における BMP シグナル調節機構を明らかにした。

## 3. 研究の方法

### (1) BMP シグナル強度の測定

BMP シグナルを受容した細胞では細胞内因子である smad1/5/8 がリン酸化され、それが核内に運ばれ、BMP 反応配列 (BRE) に結合して下流遺伝子の転写活性を上げる。そこで、BMP シグナルの強度は、抗リン酸化 smad1/5/8 を用いて細胞の核内のリン酸化 smad の濃度を測定するか、BRE にレポーター遺伝子を結合したコンストラクトを導入してレポーター遺伝子の発現量を測定した。

### (2) 胚への遺伝子導入

ニワトリ卵を約 1 日孵卵し、ステージ 5 胚を得た。卵殻の一部に穴をあけて胚を露出させ、胚下腔に DNA または siRNA を注入し、胚の背側に陽電極、卵黄内に陰電極を置き、電流を流すことで内胚葉のみに遺伝子を導入した。この頃の内胚葉運命地図は存在しているので、内胚葉の任意の場所へ遺伝子導入できる。DNA や RNA を導入した胚は、卵殻の穴をふさいでそのまま孵卵し、必要なステージまで発生させた。

(3) 遺伝子の発現は in situ hybridization 法で検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 前腸内胚葉における BMP シグナル強度の測定

研究の目的で書いたように BMP シグナルは前方で分化する肺領域マーカーを誘導し、そのすぐ後方の胃領域マーカーを阻害、さらに後の肝臓領域マーカーを誘導する。このしくみを探るためにはまず、前腸内胚葉における BMP シグナル強度を測定する必要がある。リン酸化 Smad1,5,8 に対する抗体を用い、矢状切片を作成して内胚葉細胞の BMP シグナル量を定量した。すると、BMP シグナルは最も後方の肝臓領域で最も高く、胃域では低く、肺領域で少し高く、肺域より前方では低かった。

次に、BMP シグナル関連因子の局在を調べた。BMP リガンド mRNA は前腸後方に強く、前方に弱い勾配を持っており、受容体は前腸全体に分布していた。BMP リガンドは種々の細胞外因子によってシグナルの修飾を受けることが分かっているので、BMP アンタゴニストの chordin, chordin を阻害する tolloid の mRNA 局在を調べたところ、chordin は前腸の背側にある脊索で、後方に強く前方に弱く発現していた。また tolloid は前腸内胚葉で後方に強く、前方に弱い発現をしていた。

これらの発現パターンからは前腸内胚葉の BMP シグナルは前方に弱く、後方で強い勾配になるはずだが、実際は前方で強く、中程で弱く、最後方で非常に強かった。このシグナルパターンを作るには、さらに別の因子の関与が考えられた。

### (2) 胃領域で BMP シグナルを弱めるのは sizzled である。

BMP シグナルの細胞外因子の一つに sizzled がある。sizzled は tolloid の活性を抑えることで chordin の安定化に関わり、結果的に BMP シグナルのアンタゴニストとして働く。sizzled は前腸では肺領域内胚葉に発現すること分かったので、sizzled が前腸内胚葉分化に及ぼす作用を解析した。

まず、siRNA を用いて sizzled をノックダウンすると肝臓マーカー Hex の発現が前方へ伸長し、胃で発現する Sox2 が抑えられた。この作用はマウス BMP4 を前腸内胚葉で強制発現したときの表現形と同様だった。

次に, sizzled を前腸全体に強制発現すると, Hex の発現がなくなり, Sox2 が肝臓まで発現した. この表現形は前腸内胚葉に chordin を強制発現した胚と同様だった.

以上の結果から, 以下のようなモデルを立てた. 肝臓領域の分化には BMP シグナルと心臓からのシグナル(マウスでは FGF シグナル)が必要とされている. sizzled をノックダウンした胚では肝臓領域が心臓の前端まで伸びて来ることから, 肝臓領域分化のポテンシャルは心臓前端から前腸後端までの全ての腹側正中内胚葉が持っていることが考えられる. ここで肺領域に sizzled が発現すると, すぐ後方である胃領域では sizzled によって脊索からの chordin が安定化し, BMP シグナルが抑えられる. すると, その部分は sox2 を発現し, 胃領域に分化する. 同時に, 肝臓領域は前腸後方に限局される. これにより, (1)で調べた BMP シグナルのうち胃域で BMP シグナルが低くなるのは肺領域で BMP アンタゴニストである sizzled が発現するためであるということが示唆された.

しかし, BMP アンタゴニストが発現する肺領域で BMP シグナルが高いという矛盾がある. 実験的に sizzled の発現を変化させても肺領域での BMP シグナル, マーカー遺伝子の発現は変化しない. BMP リガンドや dnBMP 受容体を強制発現すると変化があるが, chordin では変化がないので, これまでの予想とは違う因子が関わっている可能性が高い,

(3) 肝臓領域で脂質代謝因子 APOA1 が BMP シグナルを強めている.

次に, 肝臓領域の BMP シグナルに注目した. 肝臓領域マーカーの Hex は前腸形成初期には前腸腹側内胚葉全体で発現している. しかしステージ9の胚あたりで前腸門付近, つまり前腸の最も後方の内胚葉のみで強く発現し, 維持される. ちょうどこのころ前腸門付近で発現する APOA1 を単離した APOA1 は HDL (高比重リポタンパク質) の主要な構成タンパク質で, 成体では腸や肝臓で発現し, 末梢組織の余剰コレステロールなどを肝臓へ逆輸送することが知られているが, 発生時の機能の報告はない. 先行研究で我々は APOA1 を前腸内胚葉に強制発現すると異所的に肝臓マーカーが誘導されることを得た. そこで, APOA1 の前腸における機能を解析した.

APOA1 を前腸全体に強制発現すると, Hex 発現域が前方へ拡大し, その前端は心臓前端部に達した. 次に siRNA を用いて APOA1 をノックダウンすると Hex の発現が低下したことから, APOA1 は Hex 発現に必須であると考えられる.

しかし, 脂質代謝に関わる因子がどのようにして Hex の誘導に関わるのかは明らかでない. Hex の発現は BMP シグナルを活性化すると誘導される (Zhang *et al.*, 2004) こと, APOA1 過剰発現マウスの動脈では BMP シグナル受容体の発現が上昇する (Yao *et al.*,

2008) ことから, APOA1 が BMP シグナルと関連して, Hex の誘導に関わっているのではないかと仮定した. そこで, マウス BMP4 と APOA1 を同時に強制発現すると, それぞれ単独で強制発現したときに比べ, Hex の誘導効率が高くなり, 誘導される場所も広がった.

このことから, APOA1 が BMP シグナルを強め, その結果, hex 遺伝子が誘導されるのではないかと考えた. これを証明するため, Hela 細胞を用いて実験を行なった.

まず, BMP 応答性のルシフェラーゼレポーターを HeLa 細胞に導入し, APOA1 によって BMP シグナルの上昇が見られるか, ルシフェラーゼアッセイで解析した. BMP リガンドと APOA1 を同時に強制発現させた細胞では, BMP リガンドのみを発現させた細胞に比べてレポーター活性が約 1.5 倍上昇した. また APOA1 とレポーターをそれぞれ別の細胞に導入した場合には BMP シグナルが増強されなかったことから, APOA1 の機能は細胞自律的であると考えられる. 以上の結果から, APOA1 は細胞自律的に BMP シグナルを増強することが分かった.

次にアフリカツメガエル用いて同様な結果が出るかを確認した. アフリカツメガエル胚にニワトリ APOA1 を顕微注入し, BMP4 や BMP 依存性レポーター遺伝子を同時に注入する事で, BMP シグナルへの影響を見た. APOA1 と BMP 依存的レポーター遺伝子と同じ割球に注入した場合には, BMP によるレポーター遺伝子の活性を上昇させるが, 違う割球に注入した場合には, レポーター遺伝子の活性をあげない事がわかった. このことから, APOA1 は細胞自律的または, 非常に近隣の細胞に働きかけ, BMP シグナルを上昇させる事が示唆された.

Hela 細胞においては, BMP4 発現プラスミドの導入量が多いと APOA1 による BMP シグナル増強は見られなくなる事から, このシグナル増強は微弱であると考えられた. また, APOA1 を導入すると, Hela 細胞の増殖が 1.5 倍になる事から, APOA1 は他の増殖因子シグナルにも関わる可能性がある.

さらに, APOA1 と BMP シグナルの関係を調べた. BMP4 を前腸内胚葉で強制発現すると APOA1 の発現が前方へと広がった. また BMP シグナルを抑えると APOA1 の発現が消えることも分かった. このことから APOA1 は BMP シグナルによって誘導され, 誘導された細胞で BMP シグナルを強化するというポジティブフィードバック効果があることが分かった. このことで肝臓領域の BMP シグナルが強くなるものと考えられる.

(4) 胚内の BMP シグナルのライブ観察法の確立

これまでの研究で BMP シグナル様々な因

子により、局所的かつ複雑にコントロールされていることが分かったが、前腸形成時には細胞運動や分裂が盛んなので、最終的にある領域に分化するのに必要なシグナルを特定するには、その細胞が前腸形成時にいつ、どのくらいの BMP シグナルを受け取って来たのか、その履歴を明らかにする必要がある。

この目的の為に、BMP シグナルに注目し、胚内でそのシグナル強度をライブで観察できる実験系を確立した。

BMP シグナルに応答した遺伝子発現に重要な BRE 配列にレポーターとしてエメラルドルシフェラーゼを連結したコンストラクトを作成し、初期胚の胚盤葉上層に導入した。内部標準として CMV プロモーターの下流に EGFP を繋げたコンストラクトを胚に共導入し、培養後、胚にルシフェリンを添加し、EM CCD カメラでルシフェラーゼ発光および EGFP 蛍光を検出した。pSMAD 抗体染色で観察された BMP シグナルの強さと、発光による強度は、胚の中心部では一致した。また、胚の発光、蛍光は時間を追って何度も測定することができた。さらに、細胞標識を組み合わせ、標的にした細胞における BMP シグナル強度を追跡することも可能であることが示された。

#### (5) まとめ

本研究により、前腸における BMP シグナルは、全体としては後方に強く、前方に弱いパターンを示すが、前腸前方に発現する sizzled によって、胃域での BMP シグナルが抑えられること。肝臓域に発現する APOA1 によって BMP シグナルが強化されることが分かった。このように局所的な因子によって、BMP シグナルは単純な勾配から複雑になり、それぞれの内胚葉領域の分化に関与すると考えられる。

#### 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 1 件)

Nagai, H., Sezaki, M., Bertocchini, F., Fukuda, K. and Sheng, G. (2014) HINTW, a W-Chromosome HINT gene in chick, is expressed ubiquitously and is a robust female cell marker applicable in intraspecific chimera studies. *Genesis* 52,424-430.

[学会発表](計 12 件)

- 1, 福田公子 前腸の領域化～胃、肝臓領域化と BMP シグナル調節 第 20 回 Hindgut Club Japan シンポジウム. 東京 2014 年 12 月 6 日
- 2, 志村智、福田公子 Apolipoprotein A-I regulates BMP signaling during the liver regionalization in the foregut. 首都大バイオ

コンファレンス 2014, 東京 . 2014 年 11 月 7 日

- 3, 志村智、福田公子 Apolipoprotein A-I is involved in the liver regionalization via control BMP signaling. TMU-UOS 生命科学研究発表会, 東京 . 2014 年 10 月 24 日
- 4, Shimura, S., Kawahara, H. and Fukuda, K. Apolipoprotein A-I enhances BMP signaling and induces liver regionalization during early development. The 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Nagoya. 2014 年 4 月 27-29 日
- 5, 志村智、福田公子 Apolipoprotein A-I は BMP シグナルの調節を介して肝臓の領域化に働く, 首都大バイオコンファレンス 2013, 東京. 2013 年 11 月 8 日
- 6, 志村智、福田公子 Apolipoprotein A-I is involved in the liver regionalization via control of BMP signaling. TMU-UOS 生命科学研究発表会, 東京 . 2013 年 10 月 25 日
- 7, 栗下大三、渡辺健太、福田公子 胃・十二指腸の境界形成において一時的に形成される曖昧な境界. 首都大バイオコンファレンス 2012, 東京. 2012 年 11 月 28 日
- 8, Fukuda, K. Regional control of BMP signal creates different primordia in the ventral midline of the foregut. Chick 7: Avian Model Systems, 7th International Chick Meeting, Nagoya, Japan. 2012 年 11 月 16 日
- 9, Goto, Y., Shimura, S., Takemasa, T. and Fukuda, K. Apolipoprotein A-I is involved in the liver regionalization via control of BMP signaling. Chick 7: Avian Model Systems, 7th International Chick Meeting, Nagoya, Japan. 2012 年 11 月 15-17 日
- 10, Okayama, Y., Kimura, W., Yasugi, Y. and Fukuda, K. BMP signaling activity controlled by anterior expressed extracellular modifier, sizzled is essential for the specification of the liver and stomach endoderm in the chicken embryo. Chick 7: Avian Model Systems, 7th International Chick Meeting, Nagoya, Japan. 2012 年 11 月 15-17 日
- 11, Kurishita, D, Watanabe, K. and Fukuda, K. The expression pattern of Sox2 and CdxA at the murky pre-boundary region between the stomach and intestine. Chick 7: Avian Model Systems, 7th International Chick Meeting, Nagoya, Japan. 2012 年 11 月 15-17 日
- 12, Okayama, Y., Kimura, W., Yasugi, Y. and Fukuda, K. Modification of BMP signaling by extracellular molecules is essential for the

specification of the foregut endoderm in the chicken embryo. BSCD/BSDB/JSDB joint spring meeting 2012, Warwick, U.K. 2012年4月16-18日

〔図書〕(計 2件)

- 1, 福田公子, メディカルサイエンスインターナショナル社, ウォルパート発生生物学(武田洋幸, 田村宏治編)第11章器官形成(翻訳), 2012, p431-488.
- 2, 福田公子, 西村書店, ラーセン人体発生学(仲村春和, 大谷浩編)第14章消化管の発生(翻訳), 2013, p365-402.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

福田 公子 (FUKUDA, Kimiko)

首都大学東京・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