

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：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590238

研究課題名(和文) 胚心臓の心内膜床形成過程でおこる上皮-間葉形質転換での分泌因子 Rspo3 の役割

研究課題名(英文) Roles of Rspo3 during cushion tissue formation in the chick embryonic heart

研究代表者

山岸 敏之 (Yamagishi, Toshiyuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60255122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：心臓発生過程で発現する液性因子Rspo3の解析を試みた。ニワトリRspo3遺伝子を単離し局在を調べたところ、Rspo3は胚心臓の心内膜床に発現した。Rspo3の機能を明らかにするため、心内膜床の生物検定で、Rspo3単独、Rspo3とBMP2、Rspo3とBMP2とwnt11の組み合わせで培養心内皮細胞に作用させたが、間葉分化を誘導しなかった。一方、Rspo3のファミリーであるRspo1、-2、-4も単離し、心臓発生過程での発現局在を調べた。その結果、Rspo2は心臓全体に発現していたが、Rspo1、-4は心内膜床形成期の心臓には見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Role of Rspo3 was examined in the endothelial-mesenchymal transformation (EMT) during cushion tissue formation using chick embryonic hearts. First, in situ hybridization showed Rspo3 mRNA was localized during the cushion tissue. Second, in vitro assay for cushion tissue formation showed that the administration of Rspo3, Rspo3+BMP2, and Rspo3+BMP2+wnt11 did not induce cell migration and invasion. Third, chick Rspo1, -2 and -4, genes were cloned and their expression patterns were examined during heart development. These results show that Rspo2 mRNA was expressed in the embryonic heart, but Rspo1 and 4 were not detected.

研究分野：発生学

キーワード：心臓 心内膜床

1. 研究開始当初の背景

心内膜床は房室管 (atrioventricular canal、心房と心室の間) および流出路 (outflow tract) 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 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 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 とは別の液性因子が必要であることが予想された。

2. 研究の目的

研究代表者は、マウス胚心臓に発現する遺伝子の網羅的解析から、心内膜床形成領域特異的に発現する遺伝子を明らかにした。その一つとして roof plate specific spondin 3 (*R-spondin3*, *Rspo3*) を同定した。*Rspo3* は *Rspo* ファミリーに属する分泌分子であり、*wnt* シグナルに関係していることが明らかされつつある。本研究の目標は、心内膜床形成過程で起こる心内皮細胞の間葉への形質転換での *Rspo3* の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ *Rspo3* 遺伝子の単離

ニワトリ *Rspo3* 遺伝子の全アミノ酸をコードする領域のクローン化を行った。単離には PCR 法を用い、塩基配列を決定した。

得られた遺伝子を発現ベクター (pCS2+) に組み込んだ。

(2) *Rspo3* のニワトリ胚心臓発生過程での発現様式の検討

Rspo3 遺伝子を用いて、胚心臓発生過程での遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により明らかにした。

(3) 器官培養系を用いた *Rspo3* の生理活性の検定

ニワトリ胚心臓から切り出した房室管領域の心内皮細胞をコラーゲンゲル上に準備し、*Rspo3*、*Rspo3*+BMP2、*Rspo3*+BMP2+*wnt11* のタンパク質を培養系に加え、24-48 時間培養し、細胞の変化を形態学的に観察した。

(4) ニワトリ *Rspo* ファミリー遺伝子の単離

ニワトリ *Rspo1*、-2、-4 遺伝子の全アミノ酸をコードする領域を PCR 法によりクローン化し、塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚心臓発生過程での *Rspo3* の局在

Rspo3 遺伝子のニワトリ胚心臓での発現の詳細を明らかにするため *in situ* ハイブリダ

イゼーションをおこなった。その結果、ステージ (stage: st) 14 では房室管から心房にかけての心筋層に弱い発現が見られた (図 1 A, B の矢じり)。この時期、尾側の中胚葉にも *Rspo3* の発現が見られた (図 1 A)。ニワトリ胚では st16-17 の時期に、流出路と房室管で心内膜床形成が始まる。*Rspo3* は st18 の心内膜床に検出できたが、心筋層には検出できなかった (図 1 C, D の矢じり)。またこの時期、心外膜原基と咽頭弓の上皮にも強い発現が見られた。st23 になると心内膜床は発達するが、それに伴い *Rspo3* の発現も強くなった (図 1 E, F の矢じり)。また、*Rspo3* mRNA は流出路の心内膜床にも観察できた (図 1 F の ot)。心外膜原基の *Rspo3* の発現も引き続き見られた (図 1 F の矢印)。心臓以外では神経管の roof plate に、また肢芽 (limb bud) の AER (apical ectodermal ridge) に強い発現が認められた。心内膜床の *Rspo3* の発現は、発生が進んだ st26 になっても観察できた (図 1 G, H の矢じり)。ニワトリ *Rspo3* は、マウス胚とは異なり心内膜床形成領域の心筋層特異的な発現は見られなかった。このことは、*Rspo3* はニワトリ胚においては、心筋細胞からの心内皮細胞形質転換誘導シグナルとし

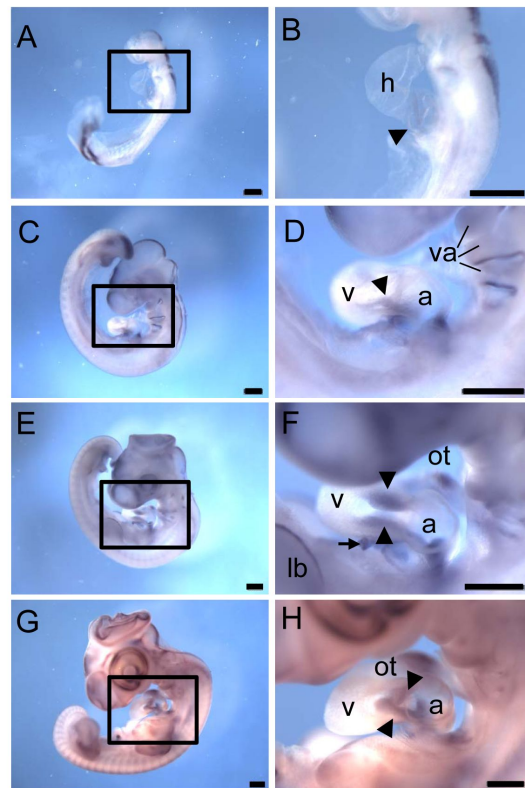


図 1 ニワトリ胚心臓発生過程での *Rspo3* 遺伝子の発現

(A, B) st14, B は A の拡大。(C, D) st18, D は C の拡大。(E, F) st23, F は E の拡大。(G, H) st26, H は G の拡大。
a, atrium; h, heart; lb, limb bud; ot, outflow tract; v, ventricle; va, visceral arches.スケールバー=500 μm

て作用している可能性は低いことを予想させた。

(2) Rspo3 の心膜床形成での機能検定

Rspo3 の上皮-間葉形質転換能検定

組み換えタンパク質の Rspo3 を使い、心内膜床の生物検定で Rspo3 の機能活性の検討を行った。心内膜床形成前の胚心臓から房室管領域を切り出し、心内皮細胞と心筋細胞とともにコラーゲンゲル上で 24-48 時間培養すると、心内皮細胞はゲル上を遊走、またゲル内に浸潤し間葉に分化する(図 2 A,B の矢じり)。一方、心筋細胞を除去し、心内皮細胞だけを培養した場合、心内皮細胞の上皮-間葉形質転換は起こらない(図 2 C,D)。そこで、ゲル上に準備した心内皮細胞に対し、培養液に Rspo3 タンパク質を加え培養した。しかし、心内皮細胞の遊走やゲル内へ侵入する細胞は観察できなかった(図 2 E,F)。

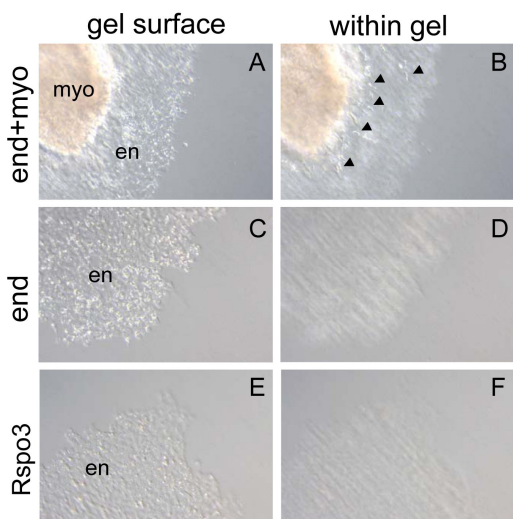


図 2 Rspo3 の心内膜床検定
end(en), endocardium; myo, myocardium

Rspo3 と BMP2、wnt11 との上皮-間葉形質転換能検定

Rspo3 単独では心内皮細胞に対して間葉形成を誘導しなかったことから、Rspo3 タンパク質とともに働く液性分子が存在するかどうか調べた。既知の誘導因子である BMP2 (BMP2 単独では誘導活性がない。図 3 A,B) と同時投与を試みたが、心内皮細胞に形態変化を誘導することはできなかった。Rspo3 が wnt シグナルに関係することから、心内膜床形成領域に発現するがその機能がよく分かっていない wnt11 を Rspo3 とともに培養心内皮細胞に作用させたが、間葉への分化を誘導しなかった。さらに、Rspo3、BMP2、wnt11 を同時に作用させてみたが、心内皮細胞の間葉分化を誘導することはできなかった(図 3 E,F)。

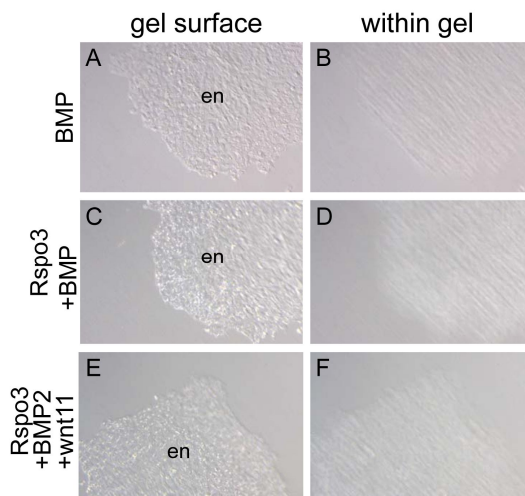


図 3 Rspo3 と既知液性因子の協調作用
en, endocardium; my, myocardium

(3) Rspo1、-2、-4 のニワトリ胚発生過程での局在

Rspo3 以外の Rspo ファミリーメンバーである Rspo1、-2、-4 についてもクローニングし、心臓発生過程での mRNA の発現局在を調べた。Rspo1 は、st18 で終脳と神経管の roof plate に、st23 では眼胞にも発現が見られた。しかし、心臓領域での発現は見られなかった。Rspo2 は st18 では胚全体に発現が観察できたが、特に終脳と神経管の roof plate に強く発現した。心臓においては全体(心筋層を含む)に発現が観察できた。st23 になると終脳と神経管の roof plate に加え、枝芽の中胚葉にも発現していた。Rspo4 は st18-23 を通して、神経管の roof plate と眼胞に発現が見られたが、ニワトリ胚ではマウス胚とは異なり心臓領域での発現は観察できなかった。

(4) 今後の展望

本研究において Rspo3 の心臓での発現はニワトリ胚とマウス胚では異なるが、心膜床形成領域に発現することが示された。しかしながら、Rspo3 単独で、また心筋からの既知誘導分子である BMP2 と協調的に心内皮細胞の形質転換に関与する可能性は低い。心内皮細胞の形質転換にかかわる液性因子には BMP2 以外にも存在し、中でも TGF は心内皮細胞に局在し、自己分泌的に心内皮細胞の形質転換に作用することが示されている。今後、このような心内皮細胞から分泌される液性因子との協調作用について明らかにしたい。また、Rspo2 がニワトリ胚では心臓全体に発現していたことから、Rspo2 の心内皮細胞の形質転換能についても調べたい。さらに Rspo は 2 量体で作用する可能性が示唆されている。他の成長因子ではヘテロダイマーになると活性が増加することが報告されているこ

とから、Rspo2 と Rspo3 のヘテロダイマーの可能性についても検討したい。上皮-間葉形質転換は発生過程だけでなく、がんなどの病態にも関係している生命現象である。心内膜床形成をモデルに、この現象にかかわる分子を解きほぐしていくことで、発生の仕組みだけでなく、病態解明の手掛かりも得ることができると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takahashi M, Yamagishi T, Narematsum M, Kamimura T, Kai M, Nakajima Y
Epicardium is required for sarcomeric maturation and cardiomyocyte growth in the ventricular compact layer mediated by transforming growth factor and fibroblast growth factor before the onset of coronary circulation. *Congenit Anom (Kyoto)*. 査読有. 2014. 54:162-171. doi: 10.1111/cga.12048.

〔学会発表〕(計 12 件)

Ando Katsumi, Yamagishi Toshiyuki, Nakajima Yuji
Immunohistochemical observation of the aorta and heart outflow tract during the initial formation of proximal coronary arteries. 解剖・生理解剖学会 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 第 92 回 日本生理学会大会 2015 年 3 月 21 日(土) ~ 23 日(月) 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

上村竜也、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司
心臓冠状血管内皮細胞の起源について：鳥類胚を用いた検討 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 2014 年 3 月 27 日 ~ 29 日 自治医科大学キャンパス(栃木県・下野市)

山岸敏之、山本崇之、北条未佳、上村竜也、甲斐理武、中島裕司
ニワトリ胚心外膜発生過程におけるカドヘリン 11 の局在 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 2014 年 3 月 27 日 ~ 29 日 自治医科大学キャンパス(栃木県・下野市)

上村竜也、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司
心臓冠状血管内皮細胞の起源について：鳥類胚を用いた検討 日本解剖学会第 89 回近畿支部学術集会 2013 年 11 月 30 日 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)

高橋真樹子、山岸敏之、馴松麻悠、上村竜也、甲斐理武、中島裕司
冠状血管形成前の心室緻密層の成長は TGF と FGF により促進される 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 ~ 23 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

高橋真樹子、寺迫優美、柳川成章、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司
特定の咽頭弓の心臓形成領域の発生異常が特定の円錐動脈幹奇形を起こす可能性 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 ~ 23 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

安藤克己、山岸敏之、中島裕司
ウズラ胚における上行大動脈壁の成熟と冠状動脈形の形成に関する免疫組織化学的研究 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 ~ 23 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

山岸敏之、甲斐理武、中島裕司
心臓弁・中隔原基である心内膜床での sox9 と slug の協調作用 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 ~ 23 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

高橋真樹子、寺迫優美、柳川成章、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司
蛍光色素標識法による咽頭弓心臓領域の予定運命解析 第 118 回日本解剖学会学術集会 2013 年 3 月 28 日 ~ 30 日 かがわ国際会議場(香川県・高松市)

安藤克己、山岸敏之、中島裕司
ウズラ胚の大動脈平滑筋組織の成熟に関する免疫組織化学的研究 第 118 回日本解剖学会学術集会 2013 年 3 月 28 日 ~ 30 日 かがわ国際会議場(香川県・高松市)

Takahashi M, Tersako Y, Yanagawa N, Kai M, Yamagishi T, Nakajima Y.
Myocardial progenitors in the pharyngeal regions migrate to distinct conotruncal region. *Society for Developmental Biology 71st Annual Meeting*. July 19-23, 2012, Montreal (Canada)

Takahashi M, Yanagawa N, Kai M, Yamagishi T, Nakajima Y.
Epicardial growth factors are required for myocardial maturation before the onset of coronary circulation. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会 2012 年 5 月 28 ~ 31 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 敏之 (YAMAGISHI, Toshiyuki)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：60255122