

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440117

研究課題名(和文)ヒメイカを用いた心臓予定領域決定機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of cardiac field development in a model squid, *Idiosepius paradoxus*

研究代表者

小柴 和子 (Koshiha-Takeuchi, Kazuko)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30467005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟体動物頭足類は心臓を3個有している。1個は体心臓と呼ばれ、血液を全身に循環させる機能を担っており、脊椎動物の心臓と同様の役割を果たしている。他の2個は鰓心臓と呼ばれ、鰓に血液を送ることに特化した心臓である。このように特殊な心循環器系を有している頭足類において、体心臓、鰓心臓がどのように発生してくるのか、そのメカニズムは全く明らかにされていない。本研究では世界最小のイカであるヒメイカを用いて鰓心臓、体心臓の発生過程を調べた。脊椎動物の心臓特異的転写因子をヒメイカから単離し、発現様式を詳細に解析したところ、体心臓と鰓心臓は共通の心臓予定領域から発生してくる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cephalopod has three hearts; one is a systemic heart and others are branchial hearts. The systemic heart has a role to circulate blood flow to the entire body, while the branchial heart is an organ to send the blood specifically to the branchial. Although a unique circulation system of cephalopod is well known, the developmental process of these hearts in the cephalopod embryo is still unclear. In this study, the squid homologues to cardiac specific transcription factor genes in vertebrate were isolated to examine the expression patterns in heart development by using *Idiosepius paradoxus* embryos. The cardiac transcription factor genes were specifically expressed in the presumptive cardiac region in squid embryo suggesting that both systemic and branchial hearts would be derived from the same cardiac field.

研究分野：発生生物学

キーワード：頭足類 心臓 発生 形態進化

### 1. 研究開始当初の背景

心臓の形は動物によって様々であるが、軟体動物頭足類は異なった役割を持つ2種類の心臓を有するという点で非常に特徴的である。頭足類の2種類の心臓は体心臓、鰓心臓と呼ばれ、共に血液を送るポンプとして機能しているが、体心臓は我々ヒトの心臓と同様に、全身に血液を送る役割を担っており、鰓心臓は鰓に血液を送る役割を担っている。哺乳類の二心房二心室の心臓では、左心室から排出される血液は大動脈を通過して全身を巡り、右心室から排出される血液は肺動脈を通過して肺へと流れている。このような血液循環の方向性から考えると、頭足類の本心臓は左心室と、鰓心臓は右心室と相同の機能を担っているように見える。マウスを用いた細胞系譜追跡実験では、左心室形成に寄与する細胞集団(第一心臓予定領域)と、右心室形成に寄与する細胞集団(第二心臓予定領域)は異なっていることが報告されており、頭足類の2種類の心臓がどのような心臓予定領域から派生してくるかを明らかにすることは無脊椎動物から脊椎動物にわたる共通の心臓発生メカニズムの存在の有無という進化発生学的に非常に興味深い問題の解明につながる。

### 2. 研究の目的

頭足類は体心臓と鰓心臓という2種類の心臓を有し、高度に発達した循環器系を有するが、頭足類の心臓発生に関する研究はほとんど行われておらず、頭足類の心臓予定領域がどのように形成され、体心臓、鰓心臓が発生してくるか全く分かっていない。そこで実験室での飼育・産卵が可能であるヒメイカ (*Idiosepius paradoxus*) を用いて頭足類の心臓発生メカニズムを明らかにすることを考えた。

本研究では、ヒメイカの発生初期から心臓領域に発現する因子を同定し、この初期心臓マーカーの発現解析と初期心臓マーカー陽性領域が心臓形成にどのように寄与しているかを調べることにより、ヒメイカの心臓予定領域について検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

哺乳類の心臓発生初期に発現している遺伝子の相同遺伝子をヒメイカからクローニングし、ヒメイカの発生過程を追って、詳細に観察する。体心臓、鰓心臓が形成される過程を、切片を作製して詳細に観察するとともに、それぞれの心臓を認識する抗体を作製し、そ

れらの発現と比較しながら遺伝子の発現解析を行う。ヒメイカ初期胚における心臓マーカー遺伝子の発現が確認できたところで、その陽性領域が実際に心臓形成に寄与している心臓予定領域であるか調べる。

蛍光色素を用いて生体に標識し、標識された細胞の移動を観察することにより細胞系譜追跡実験を行う。心臓マーカーを発現していた細胞が体心臓に存在するか鰓心臓に存在するか調べることにより、心臓予定領域からの体心臓、鰓心臓の形成過程を明らかにする。ここで得られた結果を脊椎動物の心臓発生様式と比較することにより、頭足類の心臓発生について考察する。

### 4. 研究成果

脊椎動物の初期心臓マーカー遺伝子のホモログをヒメイカから単離し、発現を調べたところ、*Nkx2-5*、*Tbx20* のホモログがヒメイカ初期胚において心臓特異的な発現様式を示した。これらの遺伝子の発現をヒメイカの様々な発生段階の胚で調べたところ、心臓予定領域と考えられる領域を見出した。発現変化を追っていくと、脊椎動物と似通った発現変化をたどる領域と、頭足類独自の変化を示す領域が存在した。この心臓マーカー遺伝子の発現変化は頭足類のそれぞれの心臓形成に関連したものであった。このことから、ヒメイカの体心臓と鰓心臓は共通の心臓予定領域に由来しながら、発生の途中で、それぞれの心臓を形成する領域に分かれていくことが考えられた。そこで初期に心臓マーカー遺伝子が発現している細胞が将来的にどこに移動していくのか明らかにするために、蛍光色素注入によって細胞を標識し、その系譜を追跡することを試みた。ヒメイカの卵は固い膜に覆われており、これまで実験動物として用いられてきた動物の受精卵とは性質が大きく異なっていた。そこで新たな注入法を開発することを考え、薬剤処理による卵殻除去やレーザー照射などを試みたが、いずれも胚を正常に保った状態での卵殻除去は困難であり、細胞標識には至らなかった。

系譜追跡まで行うことはできなかったが、本研究によって明らかになった心臓マーカー遺伝子の発現変化は心臓発生の進化を考えるうえで非常に重要な知見となる。頭足類においても脊椎動物と同様に、体に血液を送る心臓(左心室)と呼吸器系に血液を送る心臓(右心室)は、発生の早い段階で異なる細胞集団に分かれそれぞれの心臓を

形成していくことが予想された。本研究成果は頭足類の2種類の心臓が心臓予定領域から形成されるメカニズムを明らかにするという点で、新規性の高いものである。

#### 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 4 件)

Nakamura R., Koshiba-Takeuchi K., Tsuchiya M., Kojima M., Miyazawa A., Ito, K., Ogawa H., Takeuchi JK. Expression analysis of Baf60c during heart regeneration in axolotls and neonatal mice. *Develop. Growth. Differ.* 査読有、58巻、2016、367-382  
doi: 10.1111/dgd.12281

Morita Y., Andersen P., Hotta A., Tsukahara Y., Sasagawa N., Hayashida N., Koga C., Nishikawa M., Saga Y., Evans SM., Koshiba-Takeuchi K., Nishinakamura R., Yoshida Y., Kwon C., Takeuchi JK. *Sall1* transiently marks undifferentiated heart precursors and regulates their fate. *J. Mol. Cell Cardiol.* 査読有、92巻、2016、158-162  
doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.02.008

Moriyama Y., Ito F., Takeda H., Yano T., Okabe M., Kuraku S., Keeley F., Koshiba-Takeuchi K. Evolution of the fish heart by sub/neo functionalization of an elastin gene. *Nature Communications* 査読有、7巻、2016、10397  
doi: 10.1038/ncomms10397

Devine WP., Wythe JD., George M., Koshiba-Takeuchi K., Bruneau BG. Early patterning and specification of cardiac progenitors in gastrulating mesoderm. *Elife*, 査読有、Oct 8, 2015、3  
doi: 10.7554/eLife.03848.

##### [学会発表](計 8 件)

小柴和子、心室中隔獲得と円錐動脈幹形成の分子機構、第122回日本解剖学会総会・学術集会、2017年3月28日、長崎大学(長崎県・長崎市)

Moriyama Y., Takeuchi JK., Koshiba-Takeuchi K., Teleost-specific ECM “elastin2” demarcates teleost heart outflow tract by switching cell fate determination via YAP、Pan-American Society for Evolutionary

Developmental Biology Inaugural 2015 Meeting, 2015年8月5日、バークレー(USA)

Moriyama Y., Takeuchi JK., Koshiba-Takeuchi K., Teleost-specific ECM “elastin2” demarcates teleost heart outflow tract by switching cell fate determination via YAP、2015 22<sup>nd</sup> Weinstein Cardiovascular Development Conference, 2015年5月1日、ボストン(USA)

小柴和子、他6名、心臓再生のエピジェネティック制御、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

守山裕大、小柴和子、竹内純、心筋が平滑筋か：真骨魚類の進化から明らかとなった新規細胞運命決定メカニズム、第13回日本心臓血管発生研究会、2014年10月17日、磐梯熱海温泉ホテル(福島県郡山市)

小柴和子、Epigenetic regulations in the vertebrate heart regeneration、International Workshop on Developmental and Regenerative Biology in Yamagata、2014年9月10日、山形大学(山形県・山形市)

Moriyama Y., Takeuchi JK., Koshiba-Takeuchi K. Elastin gene neo-functionalization endows teleost-specific heart component, “bulbus arteriosus” in fish development and evolution, Euro Evo Devo Vienna 2014, 2014年7月23日、ウィーン(オーストリア)

Moriyama Y., Takeuchi JK., Koshiba-Takeuchi K., How to convert cardiomyocyte into smooth muscle; Lessons from fish heart evolution, 2014 Weinstein Cardiovascular Conference, 2014年5月9日、マドリード(スペイン)

##### [図書](計 5 件)

守山裕大、小柴和子、脊椎動物の心臓形態と冠動脈循環系における発生と進化、日本臨牀増刊号 最新冠動脈疾患学、上巻、2016、32-42

守山裕大、小柴和子、elastin 遺伝子の重複と新規機能獲得による真骨魚類における心臓流出路の進化、実験医学、34巻、

2016、1771-1774

伊藤航平、守山裕大、竹内純、小柴和子、  
特集・進化と発生からみた生命科学 -  
脊椎動物心臓の発生・再生と進化-、医学  
書院 生体の科学、66 巻、2015、212-216

小柴和子、心臓造形生物学～Heart がで  
きるメカニズム～、細胞工学、33 巻、2014、  
1118-1120

守山裕大、小柴和子、Heart ができるま  
で-心臓の進化と発生-、細胞工学、33 巻、  
2014、1157-1164

〔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：  
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

小柴 和子 (KOSHIIBA-TAKEUCHI, Kazuko)  
東洋大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：30467005

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

守山 裕大 (MORIYAMA, Yuuta)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・特別研  
究員  
研究者番号：40646212

##### (4) 研究協力者

春日井 隆 (KASUGAI, Takashi)

吉田 真明 (YOSHIDA, Masa-aki)