

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670396

研究課題名(和文) 心臓内に流入する神経堤細胞の正体の解明～多分化能と可塑性はどこまで保持されるか

研究課題名(英文) Characterization of neural crest cells migrating into the heart

研究代表者

栗原 裕基 (KURIHARA, Hiroki)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20221947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、マウスと鳥類胚を用いた発生学的実験により、従来「心臓神経堤細胞」として知られていた後耳胞領域より頭側の(前耳胞)頭部神経堤細胞が心臓内に遊走し、冠動脈平滑筋を始め、半月弁や心筋層内の間葉細胞に分化することを見出した。さらに単一細胞の遺伝子発現解析により、心臓内に流入する神経堤細胞の一群にはc-Kitなど幹細胞マーカーを発現する細胞群が含まれ、神経堤幹細胞としての多分化能をもつ細胞が心臓内においても保持されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the origin and fate of neural crest cells migrating into the heart through experiments using mouse and avian embryos. We found that cells originating from the preotic region of the neural crest, as well as “cardiac neural crest cells” derived from the more caudal post-otic region, migrate into the heart and differentiate into various cell types including coronary artery smooth muscle cells and mesenchymal cells in the semiluminal valves and myocardial walls. Single-cell analysis of gene expression patterns revealed the existence of a subset of neural crest cells expressing some stem cell markers (e.g. c-Kit), indicating the maintenance of the stemness with multipotency in a neural crest population within the heart.

研究分野：発生学・循環器内科学・血管生物学

キーワード：循環器 分子心臓学 発生・分化 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞はニューロンやグリア細胞からメラノサイト、頭部の骨軟骨細胞に至るまで多彩な分化能をもつ幹細胞群である。心大血管系においてもロンボメア 6~8 に相当する後耳胞領域の神経堤細胞(「心臓神経堤細胞」と呼ばれている)が大血管の平滑筋や隔壁形成に寄与し、その発生異常はヒトにおいて総動脈幹遺残症や大血管転位などの病態に関与することが従来知られている。

最近我々は、心臓神経堤細胞よりも頭側にあり、頭部骨格の形成に中心的役割を果たす頭部神経堤細胞(前耳胞神経堤細胞)が心臓内にも流入し、一部は冠動脈近位部の平滑筋細胞に分化することを見出した(Arima Y et al., *Nature Commun.* 3:1267, 2012)。この細胞群は頭部骨格において骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化する点で、心臓神経堤細胞とはその細胞運命が大きく異なっている。こうしたポテンシャルをもつ細胞系譜が冠動脈近位部の平滑筋を構成することは、同部位が動脈硬化病変、とくに石灰化の好発部位であることと符合し、その病態形成にこの細胞群が関与している可能性が考えられる。

さらに、平滑筋に分化する以外の神経堤細胞の多くは流出路付近に広く散在するが、これらの細胞群がどのような性質をもち、どのような細胞に分化しているのかは未だ明らかではない。神経堤細胞が本来もつ幹細胞としての性質(多分化能と可塑性)を考えると、これらの細胞が未分化のまま保持され、組織修復時などに何らかの役割を果たしている可能性が考えられる、以上より、今回同定された心臓内に流入する頭部神経堤細胞の特性を明らかにすることは臨床的にも細胞生物学的にも重要な課題であると考え、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

顎顔面を中心に頭部の骨格を形成する頭部神経堤細胞が心臓内に流入して一部は冠動脈平滑筋細胞に分化することが明らかになったが、その大半の流入細胞がどのような細胞に分化し、心臓機能にどのような役割を果たしているのかはまだほとんど明らかではない。本研究において我々は、神経堤細胞標識マウスを用いた解析、鳥類胚を用いた神経堤細胞の追跡及びキメラ移植実験、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析などを用いて、以下の設問に焦点を当てて研究を進めた。

頭部神経堤細胞は心臓内に流入した後、どのような細胞に分化するのか?

心臓内の神経堤細胞は、鰓弓を形成する骨格系の細胞に共通する性質を有するか?

心臓内の神経堤細胞の中には、幹細胞性を維持した未分化細胞の一群は存在するか?

心臓の発生過程や病態形成過程において、神経堤細胞の形質や運命はどのようなシグナルによってどのように変化するか?

以上を目標とした研究により、心臓内における頭部神経堤由来細胞の分化系譜と病態を含む生理的役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

神経堤細胞標識マウスを用いた解析

神経堤細胞特異的に Cre を発現する *Wnt1-Cre* マウスを *lacZ* および *EYFP* を *Rosa26* 遺伝子座に組み込んだレポーターマウス (*ROSA26-lacZ*, *ROSA26-EYFP*) と交配し、標識された神経堤細胞の分布を胚発生過程の各ステージで観察した。さらにエンドセリンシグナル関連遺伝子変異マウスとの交配やレチノイン酸の母獣経口投与などにより、心臓内に分布する神経堤細胞に対する各種シグナルの影響を検討した。

鳥類胚を用いた神経堤細胞の追跡及びキメラ移植実験

ニワトリ胚において頭部前耳胞神経堤細胞と後耳胞神経堤の蛍光ラベル標識、切除およびウズラ胚神経堤のキメラ移植を行い、蛍光シグナル追跡、QCPN 抗体を用いたウズラ細胞の検出等により、神経堤起源とその遊走、分化方向の関係を解析した。

単一細胞レベルでの遺伝子発現解析

Wnt1-Cre;ROSA26-EYFP マウスの心基部から酵素処理によって EYFP 陽性細胞を単離し、C1 (Fluidigm 社) を用いて単一細胞からの cDNA を調整後、Biomark (Fluidigm 社) を用いてマルチプレックス PCR により心臓内神経堤細胞の遺伝子発現プロファイルを単一細胞レベルで解析した。

4. 研究成果

頭部神経堤細胞は心臓内に流入した後、どのような細胞に分化するのか?

神経堤細胞を特異的に -gal により標識する *Wnt1-Cre;ROSA26-lacZ* マウスの解析と鳥類胚を用いた標識およびキメラ移植などの発生学的実験により、従来「心臓神経堤細胞」として知られていた後耳胞領域より頭側の前耳胞神経堤細胞が先行して心臓内に遊走し、冠動脈をはじめ、半月弁や心筋層内の間葉に分布することを見出した。細胞腫特異的のマーカーによる免疫染色により、冠動脈近位部の平滑筋細胞の多くが前耳胞神経堤細胞であることが確認されたが、心筋細胞など特定の分化マーカーの発現は明らかではなかった。

心臓内の神経堤細胞は、鰓弓を形成する骨格系の細胞に共通する性質を有するか?

心臓内に流入する神経堤細胞の特性を詳細に明らかにするため、*Wnt1-Cre;ROSA26-EYFP* マウスの心基部から単離した EYFP 陽性細胞の遺伝子発現プロファイルを C1 および Biomark を用いて単一

細胞レベルで解析した。この結果、血管平滑筋マーカーを強く発現する細胞群や間葉系細胞群の特徴を持つ細胞群の存在が確認された。一方、鰓弓で発現する *Dlx* 遺伝子群や骨芽細胞マーカーである *Rux2* などの有意な発現は確認されず、心臓に遊走する神経堤細胞が骨芽細胞様細胞への分化能を有し、冠動脈近位部が石灰化病変の好発部位であることを説明しうるかどうかについては、今後の課題として残された。

心臓内の神経堤細胞の中には、幹細胞性を維持した未分化細胞の一群は存在するか？

単一細胞レベルの遺伝子発現プロファイル解析の結果、上記の細胞群の他に、c-Kit など幹細胞マーカーを発現する細胞群の存在が確認された。この結果は神経堤幹細胞としての多分化能をもつ細胞が心臓内においても保持されている可能性を示すもので、これまで心臓幹細胞あるいは前駆細胞として報告されてきた c-Kit 陽性細胞の少なくとも一部が神経堤由来である可能性が示唆された。

心臓の発生過程や病態形成過程において、神経堤細胞の形質や運命はどのようなシグナルによってどのように変化するか？

の c-Kit 陽性細胞が心臓幹細胞として組織修復時などに何らかの役割を果たしている可能性が考えられ、その詳細についてさらに研究を進めている。また、検討した胎生後期の段階では EYFP 陽性細胞の中には心筋細胞や骨芽細胞的特徴を明らかに備えた細胞は確認されず、生後の段階や病的状態における心筋細胞あるいは骨芽細胞様細胞への分化の可能性は、今後の課題となった。

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12件)

Kitazawa T, Takechi M, Hirasawa T, Adachi N, Narboux-Nême N, Kume H, Maeda K, Hirai T, Miyagawa-Tomita S, Kurihara Y, Hitomi J, Levi G, Kuratani S, Kurihara H. Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids. *Nat. Commun.* 6:6853, 2015.

Kitazawa T, Fujisawa K, Narboux-Nême N, Arima Y, Kawamura Y, Inoue T, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Kodama T, Kim K-S, Sato T, Uchijima Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Minoux M, Rijli FM, Levi G, Kurihara Y, Kurihara H. Distinct effects of *Hoxa2* overexpression in cranial

neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratohyal boundary maps within the styloid process. *Dev. Biol.* 402(2):162-174, 2015.

Laumonnerie C, Bechara A, Vilain N, Kurihara Y, Kurihara H, Rijli FM. Facial whisker pattern is not sufficient to instruct a whisker-related topographic map in the mouse somatosensory brainstem. *Development* 142(21):3704-3712, 2015.

Sugihara K, Nishiyama K, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep.* 13(9):1814-27, 2015.

Maeda K, Asai R, Maruyama K, Kurihara Y, Nakanishi T, Kurihara H, Miyagawa-Tomita S. Postotic and preotic cranial neural crest cells differently contribute to thyroid development. *Dev. Biol.* 409(1):72-83, 2016.

[学会発表](計28件)

瀬谷大貴、心流出路に遊走する神経堤細胞の系譜とレチノイン酸の作用の検討、第14回日本心臓血管発生研究会、2015/12/19、磐梯熱海温泉 ホテル華の湯(福島県郡山市)

丸山和晃、Semaphorin3E-PlexinD1シグナルは冠動脈形成に重要な役割を果たす、第23回日本血管生物医学学会学術集会、2015/12/11、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Miki Shimizu、A homeotic transformation in neural crest-specific *Dlx5*-overexpressing mice. 神経堤細胞特異的 *Dlx5* 過剰発現マウスにおける顎顔面のトランスフォーメーション、第38回日本分子生物学会年会(BMB2015)、2015/12/2、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

丸山和晃、Semaphorin3E-PlexinD1 signaling is important for coronary artery formation、第38回日本分子生物学会年会(BMB2015)、2015/12/1、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

丸山和晃、Semaphorin3E-PlexinD1 signaling is important for coronary artery formation、第 48 回日本発生生物学会、2015/6/3、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Miki Shimizu、Dlx5-overexpression mice show a homeotic transformation in the upper jaw into lower jaw-like structures.Dlx5 過剰発現マウスにおける上顎の下顎構造へのトランスフォーメーション、ポスター、第 48 回日本発生生物学会、2015/6/3、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Kazuaki Maruyama、Semaphorin3E-PlexinD1 signaling is important for coronary artery formation、Weinstein 2015、2015/4/30、Boston（USA）

Kazuaki Maruyama、The role of Semaphorin3E-PlexinD1 signaling in heart morphogenesis、第 37 回日本分子生物学会年会(BMB2014)、2014/11/25、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Kazuhiro Maeda、Preotic neural crest cells contribute to thyroid bilobation、第 37 回日本分子生物学会年会(BMB2014)、2014/11/25、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ <http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・栗原 裕基 (KURIHARA, Hiroki)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20221947

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

・和田 洋一郎 (WADA, Youichiro)
東京大学・アイソトープ総合センター・教授
研究者番号：10322033

・富田 幸子 (TOMITA, Sachiko)
ヤマザキ学園大学・動物看護学部・教授
研究者番号：8039821

・栗原 由紀子 (KURIHARA, Yukiko)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80345040