

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860127

研究課題名(和文) 哺乳類心臓発生における二次心臓形成領域の細胞動態解析

研究課題名(英文) Cellular dynamics of the anterior second heart field during heart development

研究代表者

渡邊 裕介 (Watanabe, Yusuke)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：20562333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類心臓発生において流出路、右心室に細胞を供給する前方の二次心臓形成領域(anterior Second Heart Field; aSHF)の細胞動態について理解することを目的とした。

マウス胚の心臓中胚葉細胞で特異的に蛍光タンパク質を発現させ、発生中のaSHF領域のタイムラプスイメージングを行う手法を取り、細胞動態解析を行うことを試みた。その結果、胚発生と共に心臓背部のaSHF領域全体が流出路領域に取り込まれていく印象が得られた。このことは、胚組織のリモデリングに伴いaSHF領域が心臓へ取り込まれることにより、心臓流出路が形成されることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to understand cellular dynamics of anterior second heart field (aSHF) cells which contribute to the outflow tract and right ventricle of the heart.

I observed mouse embryos which expresses fluorescent proteins in cardiac mesoderm. As a result, aSHF region seemed to contribute to the outflow tract with dynamic remodeling of tissues. This suggests that the outflow tract is formed by incorporation of aSHF region to the heart with tissue remodeling of embryo.

研究分野：発生生物学

キーワード：心臓 発生 細胞動態

1. 研究開始当初の背景

心臓は生命の根幹をなす器官であり、その形態や機能の僅かな乱れも生命体の生存を左右する。ヒトにおいて心臓の奇形を伴って出生してくる頻度は驚くほど高く、0.8%もの新生児が先天性心疾患を発症している。この複雑な形を持つ臓器が胎児期に正常に形成されてくることは個体の血液循環にとって不可欠な要素であり、その形成過程を正確に理解することは先天性心疾患の早期発見、治療へと繋がることとなる。ヒトの先天性心疾患の内、約30%が心臓流出路領域から発生してくる大動脈・肺動脈の基部と右心室に関係するものであるが、これらは左心室や心房領域とは細胞の由来が異なる。即ち、心臓流出路と右心室は前方の二次心臓形成領域 (anterior Second Heart Field; aSHF) と呼ばれる中胚葉領域から発生する。

これまでに aSHF の発生異常によるヒト先天性心疾患の原因遺伝子としては、DiGeorge 症候群 (Fallot 四徴; 大動脈騎乗、肺動脈狭窄、右心室肥大、心室中隔欠損といった疾患を示す) の Tbx1 や、Alagille 症候群 (大動脈・肺動脈狭窄といった疾患を示す) の Notch2 や Jagged1 などが同定されており、また種々のミュータントマウスの解析からも、Fgf、Wnt、Bmp といったシグナリングや、Tbx1、Islet1 などの転写因子を含む多くの因子が二次心臓形成領域 (aSHF) の発生に関与することが明らかとなっている。それら因子のミュータントマウスの解析からは、細胞増殖や細胞死、或いは下流転写因子やシグナリングの発現変化などが観察され、各々の因子が制御する細胞数の増減や細胞の適切な分化が心臓発生に与える影響について明らかにしてきた (reviewed in Watanabe Y & Buckingham M, 2010, Vincent SD & Buckingham M, 2012)。私も aSHF 発生における Fgf シグナリングの関与や制御について明らかにしてきたが (Park EJ and

Watanabe Y et al., Development, 2008, Watanabe Y et al., Circ Res, 2010, Watanabe Y et al., PNAS, 2012) その一方、心臓発生中に aSHF 細胞が流出路・右心室領域へと寄与していく過程において、細胞がどのようなパターン及び極性を持って分裂していくのかは不明のままである。

心臓発生における細胞動態解析としては、マウス胚において、発生中の心臓での細胞分裂を 3D 観察した報告があるが、胚を固定して染色したもので、同一胚での一つ一つの細胞の分裂を観察したものではない (van den Berg G et al., 2009)。また、ゼブラフィッシュ胚では発生中の心筋細胞のイメージングが行われているものの、魚類では哺乳類と異なり、1心房1心室であること、心筋分化後に心臓が融合すること、そして申請者が注目する aSHF についても、哺乳類の aSHF において主要転写因子である Islet1 の発現パターン、機能の違いなどがあり、それらの知見がそのまま哺乳類胚に応用できない (Liu J & Stainier DY, 2012, de Pater E et al., 2009)。さらに、将来的にヒトでの臨床応用を想定した場合、マウスを用いたリアルタイムイメージングが重要となってくる。しかし、哺乳類胚の心臓ではその培養法とイメージング技術の組み合わせの困難さから、心臓発生過程において、aSHF を含む心臓前駆細胞、心筋細胞、或いは心臓神経堤細胞がどのような形態変化をしながら移動していくのかについては情報が乏しく、リアルタイムイメージングについては一切報告が無い。近年、私が以前に留学していたフランス・パスツール研究所の Buckingham 教授の研究室から、マウス胚の心臓右心室と左心室の細胞の配向を、centrosome と核の位置、細胞分裂を基準として 3D 解析した結果が報告された (Le Garrec JF et al., 2013)。この報告は、心臓という立体的な組織における細胞の配向極性を解析した画期的なものである。その一方、

やはり右心室や左心室といった心拍動の影響を大きく受ける部位では、4D 解析は未だ非常に困難であると考えられる。私が注目している心臓背側の aSHF 領域は、心臓流出路・右心室形成にきわめて重要である上、比較的心拍動の影響を受けにくいと考えられ、リアルタイムイメージングに挑戦できると考えており、またその知見はそれら領域における先天性心疾患（兩大動脈右室起始、総大動脈幹遺残、Fallot 四徴など）の原因究明にも応用できると考えられる。

2. 研究の目的

aSHF 細胞の心臓発生過程における形態とその移動様式について 4D イメージングを中心にして解析し、aSHF の心臓発生過程における細胞動態について理解することを目的とし、哺乳類心臓形成の理解に貢献したい。

3. 研究の方法

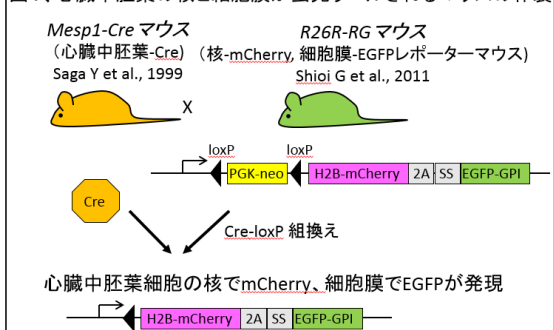
心臓中胚葉の核を赤色蛍光タンパク質 mCherry で、細胞膜を EGFP でラベルしたマウス胚をサンプリングし、培養液中にてインキュベーションシステムのある共焦点顕微鏡観察、4D イメージングを行い、aSHF 領域の動きを観察した。

(1) 心臓中胚葉細胞の細胞膜、細胞核が蛍光ラベルされたマウス胚の作製。

組織特異的に（コンディショナルに）細胞核を赤色蛍光タンパク質の mCherry で、細胞膜を緑色蛍光タンパク質の EGFP でラベルできるマウス（R26R-RG マウス、Shioi G et al., 2011）、また、心臓中胚葉特異的に発現する Cre マウスとして、Mesp1-Cre マウス（Saga Y et al., 1999）の 2 種の遺伝子改変マウスを用いた。R26R-RG マウスと Mesp1-Cre マウスを掛け合わせるにより、心臓中胚葉細胞の核が mCherry 赤色蛍光タンパク質で、細胞膜が EGFP 緑色蛍光タンパク質でラベルされたマウス胚を得た（図 1）。胚のサンプリングは、原始心筒を形成

した後の aSHF 領域の寄与が起っており、できるだけ発生が初期で顕微鏡観察に有利である embryonic turning が終了後の胎生 8.5~9.5 日目で行った。

図1、心臓中胚葉の核と細胞膜が蛍光ラベルされるマウスの作製



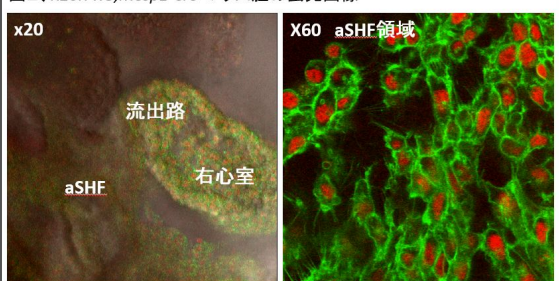
(2) 細胞膜、細胞核が蛍光ラベルされたマウス胚の二次心臓形成領域細胞（aSHF）の動態観察と画像解析。

R26R-RG;Mesp1-Cre マウス胚は、培養液中にて胚培養を行いながら顕微鏡観察を行った。胚培養は、75%ラット血清、25% DMEM/F12 培地にて行い、Leica TCS-SP5 共焦点レーザー顕微鏡 + 37 インキュベーションシステム + 5% CO₂ 供給システムにより培養しながら蛍光観察し、核（mCherry）と細胞膜（EGFP）の蛍光を指標として aSHF 領域の観察を行った。

4. 研究成果

胎生 8.5~9.5 日目の *R26R-RG;Mesp1-Cre* マウス胚を蛍光顕微鏡観察した結果、心臓中胚葉の細胞核で mCherry、細胞膜で EGFP が比較的強度に発現しており、観察に適していると考えられた（図 2）。

図2、*R26R-RG;Mesp1-Cre* マウス胚の蛍光画像



次に、心臓のタイムラプスイメージングを行うために、卵黄嚢を取り除いたマウス胚の静置培養の条件検討を行った。その結果、75%

ラット血清/25% DMEM;F12 培地にて数時間培養した際に、マウス胚の体節数増加が確認でき、心拍数も 60~80 回/分と安定していた。この条件を用いて胎生 8.5 日目の R26R-RG;Mesp1-Cre マウス胚を培養しながら、Leica TCS-SP5 共焦点レーザー顕微鏡 + 37 インキュベーションシステム + 5% CO₂ 供給システムにて、10 分おきに aSHF 領域の画像を Z-stack で取得しながらタイムラプスイメージングを行った。また、共焦点レーザーのマウス胚に対する毒性を抑えるために、Hybrid detector (HyD)システムを導入し、可能な限りレーザー強度を抑えたイメージングを行った。その結果、4~6 時間のタイムラプスイメージングにより、aSHF 領域の細胞が心臓流出路に寄与していくと考えられるイメージングが行えた。その際に、aSHF 細胞は個々に独立して移動しながら流出路領域に供給されていくのではなく、aSHF 領域全体が胚の大規模なリモデリングと共に、流出路領域に寄与していくという結果が得られた。

本研究により、心臓右心室・流出路形成は、これまで漠然と考えられていた aSHF 領域の細胞の積極的な移動による心臓への寄与ではなく、胚全体の組織の大規模なリモデリングにより心臓背部の aSHF が心臓へ取り込まれることにより起こっていることが示唆された。現在の課題としては、より長期間の安定したタイムラプスイメージングと、得られた画像の解析である。マウス胚はレーザーに対して非常に毒性を受けやすく、強いレーザー照射や長期間のイメージングで胚発生が異常になり易い。レーザー毒性を抑えるために、ライトシート顕微鏡やスピニングディスクなどを用いることも検討が必要である。また、組織のリモデリングによる心臓流出路形成を画像解析によって客観的、定量的に結論付けていきたい。

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)

Fujita M, Sakabe M, Ioka T, Watanabe Y, Kinugasa-Katayama Y, Tsuchihashi T, Utset MF, Yamagishi H, Nakagawa O. Pharyngeal arch artery defects and lethal malformations of the aortic arch and its branches in mice deficient for the Hrt1/Hey1 transcription factor. *Mech Dev.* 139:65-73 (2016) doi: 10.1016/j.mod.2015.11.002. (査読有り)

Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 23(24):6553-66 (2014) doi: 10.1093/hmg/ddu376. (査読有り)

Vincent SD, Mayeuf-Louchart A, Watanabe Y, Brzezinski JA 4th, Miyagawa-Tomita S, Kelly RG, Buckingham M. Prdm1 functions in the mesoderm of the second heart field, where it interacts genetically with Tbx1, during outflow tract morphogenesis in the mouse embryo. *Hum Mol Genet.* 23(19):5087-101 (2014) doi: 10.1093/hmg/ddu232. (査読有り)

Huynen L, Suzuki T, Ogura T, Watanabe Y, Millar CD, Hofreiter M, Smith C, Mirmoeini S, Lambert DM. Reconstruction and in vivo analysis of the extinct tbx5 gene from ancient wingless moa (Aves: Dinornithiformes) *BMC Evol Biol.* 14:75 (2014) doi: 10.1186/1471-2148-14-75. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

Yusuke Watanabe. Transcriptional regulation by competitive DNA binding of Islet1 and Nkx2-5. 心血管代謝週間 ISHR Japan Section、神戸国際会議場、2015 年 12 月 10~12 日。

片山由美、渡邊裕介、水田賢、坂部正英、井岡朋子、荒木睦、石井修平、染川智、斎藤能彦、中川修。胎生期内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における意義。心血管代謝週間 日本血管生物医学会、神戸国際会議場、2015 年 12 月 10~12 日。

荒木睦、渡邊裕介、坂部正英、久光隆、中尾周、藤田匡秀、片山由美、井岡朋子、中川修。血管内皮細胞における

BMP9/BMP10-ALK1 シグナル下流遺伝子群の解析。心血管代謝週間 日本血管生物医学会、神戸国際会議場、2015年12月10～12日。

〔図書〕(計 2件)

渡邊裕介、久光隆、片山由美、荒木睦、石井修平、藤田匡秀、坂部正英、中川修：心血管形態形成におけるHrt/Hey転写調節因子の意義、循環器病研究の進歩 2015年36巻1号、p74-82

宮坂恒太、佐藤恵莉子、**渡邊裕介**："遺伝子発現とメカノトランスダクション" 細胞工学、2014年33巻9号、p955-960

〔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

渡邊 裕介 (WATANABE YUSUKE)

国立研究開発法人・国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：20562333

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：