

「心臓隔壁欠損モデルの構築による心疾患機構の解明」

神戸大学大学院理学研究科

松花 沙織

1 研究の背景と目的

心臓は生命維持に必須な器官であり、血液を全身へ循環させる役割を果たしている。心臓流出路は、総動脈幹という一本の管として作られるが、次第に内部に中隔(以下、隔壁)ができ、大動脈と肺動脈に分離する。この隔壁は心臓神経堤細胞によって形成される。心臓神経堤細胞の欠損・発生異常は総動脈幹が大動脈と肺動脈に分離しない総動脈幹遺残症 (PTA)を引き起こす。しかし、心臓神経堤細胞の発生機構や分子基盤についてはほとんどわかっていない。申請者はこれまでに心臓神経堤細胞で特異的に発現する *MafB* 遺伝子が心臓神経堤細胞の初期発生に必須であることを明らかにした。*MafB* 機能欠失ニワトリ胚では、心臓神経堤細胞さらには心臓神経堤細胞由来の肺動脈大動脈中隔を失うと推察される。本研究の目的は *MafB* 機能欠失による総動脈幹遺残症 (PTA)モデルニワトリ胚を構築し、心臓隔壁欠損を引き起こす分子機序を解き明かすことである。

2 研究方法・研究内容

MafB 機能欠失による総動脈幹遺残症モデルニワトリ胚を構築し、心疾患を引き起こす分子機序を解き明かすことを目的とし、下記の【1】 - 【3】の3つの方法で研究を進めてきた。さらに、本申請研究に関する知見や情報収集を行う中で、心臓神経堤細胞による心臓隔壁形成機構は動物が持つ心臓の形と深い関連性があることに着目した。心臓の形が異なる動物を用いた心臓神経堤細胞の形成機構の比較解析を行うことで、本研究をより独自性高く、さらに発展的にできると考え、2心房2心室の心臓を持つニワトリだけでなく、ニワトリよりもシンプルな心臓構造を持つ1心房1心室の魚類(ゼブラフィッシュ)の心臓神経堤細胞研究にも着手した【4】。

【1】新規心臓神経堤細胞マーカーの探索とその遺伝子制御機構の解析

神経堤細胞は由来する胚の前後軸上の位置によって大きく5つのサブグループに分けられる(図1)。先行研究では、そのサブグループの一つである心臓神経堤細胞で特異的に発現している遺伝子の網羅的解析を次世代シーケンサーを用いて行っている。さらに、この遺伝子発現プロファイルと他のサブグループの神経堤細胞を用いた遺伝子発現プロファイルとの比較により、心臓神経堤特異的な遺伝子リストを作成している。このリスト中で有力な候補遺伝子について、ニワトリ胚を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現様式解析を行った。これにより、*MafB* 遺伝子以外にも新規の心臓神経堤細胞遺伝子として Wnt シグナルの下流にある遺伝子発現促進に関わる転写因子やレチノイン酸の細胞内輸送に関わる因子をコードする遺伝子などを同定することができた。さらにこれらの遺伝子が心臓

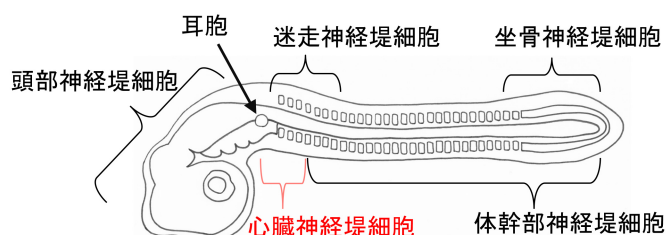


図1. 神経堤細胞は胚の前後軸に沿って5つのサブグループに分けられる

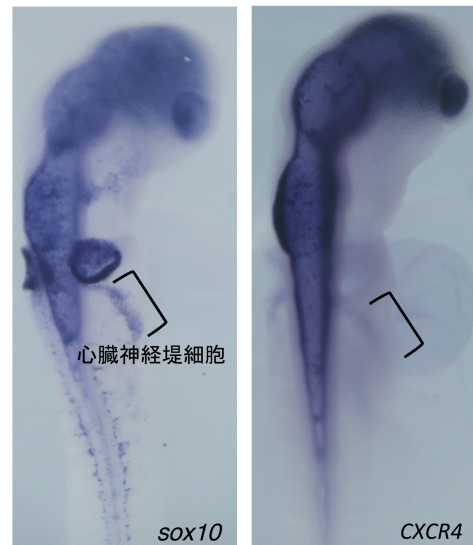
神経堤細胞形成に必須な *MafB* 遺伝子とどのような制御関係にあるのかを調べるため、*MafB* 機能阻害ニワトリ胚においてこれらの遺伝子発現様式を解析したところ、どちらの遺伝子についても発現低下が見られた。これらの遺伝子の発現が直接的か間接的かは未だ不明であるものの、両者とも *MafB* の制御下にあることが明らかとなった。

【2】*MafB* 機能阻害ニワトリ胚における心臓神経堤細胞形成への影響

MafB 機能阻害ニワトリ胚において心臓神経堤細胞が移動する初期段階では、神経堤細胞マーカーの発現が消失あるいは著しく低下することがわかっていた。本研究では、*MafB* 機能阻害が心臓神経堤細胞へ与えるその後の影響を調べた。心臓神経堤細胞は神経管から脱上皮化して移動を開始したのち、第3、4、6咽頭弓内を移動して心臓流出路へ運ばれる。この咽頭弓への移動期について *MafB* 機能阻害ニワトリ胚を用いて神経堤細胞マーカー遺伝子 *Crabp1* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにて解析した。その結果、このマーカー遺伝子の発現が第3、4、6咽頭弓で低下していることを見出した。よって、*MafB* 機能阻害ニワトリ胚では咽頭弓移動期の心臓神経堤細胞形成にも影響が出ていることがわかった。

【3】*MafB* 機能阻害ニワトリ胚における心臓神経堤細胞移動能への影響

次に *MafB* 機能阻害胚において、心臓神経堤細胞の移動に関わる遺伝子である *CXCR4* と *SDF1* についての発現解析を行った。*SDF1* は心臓神経堤細胞の移動を先導するために表皮外胚葉で発現するリガンドである。一方、*CXCR4* は心臓神経堤細胞で発現し、*SDF1* リガンドのレセプターとして機能することで心臓神経堤細胞の移動を制御していることがわかっている (図2)。*MafB* 機能阻害ニワトリ胚の心臓神経堤細胞移動初期段階において、*CXCR4* と *SDF1* の発現様式を解析した結果、*CXCR4* の発現が著しく低下した。この結果より、*MafB* 機能阻害ニワトリ胚では、神経堤細胞の分化能異常に加え、移動能も失われていることが明らかになった。さらに *MafB* 機能阻害ニワトリ胚において *SDF1* の発現にも影響が出ていることがわかった。これは心臓神経堤細胞から周辺細胞に対して何らかのシグナルが存在し、両者の細胞間相互作用によって心臓神経堤細胞を心臓内へ正しく移動させる仕組みがあるということを示唆する。



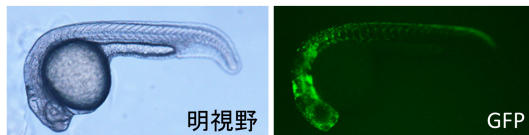
野生型ニワトリ胚における神経堤マーカー *Sox10* および *CXCR4* の発現様式

【4】ゼブラフィッシュ神経堤細胞において発現する遺伝子の網羅的な解析

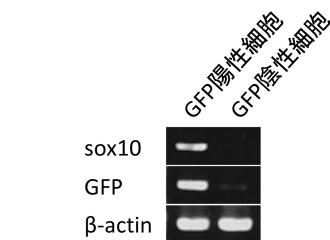
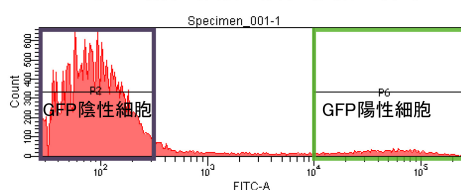
申請者はこれまでの研究からニワトリ心臓神経堤細胞で発現する全遺伝子発現プロファイルの作成に成功している。そこで、ゼブラフィッシュの神経堤細胞で発現する遺伝子の網羅的解析を行い、ニワトリで心臓神経堤遺伝子として同定された遺伝子群について、ゼブラフィッシュではどのような発現を示すのか、さらにその遺伝子機能及び遺伝子発現細胞の挙動について調べることにした。

sox10:eGFP トランスジェニックゼブラフィッシュは、神経堤細胞マーカー遺伝子である *sox10* のプロモーターに緑色蛍光タンパク質を連結させたコンストラクトをゼブラフィッシュゲノムに組み込んだトランスジェニック系統である。このゼブラフィッシュは生きた胚内で全ての神経堤細胞を GFP 標識することができる (図 3-① GFP 暗視野写真参照)。sox10:eGFP トランスジェニックゼブラフィッシュ胚を用いて、その細胞を分離し (図 3-①)、FACS (fluorescence-activated cell sorting) により GFP 陽性細胞と陰性細胞に分取した (図 3-②)。単離した GFP 陽性細胞が濃縮された神経堤細胞集団であることを確認するため、GFP 陽性細胞および陰性細胞から RNA を抽出し、逆転写 PCR により *GFP* 遺伝子や神経堤遺伝子の発現を調べた。その結果、GFP 陽性細胞にて *GFP* 遺伝子および神経堤遺伝子が発現していることを確認した (図 4)。この手法で分取した GFP 陽性細胞および陰性細胞の全転写産物を次世代シーケンサーを用いて解析し、遺伝子発現プロファイルを作成した (図 3-③)。さらに GFP 陰性細胞のものと比較して、GFP 陽性細胞にて高発現している遺伝子を多数同定した。

① 神経堤細胞でGFPが発現するゼブラフィッシュ胚の細胞分離



② FACSによるGFP陽性細胞と陰性細胞の分取



③ 次世代シーケンサーによる各細胞集団の全転写産物解析

図4. GFP陽性及び陰性細胞における遺伝子発現確認

図3. 神経堤細胞において発現している遺伝子の網羅的同定の流れ

3 研究成果

【研究から得られた考察】

以上の研究結果をまとめると、MafB 機能阻害ニワトリ胚では心臓神経堤細胞の移動初期段階においてすでに分化能及び移動能が失われていること、さらにその後の咽頭弓移動期においても心臓神経堤細胞形成不全が起きている。よって、MafB 機能阻害ニワトリ胚は少なくとも心臓神経堤細胞形成初期段階としての心臓神経堤細胞欠失モデルと位置付けることができる。本研究で心臓神経細胞の移動関連マーカー遺伝子として用いた *CXCR4* や *SDF1* は、これらの遺伝子欠失あるいは異所発現を引き起こしたマウスにおいて、心臓神経堤細胞の形成異常により心室中隔欠失 (VSD) や総動脈遺残症 (PTA) の心疾患がみとめられている。MafB 機能阻害ニワトリ胚は PTA や VSD モデルとしての有用性が高いと考えられる。これらの成果は、2020 年度日本発生生物学会にて発表予定である。

さらに本研究にて新たにゼブラフィッシュを用いた心臓神経堤研究をスタートさせた。神経堤細胞が GFP 標識されるトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、神経堤細胞の単離およびその細胞集団の全転写産物を網羅的に解析する実験系の立

ち上げに成功した。FACSにより分取した GFP 陽性細胞集団を用いた逆転写 PCR 法による遺伝子発現解析の結果から、ゼブラフィッシュ胚から神経堤細胞群の単離ができていたことを明らかにした。さらにその細胞集団を用いた次世代シーケンスにより全転写産物解析を経て、遺伝子発現プロファイルを完成させ、神経堤細胞で高発現している遺伝子の同定に成功した。

【残された課題と今後の課題】

今後、MafB 機能阻害ニワトリ胚の心臓形成期や心臓中隔形成完了期の心臓表現型について解析してゆく予定である。さらに本研究にて新規に見出された心臓神経堤細胞特異的な遺伝子群の中には PTA などの心疾患表現型を示す遺伝子ノックアウトマウスとの関連が推察されるものも存在している。MafB を糸口としてこれらの遺伝子の制御ネットワークを詳細に紐解いてゆくことで、心臓神経堤細胞形成異常から PTA などの心疾患を引き起こすまでの分子機序を明らかにできると考えられる。さらにゼブラフィッシュの神経堤細胞を用いて得られた遺伝子発現プロファイル上で、ニワトリ心臓神経堤遺伝子のゼブラフィッシュホモログ遺伝子の探索および各々の遺伝子発現様式や機能解析など進め、ニワトリのものと比較する。

4 研究がもたらす効果及び波及効果

本研究により、MafB 機能阻害ニワトリ胚が心臓神経堤細胞欠損の表現型を示す結果が得られた。これは心臓神経堤細胞の形成異常に起因する心疾患モデルニワトリ胚としての有用性を示唆する。ニワトリはマウスに比べて細胞や組織特異的な遺伝子発現抑制実験や異所的に遺伝子強制発現実験が簡便に行うことができる。このような利点を生かし、MafB 機能抑制による心疾患モデルニワトリ胚を用いて様々な神経堤細胞および心臓中隔形成の関連遺伝子の発現および機能解析を進めることで、総動脈遺残症 (PTA) のみならず多様な心疾患モデルのメカニズム解明や心疾患に関する知見が得られることが期待できる。