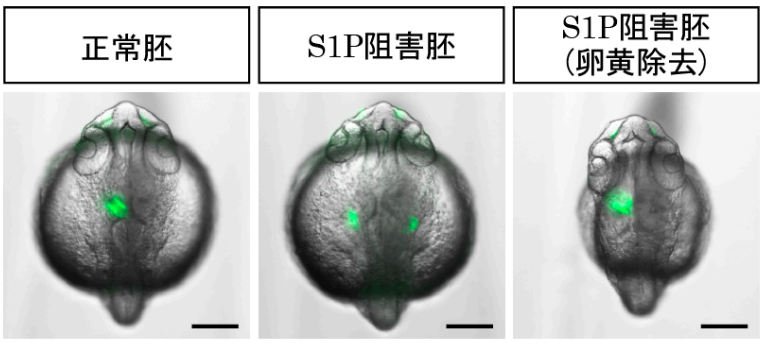
163　初期心臓形成における物理的特性の寄与の解析	森田　仁

【目的】脊椎動物の心臓は胚発生初期に側板中胚葉から分化した心臓前駆細胞が、正中線に向かって移動・融合し、さらにその後の形態変化を経て形成される。心臓前駆細胞の正中線への移動は、正常に進行しない場合心臓が左右に分かれた二股心臓を形成し個体は致死となるため、初期発生における重要なステップの一つである。心臓前駆細胞の移動についてはこれまで、内胚葉が前駆細胞の移動の足場として機能することが重要であると考えられてきており、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）シグナルが前方内胚葉の維持に必要であるというモデルが提唱されている。しかし、内胚葉が心臓前駆細胞の足場として機能していることを明確に示す知見はまだ報告されておらず、S1P シグナルが前方内胚葉に特に作用する理由もよくわかっていない。本研究では、心臓形成に関するこれまでの知見から、細胞・組織の物理的特性がこの現象に寄与している可能性を着想し、その検証を行うことで心臓形成時の細胞移動メカニズムの解明を目指すこととした。

【方法】心臓前駆細胞の移動における細胞・組織の物理的特性の重要性について検証を行うために、本研究では、1. ライブイメージングによる細胞移動の継時的な観察・定量化、2. 胚操作実験による心臓前駆細胞周辺の組織が物理的な障壁になる可能性の検証、3. 細胞・組織の物理的特性の測定のための単離条件の確立を行った。

【結果】共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングによって心臓前駆細胞が移動して正中線で融合するまでの過程を細胞レベルで観察する系を確立し、S1P シグナル阻害胚でも心臓前駆細胞が正常胚と大きく変わらない速度で移動することを見出した。一方で S1P シグナル阻害胚では前駆細胞の移動方向に異常が見られ、これらのことは心臓前駆細胞が正中線に向かって移動できなくなるような物理的な障壁の存在を示唆するものと考えられた。心臓前駆細胞の移動経路において物理的な障壁となりうると考えられるものは神経管と卵黄嚢であったため、本研究では卵黄嚢の内容物である卵黄を大部分除去することによって障壁を取り除くことを試みた。その結果、卵黄を除去した S1P シグナル阻害胚では心臓前駆細胞が正中線まで到達して融合することがわかり、さらにその胚は拍動し形態的にも正常と見られる心臓を形成することを発見した。これらの結果は、心臓前駆細胞とその周辺の組織の相対的な硬さが適切でないと前駆細胞が正中線に到達できないという可能性を示唆していたことから、その可能性を検証するために各細胞・組織の硬さを計測することとし、まず検証の対象となる細胞・組織の単離を試みた。

卵黄の除去による心臓前駆細胞移動のレスキュー



163. 初期心臓形成における物理的特性の寄与の解析

森田　仁

山梨大学 大学院総合研究部 医学域 総合医科学センター 分子生物学

Key words：心臓形成，細胞移動，内胚葉，物理的特性，ゼブラフィッシュ

緒　言

脊椎動物の初期胚発生期において、心臓形成過程はダイナミックな細胞移動を伴う複雑な形態形成運動の一つであると同時に、正常な心臓の形成は個体の生存に不可欠である。モデル脊椎動物のゼブラフィッシュにおける心臓形成では、まず心臓前駆細胞が体の両側面に分かれた側板中胚葉から分化する。そしてそれらの細胞は正中線に向かって集団で移動してゆき、正中線上で融合すると将来心臓になる管構造を作る。この心臓前駆細胞の移動に異常が生じて正常に正中に到達できないと、心組織が体の左右に分かれた二股心臓（cardia bifida）の表現型を生じ、胚性致死となる。心臓前駆細胞の移動についてはこれまで、心臓前駆細胞と近接して存在する内胚葉組織が前駆細胞の移動の足場として機能することが重要であると考えられてきた。その分子メカニズムとして、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）シグナルの重要性が明らかとなっており、そのシグナルに関与する S1P 輸送体 Spns2 や S1P 受容体 S1PR2 が欠失すると正常な内胚葉が維持されず、結果的に二股心臓となる［1〜3］。このように、心臓形成における内胚葉の重要性が強く示唆されているが、内胚葉が実際に心臓前駆細胞の足場として機能していることを具体的に示す知見はまだ報告されておらず、心臓形成メカニズムの理解には大きなギャップが存在している状態である。

このような状況を踏まえて本研究では、心臓形成において組織の物理的特性が果たす役割という、これまで調べられてこなかった切り口でこの現象を解析し、この現象のメカニズムを明らかにするための突破口を開くことを目指した。その結果、S1P シグナルは心臓前駆細胞の移動能に対する有意な寄与は認められず、一方で物理的な障壁となりうる組織を除去することで二股心臓の表現型がレスキューされたことから、物理的特性の寄与が強く示唆された。

方　法

本研究では、以下の研究実施内容によって心臓前駆細胞の移動における細胞・組織の物理的特性の重要性を明らかにすることを目指した。

1. ライブイメージングによる細胞移動の観察・定量化手法の確立

本研究ではまず、心臓前駆細胞の移動速度や方向性を適切に比較、評価するための手法として共焦点顕微鏡による細胞移動のライブイメージングと、そのデータを基にした移動現象の定量化を確立させることを行った。この手法の確立によって S1P シグナルの阻害など、異なる実験条件が細胞移動に与える影響を明瞭に比較、評価することが可能になった。

2. 細胞移動に対する物理的障壁の可能性の検証

心臓前駆細胞が神経管と卵黄嚢の間の狭い領域を正中に向かって移動することから、これら 2 つの組織が物理的な障壁として細胞移動に影響を与えうるかどうかを検証した。その方法として卵黄嚢の内容物である卵黄の大部分を吸い出すことで、卵黄嚢内の圧力を下げ、正中線における神経管との間のスペースをより大きくするという実験操作を行った。S1P シグナル阻害胚でこの実験操作を行い、心臓前駆細胞の移動が影響を受けるかどうか、ライブイメージングと定量化によって評価を行った。

3. 細胞・組織の物理的特性の測定

心臓前駆細胞の移動において、細胞・組織の物理的特性が重要な役割を担っている可能性があることから、この現象に関与する可能性が高い細胞・組織（心臓前駆細胞、内胚葉、神経管、卵黄嚢）の物理的特性である硬さを調べるため、まず各細胞・組織の単離を試みた。目的の細胞・組織が単離されているかどうかは、各細胞・組織特異的なレポーター遺伝子の発現を調べることで確認した。

結果および考察

1. S1P シグナル欠損による心臓前駆細胞移動の定量的評価

二股心臓を形成する心臓前駆細胞移動の異常がどのように引き起こされるのかを細胞レベルで調べるため、S1P シグナル欠損胚において心臓前駆細胞の移動を共焦点顕微鏡によるライブイメージングによって観察し、個々の細胞の動態を定量化した。まず細胞の移動速度について調べたところ、心臓前駆細胞の移動が開始されてから間もない時期には S1P シグナル阻害胚では正常胚よりも前駆細胞の移動速度が遅いが、やがて両者の移動速度はほぼ同等になることがわかった（図 1）。このことから、S1P シグナルは細胞の移動能自体には大きな影響を及ぼしていないと考えられ、S1P シグナル欠損による二股心臓の表現型は移動速度とは異なる細胞動態の異常によって引き起こされている可能性が考えられた。そこで続いて、心臓前駆細胞の移動方向について比較するため細胞移動方向の一貫性を定量化したところ、S1P シグナル阻害胚では正常胚よりも前駆細胞の移動方向がランダムになっていることがわかった。これらの結果から、S1P シグナル欠損胚では心臓前駆細胞の移動能ではなく、移動方向に異常が生じたことでそれらの細胞が正中線に到達できず、結果として二股心臓となることが考えられた。

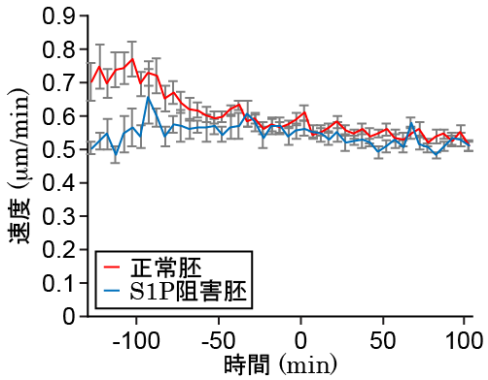


図 1. 心臓前駆細胞の移動速度
ライブイメージングのデータを元に定量化した、正常胚（赤）と S1P シグナル阻害胚（青）の心臓前駆細胞の移動速度。移動初期には両者の速度に開きがあったが、やがてほぼ同等の速度で移動するようになった。

2. 障壁の除去による心臓前駆細胞移動への影響の検証

これまでの知見、及びライブイメージングの観察・定量結果から、S1P シグナル欠損胚では心臓前駆細胞の周辺組織が移動の物理的な障壁になっている可能性が示唆されたため、障壁の一つになりうると考えられる卵黄嚢の大部分を S1P シグナル阻害胚から取り除く実験操作を行った。すると卵黄嚢を除去した S1P シグナル阻害胚では、心臓前駆細胞の正中線への移動とそこでの融合が有意にレスキューされることがわかった。さらに、心臓前駆細胞の移動がレスキューされた S1P シグナル阻害胚では、その後、拍動し形態的にも正常と見られる心臓を形成した。この結果から、心臓前駆細胞の正中線への移動において、S1P シグナルは前駆細胞が周辺組織の物理的な障壁に移動を妨げられることなく正中線に到達することを可能にしていると考えられた。

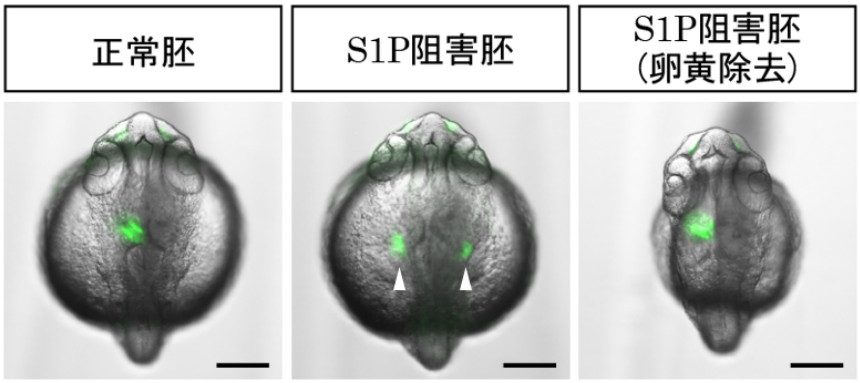


図 2. 卵黄の除去による心臓前駆細胞移動のレスキュー
受精後 24 時間後の正常胚（左）、S1P シグナル阻害胚（中央）、卵黄を除去した S1P シグナル阻害胚（右）の頭部背側像。Myl7:EGFP の発現によって心臓前駆細胞が可視化されている（緑）。S1P シグナル阻害胚は二股心臓を形成するが（矢頭）、卵黄除去胚ではその表現型がレスキューされた（スケールバー：200 μm）。

3. 細胞・組織の物理的特性計測のための単離手法の確立

上記の結果を受けて、心臓前駆細胞移動時における各細胞・組織の物理的特性を定量的に調べるため、まず前駆細胞とその周辺組織をそれぞれ単離する手法を確立することとした。心臓前駆細胞と内胚葉はそれぞれのレポーター遺伝子を用いてセルソーターによって単離する方法を試み、神経管についてはピンセットを使って顕微鏡下で解剖・単離する方法を試みた。いずれの場合においても、単離した細胞・組織中に目的の細胞が存在していることを確認したが、目的ではない細胞も比較的多く混在していたため、今後単離の純度を高められるように条件検討を重ねる必要がある。

本研究によって、心臓前駆細胞の移動において S1P シグナルが物理的な障壁を回避することに寄与している可能性が強く示唆された。ゼブラフィッシュの心臓形成期では S1P 受容体である S1PR2 が内胚葉に発現しており、これまでの報告でも S1P シグナルが内胚葉の機能に影響を与えていることが示されていることから［4, 5］、本研究の結果を加味すると S1P シグナルを受容した内胚葉が正中線の物理的障壁の回避もしくは除去に寄与していることが考えられる。今後は本研究によって確立しつつある細胞・組織の単離手法を用いて各細胞・組織の物理的特性である硬さを計測するとともに、S1P シグナルの有無によって内胚葉での遺伝子発現がどのように変化するかを調べることにより、心臓前駆細胞移動における物理的特性の寄与とそこに関わる内胚葉の機能を細胞・分子レベルで明らかにすることが望まれる。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたっては、山梨大学大学院総合研究部総合医科学センター発生生物学研究室、及び総合分析実験センターには試薬・機器を分与・貸与いただき感謝申し上げる。

文　献

1） Kupperman E, An S, Osbone N, Waldron S, Stainier DYR. A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. Nature. 2000 Jul 13;406(6792):192-5. PMID: 10910360 DOI: 10.1038/35018092

2） Osborne N, Brand-Arzamendi K, Ober EA, Jin SW, Verkade H, Holtzman NG, Yelon D, Stainier DY. The spinster homolog, two of hearts, is required for sphingosine 1-phosphate signaling in zebrafish. Curr Biol. 2008 Dec 9;18(23):1882-8. PMID: 19062281 DOI: 10.1016/j.cub.2008.10.061

3) Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. Science. 2009 Jan 23;323(5913):524-7. Epub 2008 Dec 11. PMID: 19074308 DOI: 10.1126/science.1167449
4) Ye D, Lin F. S1pr2/Gα13 signaling controls myocardial migration by regulating endoderm convergence. Development. 2013 Feb;140(4):789-99. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23318642 DOI: 10.1242/dev.085340
5) Fukui H, Terai K, Nakajima H, Chiba A, Fukuhara S, Mochizuki N. S1P-Yap1 signaling regulates endoderm formation required for cardiac precursor cell migration in zebrafish. Dev Cell. 2014 Oct 13;31(1):128-36. PMID: 25313964 DOI: 10.1016/j.devcel.2014.08.014