

論文の内容の要旨

論文題目 Contribution of cranial neural crest cells to cardiac development and effects of retinoic acid

(頭部神経堤細胞の心発生への寄与とレチノイン酸の効果)

氏名 瀬谷大貴

背景と目的

神経堤細胞 (NCC) は、胎生初期の神経板の陥入過程で神経溝の両端に生ずる細胞集団で、発生が進むに連れて背側から腹側へと遊走する。自己複製能と多分化能を備え、神経細胞やグリア細胞、副腎髄質細胞、皮膚の色素細胞になることが知られている。特に頭部領域の NCC は、頭部顔面の骨格や大血管の平滑筋など、より多彩な分化能を示すことが知られている。心臓形成に関与する NCC については、1983 年に Margaret Kirby らの鳥類胚の実験によって、将来聴覚器官を形成する耳胞領域から、第 3 体節レベルまでの NCC が関与していると報告され、現在では「心臓神経堤細胞」として認知されている。この心臓 NCC は腹側の鰓弓部へ向けて遊走し、大血管や大動脈肺動脈中隔の形成に関与する。一方、耳胞より頭側の神経堤 (NC) から派生する細胞は、主に頭頸部の形成に関与するとされており、心臓形成への関与については報告されていなかった。

我々は近年、この耳胞より頭側の頭部 NCC が、実は心臓の形成にも寄与しているという新しいモデルを提唱した。心臓内への NCC の分布を調べるため、*Wnt1-Cre* 遺伝子座に *Cre* 配列を組み込んだマウスと *Rosa26* の遺伝子座で *Cre* 依存性に *lacZ* を発現するマウスを掛け合わせて実験を行なったところ、発生後期の心臓において、冠動脈の周囲に β -gal 陽性細胞が分布していることを確認し、それらの細胞は平滑筋細胞のマーカーである α SMA で共染されることが明らかとなった。心臓内の NCC が神経管のどの領域に由来するのかを明らかにするため、ウズラの神経堤をニワトリ胚に移植する鳥類キメラ胚の手法を用いて、発生後期における頭部 NC の心臓への寄与を確認したところ、冠動脈近位部の周囲および平滑筋にウズラ特異抗体で標識される細胞が分布していることが明らかとなった。さらに頭部 NCC による寄与が正常な冠動脈形成に必須かどうかを調べるため、ニワトリ胚で頭部 NC を取り除いた実験を行なったところ、冠動脈中隔枝の局所的な拡張と、拡張部位での平滑筋細胞の部分的な欠失が確認された。同様の冠動脈形成異常が、頭部 NCC の発生・分化過程で重要な因子であるエンドセリン (Edn)

シグナルの欠損モデルマウスにおいても確認され、それらの胎仔において、マウスでは通常右冠動脈から分岐する冠動脈中隔枝が左冠動脈から分岐するという異常を併せて発見した。さらにエンドセリン A 型受容体欠損で拡張した冠動脈周囲には NCC が分布していないことが明らかとなった。これら一連の実験により、頭部 NCC が中隔領域を中心とした心臓内に寄与しており、その一部は冠動脈の平滑筋細胞に分化していること、Edn シグナルが頭部 NCC を介した冠動脈形成に関与していることが明らかとなった。

しかしながら、頭部 NCC が、発生のどの段階で、どの部位で、そしてどのようなメカニズムで心臓形成に寄与しているのか詳細は不明であった。そこで本研究では、NC の心臓発生にかかわる役割を頭部 NC 由来の細胞を中心に、鳥類とマウスの胎仔心臓において次の 5 点につきさらに精緻に検討した。

- (1) 頭部のどの領域の NC が冠動脈形成に寄与しているか。
- (2) 頭部の NC が冠動脈以外の心臓形成にどう関与しているか。
- (3) Edn シグナルを阻害するレチノイン酸 (RA) は頭部 NC の冠動脈形成に影響を与えるか。
- (4) それはどのようなメカニズムで起きているのか？
- (5) 心臓発生に寄与する NC 由来の細胞はどのような特徴を持っているのか？

結果と考察

頭部のどの領域の NC が冠動脈の形成に寄与しているか明らかにするため、ウズラとニワトリの鳥類キメラ移植実験を詳細に行なった。NCC の遊走開始前にニワトリの頭部 NCC にウズラの同部位の NCC を交換移植し、6 つの領域に分けて検証した。その結果、これまで確認していた第 4 ロンボメア領域由来の NCC の他に、中脳から第 2 ロンボメア領域由来の NCC も冠動脈の形成に寄与している可能性が示唆された。さらに頭部 NCC は、半月弁、右室流出路領域、心室中隔、冠動脈に分布していることが確認され、大血管と大動脈肺動脈の中隔に寄与するとされる心臓 NCC の分布よりも広範囲に心臓内に分布していることが明らかとなった。

半月弁 (大動脈弁・肺動脈弁) への NCC の寄与については、先行研究でも既に明らかとなっているとおり、マウスでは 3 葉ある大動脈弁・肺動脈弁のうち中隔側の 2 葉に主に分布していることが確認された。しかしこれらの細胞が頭部 NCC、心臓 NCC どちらに由来するのか詳細は不明であった。そこで私は、鳥類キメラ胚を使用して大動脈弁、肺動脈弁への NCC の寄与について詳細に検討することとした。まず心臓 NCC をウズラの NCC で交換移植したキメラでは、大動脈弁の左冠尖 1 葉、肺動脈弁の 3 葉すべてに心臓 NCC が散在性に分布していることが明らかとなった。それに対し、頭部 NCC をウ

ズラの NCC で交換移植したキメラ胚では、大動脈弁と肺動脈弁ともに 3 葉すべてに分布しており、特に弁葉先端の心室側に密に分布していることが明らかとなった。これらの結果から、頭部 NC は心臓 NC とは異なる分布様式で半月弁に寄与していることが示唆された。さらに、方法論の違いはあるものの、動物種間では NCC の分布様式に違いがある可能性が示唆された。

我々は次に、心臓発生の動態をコントロールしている要因を探索するため、従来心臓発生にさまざまな異常をきたすことが知られ、Edn シグナルに対しても影響を及ぼす RA に注目し、RA 投与モデルマウスを用いて、頭部 NCC が発生のどの段階で心臓形成に寄与しているか検討した。特に所属研究室の共同研究では、胎生早期の RA 投与が下顎弓の Edn1 の発現を抑制し、頭部 NCC による下顎の形成異常を引き起こすことを報告しており、Edn シグナル抑制を介した頭部 NCC への作用が心臓形成にも影響する可能性が考えられた。RA 投与による冠動脈形成への影響を心臓発生後期の胎生 17.5 日において確認したところ、胎生 8.5 日での RA 投与で冠動脈中隔枝の左冠動脈からの分岐異常と (67.8%)、中隔枝の局所的な拡張が認められた (11.9%)。冠動脈の形成異常が起きる胎生 8.5 日の RA 投与時期というのは、ちょうど NCC の遊走の早い段階と一致する。そこで私は、NCC の遊走に対する RA の影響を確認するため、NCC 系譜を標識する *Wnt-1Cre* マウスを用いて、RA 投与後 24 時間、48 時間での β -gal 陽性細胞の分布を確認した。その結果、24 時間後の胎生 9.5 日で心流出路から左心室にかけて流入してくる細胞が RA 投与胎仔心では減少していることが認められた。48 時間後の胎生 10.5 日で心流出路への NCC の流入を観察すると、RA 投与によって β -gal 陽性領域の短縮が観察され、心臓内への NCC の遊走が阻害されていることが示された。流出路領域を詳細に確認してみると、鰓弓動脈部位において RA を投与した胎仔での β -gal 陽性細胞の集積が明らかとなった。このことから、本来胎生 9.5 日に鰓弓動脈の壁に沿って移動する NCC が RA 投与により一部に集積してしまうため、遊走の遅延が起り、結果として冠動脈の形成異常を引き起こすものと推察された。この過程で実際に Edn シグナルの抑制が関与しているかどうかは今後の検討が必要ではあるが、RA による冠動脈形成異常に頭部 NCC が関与している可能性が示唆された。

NCC がなぜ心臓形成に寄与する必要があるのか、どのような役割を持っているのかということは現在多くが未解明である。それらを明らかにするための第一段階として、心臓発生に寄与している NCC がどのような特徴を持っているのか、発生後期の胎生 17.5 日心臓内における NC 由来細胞を FUCS にて分取し、心臓発生に関係する遺伝子群 96 個の発現プロファイルについて単一細胞レベルで検討した。その結果、心臓内に遊走した NCC は多様な遺伝子発現パターンを示し、多様な細胞種への分化が示唆された。

その中でも 2 つの特徴的な細胞集団の存在が明らかとなり、*Myh11*・*SM22α* および *Angpt1* を高発現している平滑筋細胞様の細胞と、*c-kit*・*Sox10* を高発現している幹細胞もしくは前駆細胞様の幼若型の細胞が存在することが明らかとなった。

結論

- (1) 胎生期の鳥類キメラ移植実験から、第 4 ロンボメア由来、およびさらに頭側の頭部 NCC が冠動脈の形成に寄与している可能性が明らかになった。
- (2) 頭部 NC が心臓 NC とは異なる分布様式で半月弁の形成に寄与していることが示唆された。さらに動物種間では NCC の分布様式に違いがある可能性が明らかとなった。
- (3) 胎生 8.5 日での RA 投与は、冠動脈中隔枝の分岐の異常と平滑筋細胞の部分的な欠失を伴う局所的な拡張を引き起こした。
- (4) 胎生 8.5 日での RA 投与によって NCC の心臓内への遊走が乱され、それが冠動脈の形成異常の要因となりうることが示唆された。
- (5) マウス発生後期の体性 17.5 日の心臓において、平滑筋細胞様の遺伝子発現プロファイルを示す細胞と、幹細胞もしくは前駆細胞様の遺伝子発現プロファイルを示す幼若型の細胞の存在が明らかとなった。
- (6) 以上の知見は、新たに心臓への寄与が明らかとなった頭部 NCC を中心に、NCC が心臓の発生や機能、冠動脈や半月弁の異常を伴う疾患において果たす役割の解明に貢献することが期待される。