

一次繊毛を介した心外膜腔内流れストレス受容による心臓発生制御機構

福井 一

国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部

【研究の背景】

一次繊毛は細胞の中心小体基部を起点とし、頂端側へ突出した1本の毛状のオルガネラである。一次繊毛は細胞外に存在する液流を感知した際に、カルシウムイオン(Ca^{2+})の流入などにより力学的刺激をシグナルへと変換・伝達するメカノセンサーとして機能する。この流れ感知は左右軸決定、腎臓発生機構などと関連することが知られる。ゼブラフィッシュ心臓は受精後 1 日後に拍動を開始し、形態形成が進行する。拍動を開始した際の心臓は心外膜に覆われておらず、心筋細胞の頂端側と心膜の間(心外膜腔)では拍動依存的な流れが存在する。この流れが心外膜の形成に重要であることが報告されている¹⁾。しかしながら、この流れに依存したシグナル機構の存在は全く不明である。

近年、心臓を構成する多くの細胞で一次繊毛が伸長しており、一次繊毛機能異常と先天性心疾患発症の間には強い相関が認められることが報告された²⁾。しかし心臓は拍動することに加え、これらの細胞から伸長する一次繊毛は胎生期のみでしか認められないことから、生理的状态での解析が困難であり、機能実体は不明である。研究申請者はこれまでゼブラフィッシュを用いて循環器発生や一次繊毛機能解析を行ってきた³⁾。我々は一次繊毛が心外膜腔内の流れを感知するアンテナとしての役割をもつ可能性を考えた。

【目 的】

本研究の目的は、心臓初期発生過程における一次繊毛による心外膜腔内流れ感知依存的なシグナル実体の詳細を明らかにすることである。本研究では特に一次繊毛の主要なメカノセンシング機構である Ca^{2+} シグナルに焦点を絞り、 Ca^{2+} シグナル応答機構の存在証明と生理的意義を明らかにする。

【方 法】

① 一次繊毛特異的 Ca^{2+} シグナル可視化ゼブラフィッシュの作製と観察

Tol2トランスポゾンシステムを用いて、全身性発現プロモーターである *actb1* promoter 下で繊毛局在セロトニン受容体アイソフォーム 6(5HT₆)に単量体赤色蛍光タンパク質 mCherry と緑色蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質である G-GECO 融合タンパク質を発現するゼブラフィッシュ個体;*Tg(actb1:gal4ff);Tg(5xuas:5HT₆-mCherry-G-GECO)*を作製する。一次繊毛の挙動と繊毛内 Ca^{2+} シグナルの観察には Lightsheet 顕微鏡を用い、30 msec/frame で撮影する。

② 心外膜細胞、心外膜前駆細胞可視化トランスジェニック個体の作製と観察

心外膜前駆細胞心外膜細胞で発現する *tcf21* のゲノム上流領域を含む BAC プロモーターの支配下で核局在シグナルを繫いだ GFP を発現する個体;*TgBAC(tcf21:Nls-GFP)*を作製する。共焦点顕微鏡または lightsheet 顕微鏡を用いて、受精後 2 日胚の心外膜壁での GFP 発現細胞を心外膜前駆細胞として、また 3 日胚で心筋細胞に接着する GFP 発現細胞を心外膜細胞として認める。

③ *Trpp3* チャネル機能阻害個体、機能抑制個体の解析

メカノチャネルである *Trpp3* の変異体 *sa22300* を Sanger Institute Zebrafish Mutation Project (ZMP) より分与して頂く。この変異体は Exon3 と Exon4 の間のイントロンがスプライシングされないことで機能が欠失する。*trpp3* ヘテロ変異体

同士の交配から得られた卵について、受精から 3、6、10、14 日後の群に分けて各個体の genotyping を行い、ホモ変異体の生存率を解析する。また、初期胚の細胞塊に対して *trpp3* に特異的なモルフォリノ(*trpp3* MO)を打ち込むことで発現抑制個体の解析を行う。変異体、発現抑制個体を用い、心外膜細胞の形成と一次繊毛内 Ca^{2+} シグナルへの影響を検討する。

【結 果】

トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた解析から、一次繊毛が心外膜前駆細胞より心外膜腔へ向かって突出することを見出した。この一次繊毛は拍動に伴って屈曲しており、さらに一次繊毛内では Ca^{2+} 流入が認められた。一次繊毛に局在し、力学的刺激に応答する Trp チャンネルファミリーの一つである Trpp3 の変異体を解析したところ、この変異体は受精から 3 日後までは外見上の形態異常を認めないが、14 日後には生存できないことが明らかになった。*trpp3* 変異体、*trpp3* 発現抑制個体ともに心外膜の顕著な低形成がおこることが明らかになった。そして、*trpp3* 発現抑制個体では一次繊毛内の Ca^{2+} シグナルが顕著に低下することが明らかとなった。

【考 察】

心発生期において、心外膜前駆細胞の一次繊毛が心外膜腔内の流れ感知依存的な Ca^{2+} シグナルを伝達することが示唆された。さらにこの流れ感知依存的な Ca^{2+} シグナルは一次繊毛に局在する Trpp3 活性化に由来し、心外膜の形成に重要であることが示唆された。*trpp3* 変異体では心外膜形成異常は約 50%の低下であったことから、他のシグナルも心外膜形成に関与することが考えられる。Bmp-Smad シグナルは chick の心外膜形成に重要であることが報告されており⁴⁾、一次繊毛を介したシグナルとの協調的な働きが心外膜形成に重要である可能性が考えられる。今後は、心外膜前駆細胞の一次繊毛の Ca^{2+} シグナル活性化が直接的に力学的刺激を介したものであることを証明する必要がある。解明に向けて光ピンセットを用いて人為的に一次繊毛に対する力学的刺激を行った際の Ca^{2+} シグナル変動を解析する。さらに、 Ca^{2+} シグナル活性化と心外膜形成制御を繋げるための詳細なメカニズムの解析を行っていく必要があると考える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

先天性心疾患は新生児のうち約 100 人に 1 人の割合で発症してくることから、発症機構を理解することは重要な課題である。一次繊毛の機能異常は先天性心疾患の主要因となることから、本研究で心発生における一次繊毛機能実体を明らかにすることが先天性心疾患発症機構の解明へと繋がることが期待される。

【参考・引用文献】

1. Peralta M et al., Heartbeat-driven pericardiac fluid forces contribute to epicardium morphogenesis. *Curr Biol*, 2013 Sep 23;23(18):1726-35.
2. Li Y, et al., Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*, 2015 May 28;521(7553):520-4.
3. Fukui H et al., S1P-Yap1 signaling regulates endoderm formation required for cardiac precursor cell migration in zebrafish. *Dev Cell*, 2014 Oct 13;31(1):128-36.
4. Ishii Y et al., BMP signals promote proepicardial protrusion necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Dev Cell*, 2010 Aug 17;19(2):307-16.