

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590173  
 研究課題名（和文） 心臓発生過程でおこる心内膜床形成での wnt と骨形成因子(BMP)の協調作用機構  
 研究課題名（英文） A role of wnt and BMP during endocardial cushion tissue formation  
 研究代表者  
 山岸 敏之(YAMAGISHI TOSHIYUKI)  
 埼玉医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：60255122

研究成果の概要：心内膜床は初期胚心臓の房室管および流出路に形成され、完成した心臓の中隔や弁の原基となる。この心内膜床は心内皮細胞の間葉への形質転換によって形成される。これまでの研究で心内皮細胞の形質転換には、心筋から分泌される BMP が必要であることが示されていた。今回の研究により、この形質転換過程に wnt シグナルの伝達経路も必要であることが明らかになった。さらに BMP と wnt シグナル伝達経路の下流で転写因子の sox9 が働いている可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

研究分野：発生学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：心臓、心内膜床、上皮 - 間葉形質転換、BMP、wnt

## 1. 研究開始当初の背景

心内膜床は、房室管（心房と心室の間）および流出路に形成され、将来の中隔や弁を形成する原基である。心内膜床は、流出路および房室管領域の心内皮細胞が心筋細胞より分泌される未知の誘導因子により間葉に分化し（上皮-間葉形質転換）形成される。研究代表者は、心内膜床でおこる上皮-間葉形質転換での成長因子、とくに形質転換成長因

子 TGF (transforming growth factor-:TGF-)ファミリーの働きに注目し、その分子機構を研究してきた。その結果、心筋細胞から分泌される骨形成因子 (Bone morphogenetic protein:BMP)が、TGF- 2、3 と協調的に作用し心内皮細胞の形質転換を誘導する事が明らかになった。さらに、心内膜床の間葉に発現するホメオボックス遺伝子 Msx1 の研究から、BMP とともに働く未知の

液性因子の存在が予想された。

## 2. 研究の目的

研究代表者は BMP とともに働く液性因子が wnt タンパク質である可能性を得た。本研究では心内膜床形成過程での wnt の働きを明らかにすることが目的である。具体的には以下の2点について明らかにする。

心内膜床形成領域に存在する wnt 遺伝子群の同定

心内皮細胞の形質転換における wnt と BMP の協調作用機構

## 3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚心臓に発現する wnt 遺伝子群の全長クローニング

wnt の機能を明らかにするため、ニワトリ胚心臓および胚全体より、wnt タンパク質の全長をコードする領域のクローニングを RT-PCR 法によりおこなった。

(2) 培養系を用いた wnt 遺伝子のスクリーニング

1 で得られた wnt 遺伝子を発現ベクターの pCS2+ に組み込んだ。

器官培養による生物検定は、次のように行った。ニワトリ胚心臓(ステージ 13)の心内膜床領域を微小外科手術により切り出し、コラーゲンゲル上で培養した。4 時間後、心筋細胞を剥離し、心内皮細胞だけをコラーゲンゲル上に残した。 で作製した wnt 遺伝子を心内皮細胞に導入し、BMP とともに培養し、心内皮細胞のゲル内への侵入を指標に、導入した wnt の形質転換能力を判定した。遺伝子導入にはリン脂質系の導入試薬を用いた。

(3) 活性のあった wnt の心臓発生過程での

局在

2 の結果から得られた wnt 遺伝子の心内膜床形成過程での発現を in situ ハイブリダイゼーション法、RT-PCR 法により調べた。

(4) wnt と BMP の協調作用機構

wnt と BMP の協調作用により、心内皮細胞にどのような変化が起こっているのかを明らかにするため、in vitro で培養した心内皮細胞の培養系に wnt と BMP を添加して培養し、心内皮細胞に発現してくる遺伝子を DNA チップにより網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) ニワトリ胚心臓に発現する wnt

wnt ファミリーの間で保存された領域に対してプライマーをデザインし、ニワトリ胚心臓に発現する wnt 遺伝子の単離を行った。その結果、wnt2b (wnt13)、wnt4、wnt5a、wnt5b、wnt7a、wnt8c が単離できた。しかしながら、すでにニワトリ胚心臓での発現の報告があった wnt6、wnt11 は単離できなかった。このことは、このプライマーを用いたクローニングでは胚心臓に発現するすべての wnt をクローニングできない可能性を示している。そこでこの時のクローニングで得られなかった既知 wnt について、 $\beta$ -カテニン系のシグナルを活性化する wnt、また機能が明らかでない wnt のクローニングを胚全体から行った。最終的に単離した wnt 遺伝子は、wnt2、wnt2b (wnt13)、wnt3a111、wnt4、wnt6、wnt8c、wnt9a (wnt14)、wnt11 であった。

(2) 活性のある wnt のスクリーニング

1 で得られた wnt 遺伝子を発現ベクターの pCS2+ に組み込み、器官培養系用いてその活性をスクリーニングした。コラーゲンゲル上で培養している心内皮細胞に wnt 遺伝子を導

入し発現させ、培養液中に BMP を添加した後、24 ~ 48 時間培養し観察した。その結果、wnt2、wnt2b (wnt13)、wnt3aIII、wnt4、wnt8c、wnt9a (wnt14) を遺伝子導入したときには心内皮細胞が形質転換し、コラーゲンゲル内に間葉が観察できた。

### ( 3 ) 胚心臓形成過程での wnt 遺伝子の発現

2 で活性のあった wnt2b (wnt13)、wnt3aIII、wnt8c、wnt9a (wnt14)、さらに房室管領域での発現が報告されていた wnt6、wnt11 の心内膜床形成過程 (ステージ 14 ~ 18) での発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を使って調べた。その結果、wnt6、wnt11 は房室管領域の心筋細胞に発現していたが心内皮細胞では検出できなかった。一方、wnt9a は房室管領域の心内皮細胞に発現が観察できた。その他の wnt については検出できなかった。これらの wnt に対しては胚心臓を流出路、心室、房室管、心房に切り分けて RNA を抽出した後、各領域に対して RT-PCR をおこない発現を調べた。その結果、wnt3aIII は、他の領域にくらべ房室管領域に多く発現していたものの、その発現量はきわめて少なかった。wnt8c は心房領域に強く、房室管、心室に弱い発現が見られた。wnt2b は RT-PCR 法でも検出できなかった。以上の結果と生物検定の結果を合わせて考えると房室管領域の心内皮細胞に発現していた wnt9a が BMP とともに働く因子の候補として考えられる。wnt2 と wnt4 については、これらの遺伝子のノックアウトマウスでは心臓に異常が見られないが、ニワトリ胚での発現を調べる必要があると考えている。今回の研究では、房室管領域の心筋に発現し、同時に形質転換活性を持つ wnt 遺伝子は検出できなかった。しかしながら、未知の wnt 遺伝子、または wnt シグナルを活性化する未知の因子が心筋に存在する可能性も考えられ

る。

### ( 4 ) wnt と BMP の協調作用機構の解析

wnt と BMP の協調作用により、心内皮細胞に誘導される遺伝子を網羅的に解析した。その結果、転写因子、成長因子、細胞外基質、細胞骨格の調節因子、タンパク分解酵素などが得られた。研究代表者は、sox 遺伝子群、なかでも sox9 に注目し心内膜床形成での役割を明らかにすることを試みた。sox は sry (sex-determining region Y) で見つかった DNA 結合領域 (HMG-box) 配列をもつ転写因子群である。これまでに sox9 の遺伝子欠損マウスでは心臓形成異常が報告されていた。そこでニワトリ胚より sox9 遺伝子をクローニングし、心臓発生過程での sox9 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を使い解析した。その結果、心内膜床形成の始まるステージ 16 では流出路と房室管領域の心内皮細胞、そして流出路心筋細胞に sox9 mRNA が検出された。ステージ 18 になると流出路と房室管の心内皮細胞と間葉に強い発現が認められた。この発現はステージ 23 でも同様であった。ステージ 27 では心内膜床の心内皮細胞と間葉のほかに、房室管周囲の心外膜にも発現が見られた。ステージ 30 になると弁の心内皮細胞とその下層の間葉に sox9 遺伝子の弱い発現が観察された。以上の結果から、sox9 は心内膜床形成過程で心内皮細胞の形質転換直前の時期に心内皮細胞に発現し、その後心内皮細胞と間葉に発現することが明らかになった。このことは sox9 の発現が形質転換シグナルにより直接誘導されている可能性を示唆している。またノックアウトマウスの結果と併せて考えると、心内皮細胞の間葉への形質転換過程に直接関与している可能性がある。今後 sox9 がどのように心内

皮細胞の形質転換に関わっているか検討する必要があると考えている。

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1件)

Yamagishi T, Ando K, Nakamura H. Roles of TGF and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. Anat Sci Int. 2009

[学会発表](計14件)

山岸敏之、中島裕司、安藤克己、米山克美、中村裕昭 心内膜床形成過程で起こる上皮間葉形質転換での sox9 の役割。第114回 日本解剖学会全国学術総会、2009.3.30 岡山

Yamagishi T, Nakajima Y, Ando K, Sakabe M, Nakamura H. Expression pattern of sox9 gene during chick heart development. Society for Developmental Biology. 2008. 7.28 Philadelphia.

山岸敏之、中島裕司、安藤克己、坂部正英、米山克美、中村裕昭、ニワトリ胚心臓発生過程における sox9 の発現。第113回 日本解剖学会全国学術総会、日本解剖学会全国学術総会、2008.3.29 大分

安藤克己、中島裕司、山岸敏之、米山克美、今中恭子、吉田利道、中村裕昭。積層再構築による冠状動脈形成期の大動脈中膜に関する検討。第113回日本解剖学会全国学術集会 2008.3.29 大分。

山岸敏之、安藤克己、中村裕昭：心臓弁や

中隔原基形成のメカニズム：心内膜床形成での TGF スーパーファミリーの役割。第112回 日本解剖学会全国学術総会 「循環器系の形態形成とその制御機構」 招待講演。2007.3 大阪。

山岸敏之、安藤克己、中村裕昭：心臓の弁や中隔の形づくり：胚心臓の心内膜床形成のしくみ。発生学懇話会、2007.3 大阪。

坂部正英、松井宏子、坂田大和、池田一雄、山岸敏之、中島裕司：心臓弁や中隔の原基である心内膜床形成における Rho-kinase(ROCK)の役割と発現制御。第112回 日本解剖学会全国学術総会、2007.3 大阪。

松井宏子、坂部正英、坂田大和、池田一雄、山岸敏之、中島裕司：FGF8b は胞胚初期に nodal と協調的に作用し心臓中胚葉を誘導する。第112回 日本解剖学会全国学術総会、2007.3 大阪。

Yamagishi T, Nakajima Y, Nishimatsu S, Nohno T, Ando K, Sakabe M, Nakamura H. Expression patterns of tbx genes during chick atrial development. Experimental Biology. 2007.4 San Francisco.

Sakata H, Sakabe M, Mastui H, Kawada N, Nakatan K, Yamagishi T, Nakajima Y. Rho kinase inhibitor Y27632 affect initial heart myofibrillogenesis in cultured chick blastoderm. American Society for Cell biology 46th Annual Meeting. 2007. 12 San Diego

Sakabe M, Sakata H, Matsui H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. ROCK1 expression

is regulated by TGF  $\beta$  3 and ALK2 during valvuloseptal endocardial cushion formation. American Society for Cell biology 46th Annual Meeting. 2007. 12 Washington DC.

Matsui H, Sakabe M, Sakata H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Induction of smooth muscle alpha-actin positive heart mesoderm is regulated by combined Nodal and FGF8 function in avian pregastrula epiblast. 2nd The International Research Educational Institute for Integrated medical Sciences. 2006.12 Tokyo.

Sakabe M, Matsui H, Sakata H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Rho kinase (ROCK) in valvuloseptal endocardial cushion tissue formation. 2nd The International Research Educational Institute for Integrated medical Sciences. 2006.12 Tokyo.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山岸 敏之 (YAMAGISHI TOSHIYUKI)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60255122

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし