

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591215
 研究課題名（和文）：レチノイン酸の母体投与による内臓逆位および大血管転位モデルマウスの遺伝子解析
 研究課題名（英文）：Gene analysis of mouse models of visceral heterotaxy syndrome and transposition of the great arteries induced by maternal administration of retinoic acids.
 研究代表者
 白石 公 (SHIRAISHI ISAO)
 国立循環器病センター研究所・小児循環器診療部・部長
 研究者番号：80295659

研究成果の概要：妊娠マウス（胎生 6.5 日から 9.5 日）にレチノイン酸を投与し、胎仔に内臓錯位症候群、単心室、単心房、共通房室弁口、左心低形成、総動脈幹症、完全大血管転位、ファロー四徴症、大動脈離断、大動脈弓異常などの、幅広いスペクトラムの複雑心奇形のモデルを作製することができた。二次心臓領域および心臓流出路の遺伝子発現のプロファイルを DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR で確認したところ、レチノイン酸投与により心臓流出路および二次心臓領域で発現が低下および亢進する遺伝子群が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：先天性心疾患、心臓形態形成、レチノイン酸、催奇形、遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は新生児死亡原因のなかで最も多い原因の一つで、遺伝的要因、環境要因、母胎感染、薬物服用など様々な原因によって起こりうる。最近の発生工学の発達により、心臓形態形成を制御する転写因子や成長因子のカスケードがかなり明らかになってきた。心臓形態形成を理解することは先天性

心疾患の病因を知るにとどまらず、障害された心筋組織の再生医療にもつながる重要な研究分野である。

2. 研究の目的

今回の研究では、レチノイン酸投与により発症する心奇形モデルマウスを有効に利用して、レチノイン酸により異常が発症する部位

を micro-dissection して、コントロールとの遺伝子発現の差を DNA microarray を用いて検索する。また得られた microarray の結果から、心室流入路および流出路の形成に critical な遺伝子の候補を新たに見つけ出す。そのうち形態形成に重要と考えられるものを whole-mount in situ hybridization によりその発現様式を確認する。これまで報告されていない遺伝子が見つければ、マウス胚外培養法を応用して、antisense oligonucleotide もしくは siRNA を用いて阻害実験を行ってみる。更に可能であればノックアウトマウスを作製して、in vivo での機能解析を行う。

3. 研究の方法

平成19年度

1) レチノイン酸投与マウスの作成と心奇形および腹部臓器奇形の診断

a) ICR系妊娠マウス6.5日齢にレチノイン酸を15mg/kg腹腔内に投与する。胎生17.5日に胎仔を取り出し、実態顕微鏡下に腹部臓器および心臓の奇形を診断する。個体は150-200解析する。

b) ICR系妊娠マウス8.5日齢にレチノイン酸を70mg/kg腹腔内に投与する。胎生17.5日に胎仔を取り出し、実態顕微鏡下に腹部臓器および心臓の奇形を診断する。個体は150-200を目標に解析する。

全ての胎仔は実態顕微鏡下で解剖し、詳細な写真を撮り病理診断に供する。

2) 心臓流出路および二次心臓領域における

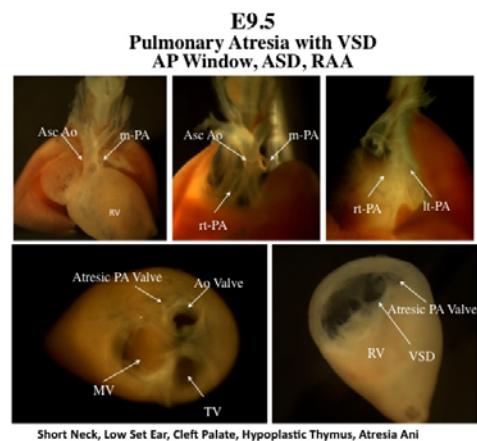
DNA microarrayによる遺伝子発現の検討
胎仔胚（正常コントロール、レチノイン酸投与）のaortic sac (AS), outflow tract (OFT), RV, LV-inflow tract, LA, RA, IVSを各々dissectionし、すぐさま凍結させる。心臓の各部分が最低で100個集めてRNAを抽出する。

3) real-time PCRによる定量化

Microarrayにより正常コントロールとの間に有意な発現量の差がみられ、形態形成に重要と考えられる遺伝子二関してはreal-time PCRを行い、mRNA発現量の差が有意なものかどうか定量検定する。

4. 研究成果

6.5日投与 (n=78) では、内臓錯位やCAVCなど左右軸と流入路障害およびTGA, DORV, PAなどの流出路異常が、6.75日投与 (n=12) の一部でHLHSが発症した。8.5日投与 (n=40) ではTGAやDORVなど動脈幹中隔の螺旋異常が、9.0日投与 (n=21) と9.5日 (n=32) 投与でPTA, TOF, AP windowなどの動脈幹中隔異常が各々28%と11%、RSCAなどの大動脈弓異常が55%と69%、胸腺異常が55%と75%発症した。

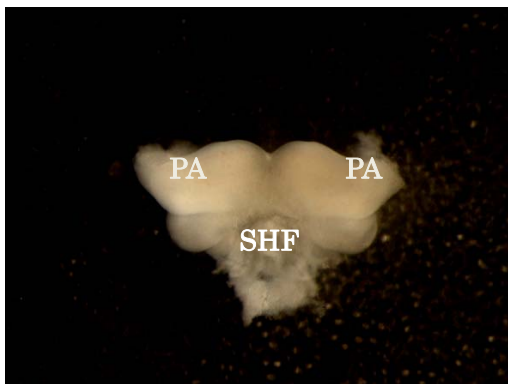


27-11

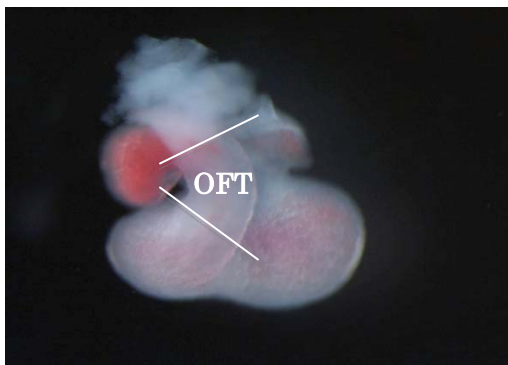
(上図) E9.5でのレチノイン酸投与に見られた大動脈-肺動脈窓を伴う肺動脈閉鎖兼心室中隔欠損の胎仔

流出路におけるDNAマイクロアレイ遺伝子解析では、9.5日投与の流出路では362の発現低下(<x0.5)と24の亢進(>x2.0)遺伝子が確認された。またreal-time PCRでは、Tbx1は内臓中胚葉-咽頭弓組織(内胚葉を含む)で高い発現がみられ、この部分ではRA投与群は対照群に比べて発現が低下(0.67倍)した。一方myocardinは主に心臓流出路で高い発現

がみられ、この部分では RA 投与群では対照群に比べてわずかに発現が亢進(1.19 倍)した。[結論]妊娠マウスへのレチノイン酸過剰投与により、ヒトの先天性心疾患に類似した似した幅広いスペクトラムを作製することが可能であった。RA 投与により心臓流出路および二次心臓領域で発現が低下(一部で亢進)する遺伝子群が明らかとなった。今後さらに研究を進め、RA 投与により引き起こされる心奇形の責任遺伝子を明らかにしてゆく予定である。



(上図) 二次心臓領域(SHF)と咽頭弓(PA)



(上図) 心臓流出路(OFT)

Gene profiles of the outflow tract of RA treatment at E9.5 24 Upregulated Genes (>x2.0)

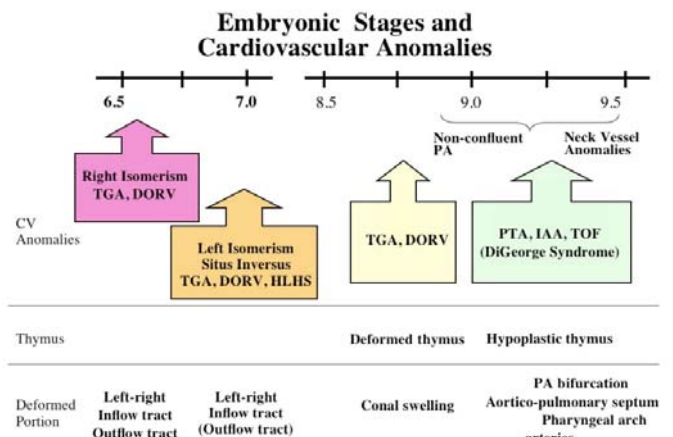
8.00	carnitine acetyltransferase	Crat
2.83	teratocarcinoma-derived growth factor	Tdgf1
2.64	cholecystokinin	Cck
2.46	TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Taf7
2.30	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L5	Uchl5
2.30	myocardin	Myocd
2.30	cyclin B1, related sequence 1	Ccnb1-rs1
2.14	kidney androgen regulated protein	Kap
2.14	ets variant gene 2	Etv2
2.14	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos
2.14	tropoin 1, skeletal, fast 2	Tnni2
2.14	mitochondrial ribosomal protein S5	Mps5
2.00	chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2
2.00	cell division cycle associated 8	Cdc8
2.00	adenosine monophosphate deaminase 2 (isoform L)	Ampd2
2.00	thioredoxin-like 2 /// similar to thioredoxin-like 2	Txn2
2.00	RKEN cDNA 4921513D23 gene	4921513D23
2.00	expressed sequence AL022943	AL022943

(上表) 母体へのレチノイン酸投与で胎仔の心臓流出路において発現が亢進した mRNA

Gene profiles of the outflow tract of RA treatment at E9.5 362 Downregulated Genes (<x0.5)

0.19	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	Arts1
0.19	hydroxysteroid dehydrogenase-2, delta(5)-3-beta	Hsd3b2
0.18	ribonuclease III, nuclear	Rnaseh
0.16	forkhead box F1a	Foxf1a
0.16	PHD finger protein 12	Phf12
0.14	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Nr2f2
0.14	homeo box B3	Hoxb3
0.13	fibulin 5	Fbln5
0.13	homeo box A3	Hoxa3
0.10	tumor-associated calcium signal transducer 1	Tacstd1
0.10	R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)	Rspo2
0.09	T-box 4	Tbx4
0.08	cysteine-rich secretory protein, LCGI, domain containing 2	Crispld2
0.07	double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1	Dcamk1l
0.07	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	Edg3
0.06	claudin 6	Cldn6
0.04	forkhead box A1	Foxa1
0.03	forkhead box G1	Foxg1
0.03	growth arrest specific 7	Gas7

(上表) 母体へのレチノイン酸投与で胎仔の心臓流出路において発現が低下した mRNA



(上図) これまでの結果のまとめ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) 白石 公, 山元康敏, 高松哲郎. 肺の発生とVEGF. (査読なし)分子呼吸器病2009;13:86-91.
- 2) 白石 公. 第3の心筋原基としての心外膜前駆細胞-多様な分化能と心筋再生の可能性-. 日本小児循環器学会雑誌. (査読なし)2008;24:615-619.

[学会発表] (計 1 件)

Shiraishi I, Moroshima M, Sanbe A, Hamaoka K. DiGeorge Syndrome-Like Outflow Tract Phenotype Induced by Maternal Administration with Retinoic Acid. Weinstein Cardiovascular Development Conference 2007 May8-10 (Indianapolis)

[図書] (計 1 件)

- 1) 先天性心疾患を理解するための心臓発生学. 編集, 山岸敬幸, 白石公. メジカルビュー社, 2007, 11. (総ページ数 227)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 公・国立循環器病センター(研究所)・部長

研究者番号 : 80295659

(2) 研究分担者

濱岡 建城・京都府立医科大学大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 30174410

(3) 連携研究者

森島 正恵・東京女子医科大学国際統合インスティテュート・助教

研究者番号 : 00241068