

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 -2008
 課題番号：19790740
 研究課題名（和文） 咽頭弓および血管系の発生における細胞内カルシウムシグナルの意義の
 解明
 研究課題名（英文） A role of intracellular calcium signaling during pharyngeal arch
 and vascular development.
 研究代表者
 内田 敬子（UCHIDA KEIKO）
 慶應義塾大学・医学部・共同研究員
 研究者番号：50286522

研究成果の概要：小児循環器診療の中で、先天性心疾患に合併して比較的頻度高く認められる大動脈の異常は、咽頭弓・血管系および咽頭弓動脈の発生異常から起因すると考えられる。本研究では、遺伝子改変マウスによる個体レベルでの解析や内皮細胞を用いた *in vitro* の解析によって、咽頭弓、血管系および咽頭弓動脈の発生に、イノシトール三リン酸受容体を中心とした細胞内シグナルが必須であることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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：発生・血管・咽頭弓・カルシウム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の咽頭弓は、顔面の骨・軟骨・筋肉、頸部内分泌腺、心臓流出路、大血管などを形成する胎生期特有の器官であり、この発生異常を原因とする先天異常は非常に多い。咽頭弓の発生について研究することは、先天異常の発症機構および発症予防を考える上で、小児科学において重要である。

脊椎動物の生命維持に必須である血液循環は、閉鎖血管系の発生によって確立する。閉鎖血管系は、原始血管叢の形成（*vasculogenesis*）とその後生じる既存血管からの新たな管腔形成（*angiogenesis*）の二

つの段階を経て成立し、これらの過程に機能する分子群が数多く単離されている。しかし、血管系の形成における細胞内シグナル伝達機構には未だ不明な点が多い。

細胞内のカルシウムは、様々な細胞内シグナル伝達の中心分子の一つであり、イノシトール三リン酸受容体（ IP_3R ）は、細胞内カルシウム動態を担う分子群の一つである。1型、2型、3型の3つのサブタイプがあり、1型 IP_3R はおもに小脳・大脳に発現して、脳の高次機能に関与し、2型、3型 IP_3R は唾液腺や膵臓の外分泌に遺伝的相補性を持って機能することが、ノックアウトマウスの解析から明ら

かにされた。一方、成体の血管内皮および血管平滑筋には1型IP₃Rが比較的多く発現し、血管内皮におけるNO産生や血管平滑筋の収縮に必要な細胞内Ca²⁺上昇に重要であることが報告されているが、血管系の発生におけるIP₃Rの役割については不明である。我々は予備的研究ですでに以下の結果を得、本研究の着想に至った。

(1) IP₃Rの1型と3型は発生初期の咽頭弓に比較的多く発現する。

(2) IP₃R1型3型ダブルノックアウトマウスでは血管発生と咽頭弓発生が障害される。

2. 研究の目的

咽頭弓、血管系および咽頭弓動脈の発生における1型、3型IP₃Rの役割を咽頭弓、血管系、咽頭弓動脈の形態学的、分子生物学的、細胞生理学的な解析を中心に、個体レベルおよび細胞レベルで解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 咽頭弓の発生におけるIP₃Rの役割

胎生8.5日から10.5日のマウス胎仔の咽頭弓の発生過程における1型、3型IP₃Rの発現様式をwhole mount in situ hybridization法や免疫組織化学法によって解析する。

1型、3型IP₃Rダブルノックアウトマウスにおける咽頭弓を構成する4つの細胞系譜(外胚葉、内胚葉、中胚葉、神経堤細胞)の分化をwhole mount in situ hybridization法により観察する。

1型、3型IP₃Rダブルノックアウトマウスにおける咽頭弓の細胞増殖能とアポトーシス活性の解析を行い、咽頭弓の低形成の原因を明らかにする。

(2) 血管系発生におけるIP₃Rの役割

卵黄囊血管や胎盤血管を含む胎仔血管における1型、3型IP₃Rの発現様式をwhole mount in situ hybridization法により明らかにする。

1型、3型IP₃Rダブルノックアウトマウスにおける卵黄囊血管や胎盤血管を含む

胎仔血管の構築を血管マーカーの免疫染色で可視化し、異常を明らかにする。

1型、3型IP₃Rダブルノックアウトマウスにおけるvasculogenesis、angiogenesisの各種マーカーの発現様式をwhole mount in situ hybridization法や免疫組織化学法によって明らかにする。

(3) 血管内皮細胞におけるIP₃Rの役割

IP₃R阻害薬存在下、非存在下で培養血管内皮細胞(human umbilical venous endothelial cells, HUVEC)を用いた血管形成能を比較した。

4. 研究成果

(1) 咽頭弓の発生におけるIP₃Rの役割

whole mount in situ hybridization法により、胎生8.5日から10.5日のマウス胎仔の咽頭弓、卵黄囊血管および胎盤血管を含む胎仔血管における1型および3型IP₃Rの発現様式を観察した。1型は、胎生8.5日から咽頭弓に発現し胎生10.5日まで発現が維持されていた。3型も胎生8.5日から咽頭弓に発現し、胎生10.5日には咽頭弓と末梢血管に比較的高く発現していた。

咽頭弓を構成する4つの細胞系譜のうち、外胚葉マーカー(BMP4, Fgf8, ET1)、内胚葉マーカー(Nkx2.5, Nkx2.6)、中胚葉マーカー(Tbx1, Fgf10)の発現は維持されていたが、神経堤細胞マーカーの一部の発現が低下していた。

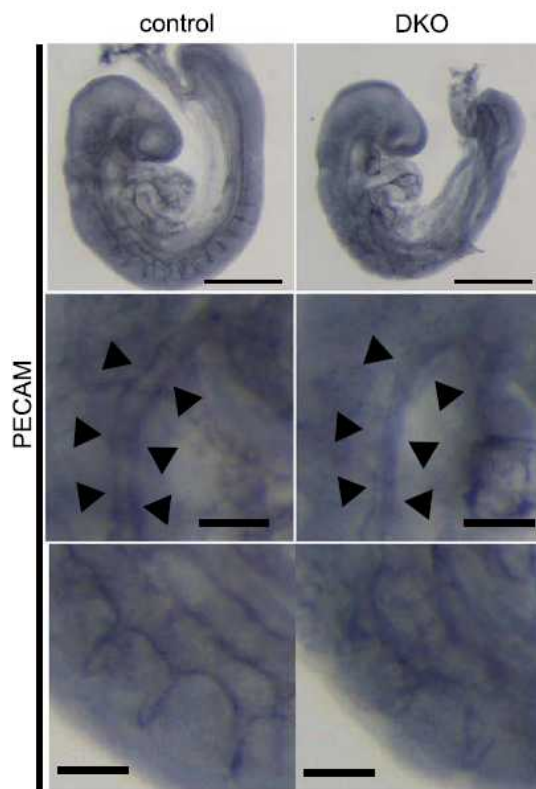
1型、3型IP₃Rダブルノックアウトマウスの咽頭弓でアポトーシス活性が亢進した。

(2) 血管系発生におけるIP₃Rの役割

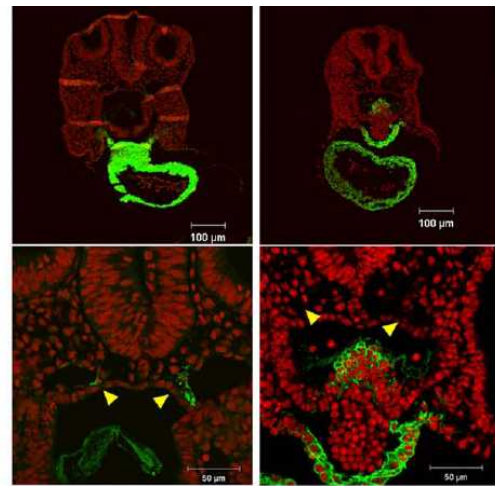
whole mount in situ hybridization法および定量PCR法により1型、3型IP₃Rの発現を解析したところ、1型、3型ともに胎仔に

比べ卵黄嚢や胎盤に高い発現を認め、卵黄嚢の中でも特に血管内皮細胞に1型および3型 IP_3R が共発現していた。

実体顕微鏡下に観察したところ、1型、3型 IP_3R ダブルノックアウトマウスでは胎生9.5日に卵黄嚢上の原始血管叢の形態異常が認められた。抗血管内皮マーカ(PECAM)抗体による whole mount immunohistochemistry (IHC)を行った。1型、3型 IP_3R ダブルノックアウトマウスにおいて、胎生9.0日の卵黄嚢上で原始血管叢は形成されるが、その後のリモデリングが障害されていることが確認された。



抗血管内皮マーカ(PECAM)抗体、抗血管平滑筋マーカ(smooth muscle actin, SMA)抗体、抗 VEGF 抗体による切片 IHC を行ったところ、胎生9.5日の胎仔背側動脈における SMA の発現低下が認められた。



(3)血管内皮細胞における IP_3R の役割

HUVEC を用いた血管形成能 (in vitro tube formation assay) を IP_3R 阻害薬 (2 Aminoethoxydiphenyl borate, 2APB) 存在下、非存在下 (DMSO) で比較した。 IP_3R 阻害薬投与を行っても管腔形成能は変わらず維持されていた。

(4)研究成果のまとめ

本研究の目的である咽頭弓と血管系の発生における IP_3R の役割を解明するための基礎となる IP_3R の咽頭弓と血管における発現を確認できた。また、1型、3型 IP_3R ダブルノックアウトマウスの咽頭弓の低形成と神経堤細胞マーカの発現低下、アポトーシスの更新が認められた。さらに、1型、3型 IP_3R ダブルノックアウトマウスの血管異常を再現性をもって確認し、胎仔の発育遅延が顕在化する前に既に卵黄嚢上で血管のリモデリング異常が生じているという結果を得た。この結果は、1型と3型 IP_3R が、既存血管からの新たな管腔形成 (angiogenesis) に重要な役割を持つ可能性を示唆する。以上より、 IP_3R は咽頭弓発生および血管リモデリングに必須であることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計1件)

1. 内田敬子

Redundant roles of type 1 and 3 inositol
1, 4, 5-trisphosphate receptors for
vascular development

Weinstein Cardiovascular Development
Conference

平成20年5月15日

米国

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田敬子 (UCHIDA KEIKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50286522

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者