

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591383

研究課題名（和文）CSPG2 遺伝子の胎生期心臓血管形成における役割

研究課題名（英文）The role of Cspg-2 gene in embryonic cardiovascular development

研究代表者

中岡 隆志（NAKAOKA TAKASHI）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80241256

研究成果の概要（和文）：*hdf* マウスにおいては *Cspg2* 遺伝子の発現が障害されており、胎生期心臓血管形成における *Cspg2* 遺伝子の機能を解明するための格好のモデルマウスである。*hdf* マウス胎仔において *Is11* の発現する第 2 次心臓領域細胞群が減少し、特に体幹部背側で血管形成が障害されている事が明らかとなった。神経管上皮から神経堤細胞への形質転換は野生型と同様に起きているが、*hdf* マウス胎仔においては形質転換した神経堤細胞が障害されていると考えられた。*Cspg2* 遺伝子のコードするバーシカン（Versican）は胎生初期に頭部間充織において細胞を細胞死から保護し、神経堤細胞や第 2 次心臓領域の細胞群に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The expression of the *Cspg2* gene, which encodes the extracellular matrix protein, versican, is disrupted in the heart defect (*hdf*) mouse. Therefore, the *hdf* mouse is a good model to examine the function of *Cspg2* gene in embryonic cardiovascular development. The vascular formation was disrupted particularly at the dorsal region of the *hdf* embryos and that the second heart field segment was diminished in *hdf* embryos. The initial delamination of the neural crest from the neural tube epithelium appeared to be normal, however, the transformed neural crest cells were disrupted in *hdf* mouse embryos. Versican, may protect cephalic mesenchyme from massive apoptosis, thereby contributing to the neural crest cells and the cells in second heart field.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 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：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学、先天異常学・奇形学

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は出生 1000 人に対し約 4-10 人の割合で生じ、特に流出路異常に関連するものが多いことが知られている。従って胎生期心臓流出路形成の分子機構を理解することは、先天性心疾患の発症機序を解明する重要な糸口を与えてくれることが期待される。

近年、胎生期心臓形成過程で左右の心原基が正中で癒合して出来る直線状管腔構造、所謂一次心臓領域(primary heart field)の他に、二次心臓領域(second heart field)や神経提細胞(neural crest cell)が相互に影響し合い、その形成に大きく関わっていることが明らかにされてきている。

hdf マウスは細胞外マトリックスタンパク質バーシカンをコードする *Cspg2* 遺伝子の発現障害のため心臓流出路の形成不全を生じ胎生致死に至る。*hdf* マウスは胎生期心臓血管形成における *Cspg2* 遺伝子の機能を解析するのに非常に適したモデルマウスと考えられた。

2. 研究の目的

hdf マウスは細胞外マトリックスタンパク質バーシカンをコードする *Cspg2* 遺伝子の発現障害のため心臓流出路の形成不全を生じ、胎生致死に至る。*hdf* マウスにおいて心臓流出路の形成に寄与する二次心臓領域と神経提細胞及び血管構築に関して解析し、*Cspg2* 遺伝子の胎生期心臓血管形成における役割について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 胎仔の胎齢は交配を確認した日の正午を E0.5 として示し、ジェノタイピングは F1: ccataaagcctgtgtgaaatgcc、B1:cagggttactgacagtccaagctc 及び B2: aactcctttctggaataccccatcc の 3 種類のプライマーを用いた PCR 法によって行った。*hdf* と野生型の胎生 8.5 日 (E8.5) から E9.5 までの胎仔を採取し、抗 Flk-1(Fetal Liver Kinase1) 及び抗 PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 抗体 (血管内皮細胞) とマウス血管平滑筋の抗体 1A4 を用いて免疫染色を行った。

(2) Whole mount In situ ハイブリダイゼーションは Moorman らによるプロトコールに従い(J Histochem Cytochem **49**:1-8, 2001)、ジゴキシゲニン標識リボプローブを用いて行った。Whole mount In situ ハイブリダイゼーションのプローブは *Isl-1*、*Tbx5*、*Fgf-8* (二次心臓領域マーカー) と *Crabp1*、*ErbB3* 及び *Cdh6* (神経提細胞マーカー) を用いた。ホールマウントでジゴキシゲニン標識 UTP リボプローブでハイブリダイゼーションを行いアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と反応させた後 NBT/BCIP 液を用いて室温で青く発色させた。

(3) アポトーシスは LysoTracker を用いた方法と TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling technique) 法によって検出した。細胞増殖は抗リン酸化ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色によって検討した。

(4) E9.5-E10 の胎仔を胎盤と一緒に取り出し、胎盤から臍帯を通して胎仔に Ink を注入することで *hdf* マウス胎仔と野生型胎仔の血管の可視化を行った。

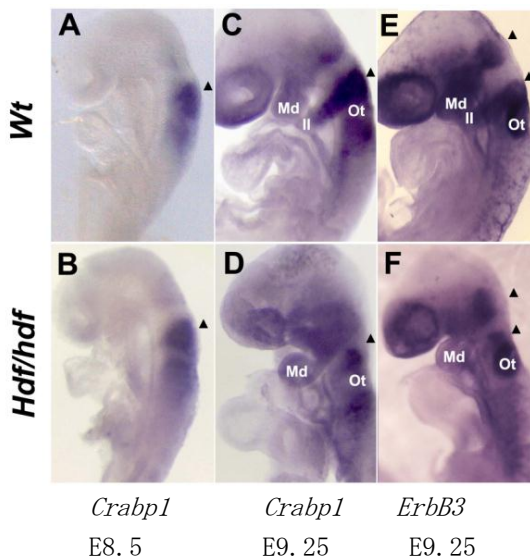
4. 研究成果

(1) 抗 Flk-1、抗 PECAM-1 抗体 1A4 抗体による Whole mount 免疫染色と Ink 注入の実験によって E9.5 *hdf* マウス胎仔において血管形成が障害されていることが判明した。血管傷害は特に体幹部背側で顕著であった。

(2) *hdf* マウス胎仔の *Fgf-8* の発現パターンは野生型と大きな違いはなかったが、*Isl-1* 及び *Tbx5* の発現は著明に減少しており組織標本と併せて *hdf* マウス胎仔において *Isl1* 陽性二次心臓領域の細胞群が減少している事が示唆された。

(3) E8.5 では *Crabp1* 発現神経提細胞が *hdf*、野生型ともに後脳 (hindbrain) 間充織 (mesenchyme) に認められ、上皮-間葉転換における神経提細胞への分化はホモ接合体においても正常に起こっていると考えられた。一方 E9.25 では野生型マウスでは神経提細胞の *Crabp1* と *ErbB3* の発現が鰓弓に向かって帯状に認められたが、*hdf* マウス胎仔においては *Crabp1* と *ErbB3* ともに帯状の発現パターンは認められなかった。このことから

Cspg2 遺伝子でコードされる細胞外マトリックスタンパク質バーシカン[®]は形質転換した神経堤細胞機能に必要であると考えられた(下図)。



(4) LysoTracker 法と TUNEL 法の両方の結果から E9.5 の *hdf* ホモ接合体の頭部間充織に於いてアポトーシスが著明に増加していることが判明した。抗リン酸化ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色細胞増殖が低下していることも判明し、これらの結果からバーシカンは間充織の細胞の維持にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

今後は電顕による解析等も加えて *Cspg2* 遺伝子の胎生期心臓血管形成における役割を細胞レベルでも明らかにしていきたい。

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 7 件)

① 高部智哲、宮川一富田幸子、中岡隆志 (他 4 名、2 番目と 7 番目) 神経堤細胞におけるバーシカンの意義 東京女子医科大学雑誌 in press, 2012

② Takahashi N, Nakaoka T, Yamashita N. Profiling of immune-related microRNA expression in human cord blood and adult peripheral blood cells upon

proinflammatory stimulation. Eur. J. Haematol. 88 巻 31-38, 2012

③ Ando K, Takahashi M, Miyagawa-Tomita S, (他 4 名、4 番目) Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. Differentiation 81 巻 299-306, 2011

④ Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, (他 4 名、2 番目) Effects of transforming growth factor- β 3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. Am. J. Vet. Res. 72 巻 194-202, 2011

⑤ Kudo Y, Kaneko M, Nakazawa M, Tomita S. A case of Cor Triatriatum with an abnormal P wave: The pacemaker action from the specialized tissue in the abnormal septum. Pediatric Cardiology 32 巻 1244-1248, 2011

⑥ Asai R, Miyagawa-Tomita S, (他 9 名、10 番目) Endothelin receptor Type A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field and later implicated in chamber myocardium formation. Development 137 巻 3823-3833, 2010

⑦ Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Buckingham ME, (他 3 名、2 番目) Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. Circulation Research 106 巻 495-503, 2010

[学会発表] (計 12 件)

① 牧野智行、宮川一富田幸子、(他 3 名、2 番目) ヒストンメチラーゼ G9a および GLP の心筋細胞特異的欠損マウスにおける心臓形態形成異常の解析. 第 34 回日本分子生物学会、2011. 12. 13-16, 横浜

② Miyagawa-Tomita S, Arima S, Kurihara

H. Novel roles of the neural crest in coronary artery formation through endothelin signaling. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Working symposium, 2011.12.13-16, 横浜

③ 中岡 隆志、大塚 邦明「臨床時間生物学の現状と展望」高齢者の健康に対する時間生物学的検討第18回日本時間生物学会学術大会, 2011.11.25, 名古屋

④ Yuichiro Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, 他7名、2番目 Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A receptor knockout mice. Scientific Sessions of the American Heart Association 2011.11.12-16, Orlando, FL, USA

⑤ Yuichiro Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, (他7名、2番目) Neural crest cells contribute to coronary artery development through endothelin signaling. 第19回 日本血管生物医学学会学術集会 2011.11. 8-10, 東京

⑥ Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, (他3名、2番目) Hesr2 disrupted mice develop aortic valve disease with advancing age. Weinstein Cardiovasc Developmental Meeting. 2011年5月 5-7日 Cincinnati, Ohio, USA

⑦ Asai R, Miyagawa-Tomita S, (他5名、6番目) Endothelin receptor type-A expression defines a distinct subdomain, within the heart field and contributes to chamber myocardium. Weinstein Cardiovasc Developmental Meeting. 2011. 5. 5-7, Cincinnati, Ohio, USA

⑧ Imanaka Y, Miyagawa-Tomita S (他5名、7番目) Matricellular protein, tenascin-C, may regulate proepi/epicardial cell function during coronary vessel development. 2011. 5. 5-7,

Cincinnati, Ohio, USA

⑨ Imanaka-Yoshida K, Miyagawa-Tomita S (他4名、6番目) Tenascin C may regulate recruitment of mural cells during coronary arterial development. Weinstein Cardiovascular Development Conference 2010. 5. 20-22, Amsterdam, Netherland

⑩ Obayashi K, Miyagawa-Tomita S (他4名、2番目) TGF- β 3 and MMP3 contribute to pathogenesis of myxomatous mitral valve in canine. Weinstein Cardiovascular Development Conference 2010. 5. 20-22, Amsterdam, Netherland

⑪ Asai R, Miyagawa-Tomita S (他8名、9番目) Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium, Weinstein Cardiovascular Development Conference 2010. 5. 20-22, Amsterdam, Netherland

⑫ Vincent SD, Miyagawa-Tomita S, Buchingham M. The transcriptional repressor prdm1/blimp1 is required within the second heart field for the morphogenesis of the distal outflow tract, Weinstein Cardiovascular Development Conference 2010. 5. 20-22, Amsterdam, Netherland

〔図書〕(計 1 件)

竹内 純, 宮川-富田幸子, (他2名、2番目), 中外医学社, Annual Review 循環器 2011 心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子, 2011, pp1-16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中岡 隆志 (NAKAOKA TAKASHI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80241256

(2) 研究分担者

富田 幸子 (TOMITA SACHIKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：40231451

(2) 研究分担者

磯尾 直之 (ISO NAOYUKI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：80420214

(3) 連携研究者

なし