

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6月15日現在

機関番号：84404
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011年度
 課題番号：21591406
 研究課題名（和文）：レチノイン酸母体投与による大血管異常マウスでの二次心臓領域細胞の遺伝子異常の解析
 研究課題名（英文）：Gene expression of the secondary heart field cells of mouse model of congenital heart disease induced by maternal administration of retinoic acid
 研究代表者：白石 公（SHIRAISHI, ISAO）
 独立行政法人国立循環器病研究センター・小児循環器部・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）にレチノイン酸を経時的に細かく時間帯を分けて投与し、胎仔に無脾症候群や多脾症候群などの内臓錯位症候群、内臓全逆位、単心室、単心房、共通房室弁口、左心低形成、総動脈幹症、大動脈-肺動脈窓、兩大血管右室起始、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先天性心疾患モデルを作製することができた。その中でファロー四徴の原因となる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。

研究成果の概要：Maternal administration of retinoic acid (E6.5-E9.5) induce wide spectrum of congenital heart anomalies including heterotaxy syndrome, situs inversus totalis, univentricular heart, common atrioventricular connection, hypoplastic left heart, persistent truncus arteriosus, aorto-pulmonary window, complete transposition of the great arteries, tetralogy of Fallot, interrupted aortic arch, which are similar to human congenital heart disease. We analyzed gene expression of the secondary heart field and the cardiac outflow tract of this mouse model by using DNA microarray. We found various sort of genes up-regulated and down-regulated at these areas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：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、これまでも我々が報告してきた、母胎へのレチノイン酸投与により発症する複雑先天性心疾患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実態顕微鏡下に micro-dissection して、コントロールとの遺伝子発現の差を DNA microarray を用いて検索した。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重要な遺伝子の候補を新たに見つけ出す。

3. 研究の方法

- 1) これまで行ってきた研究と同様に、母胎へのレチノイン酸投与マウス胎仔の作成と先天性心疾患および腹部臓器奇形の診断を詳細に検討する。
- a) ICR系妊娠マウス6.5日、6.75日、7.0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、8.75日、9.0日、9.25日、9.5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。

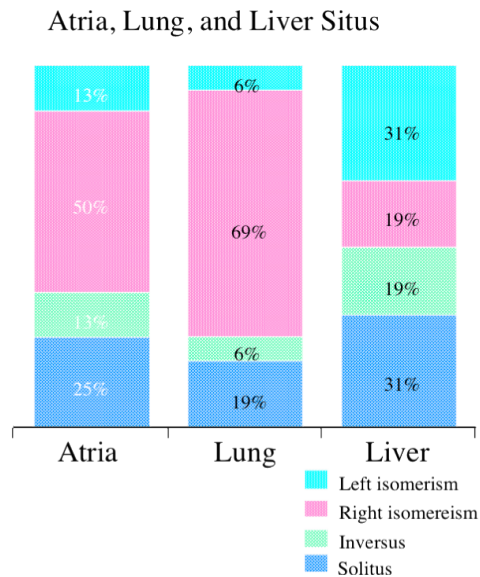
- 2) 心臓流出路および二次心臓領域における DNA microarray による遺伝子発現を検討する。胎仔胚（正常コントロール、レチノイン酸投与）の aortic sac (AS), outflow tract (OFT), RV, LV-inflow tract, LA, RA, IVSを各々 dissection し、すぐさま凍結させる。心臓の各部分が最低で100個集めてRNAを抽出する。
- 3) real-time PCRによる定量化
Microarrayにより正常コントロールとの間に有意な発現量の差がみられ、形態形成に重要と考えられる遺伝子に関してはreal-time PCRを行い、mRNA発現量の差を定量化する。

4. 研究成果

6.5日投与 (n=78) では、無脾症候群を中心とした内臓錯位や共通房室弁口など左右軸と流入路障害および完全大血管転位、 両大血管右室起始、肺動脈閉鎖などの流出路異常が、6.75日投与 (n=12) の一部では、左側相同や左心低形成が発症した。7.0-8.0日ではマウス胎仔は全例胎生致死となった。8.5日投与 (n=40) では完全大血管転位や両大血管右室起始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) 投与で総動脈幹遺残、ファロー四徴、大動脈肺動脈窓などの動脈幹中隔異常が各々28%と11%、左鎖骨下動脈起始異常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。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。また神経堤細胞の郵送に重要な役割を果たす double cortin は 2 次心臓領域で強い発現が認められ、RA 投与群で低下する傾向が見られた。

[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。

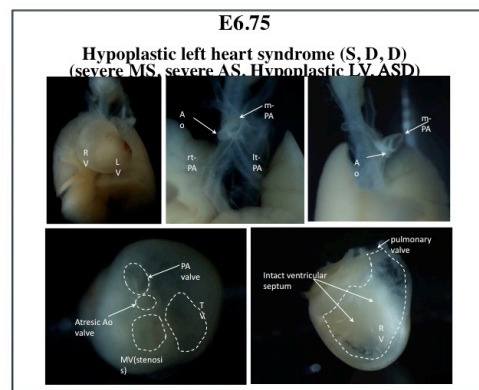
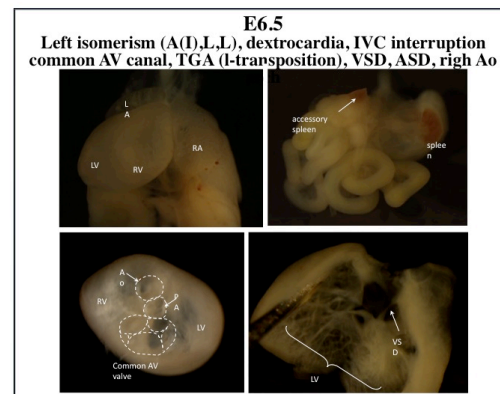
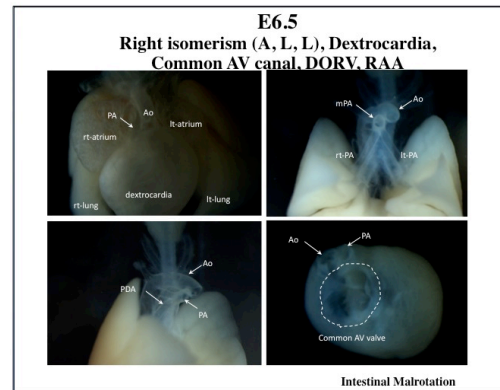


Segmental Combination of Visceral Organs and Heart

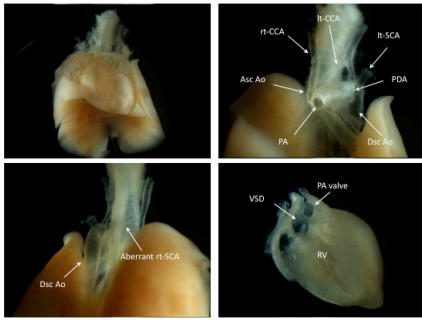
Segmental Sets	No. of Cases	% of Series
{A(S),D,D}	2	9%
{A(I),D,D}	1	5%
{A(I),L,L}	2	9%
{A,D,D}*	12	55%
{A,L,L}	4	18%
{A,D,L}	1	5%

(N=22)

*Including 2 cases with left isomerism of atria.
(Day 17 of gestation)



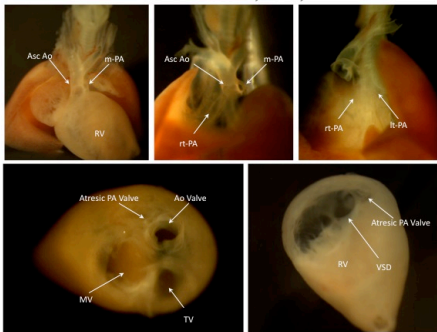
E9.0
**Persistent Truncus Arteriosus (Type I),
 Hypoplastic Ascending Aorta, Interrupted Aortic Arch (Type B)
 VSD, Aberrant RSA**



Cleft Palate, Short Tail, Deformed Spleen, Intestinal Malrotation

36-2

E9.5
**Pulmonary Atresia with VSD
 Small AP Window, ASD, RAA**



Short Neck, Low Set Ear, Cleft Palate, Hypoplastic Thymus, Atresia Ani

(上図) E6.5~E9.5でのレチノイン酸投与に見られた胎仔の先天性心疾患とその頻度

Lefty and Nodal are randomized in RA-treated embryos

Treated at E6.75 (N=4)				Treated at E7.0 (N=12)			
Situs	Heterozygous	Situs	Heterozygous	Situs	Inversus	Right isomerism	Left isomerism
Solitus	Solitus	Solitus	Solitus	Solitus	Inversus	Right isomerism	Left isomerism
3	1	2	2	1	1	1	3
(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

(No.) Number of cases with cardiovascular anomalies

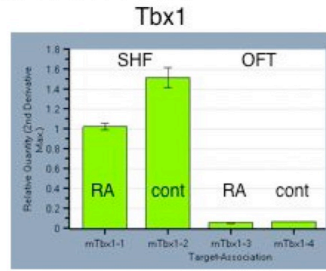
Cardiovascular Anomalies with Heterozygosity							
Atresia	SVC	Aortic arch & Ductus	Cardiac Septa	AV valve anomalies	OPV/overturn	Conus	Others
Solitus (N=1)	Right	Right AA & Left ductus	D	Common valve	DCRV with PAA	Bilateral	LSCA retroesophageal Left HV*
Right isomerism (N=2)	Right	Left AA & ductus [†]	L	Common valve	DCRV (with PS)	Bilateral	Left HV Single LV
Left isomerism (N=3)**	Left	Right AA & ductus [†]	D [†]	Common valve	TOF	Aortic [†] Pulmonary [†]	Bilateral HV [†] Retroesophageal LSCA [†] or BSCA [†]

[†]DC: ductal communication
^{**} Another case with left isomerism was a dead fetus with right aortic arch whose intracardiac anomalies were unknown (not available for dissection)

(上図) 左側決定因子である Lefty, Nodal の in situ hybridization. これらの因子が RA 投与群では左右 random に発現が見られた。

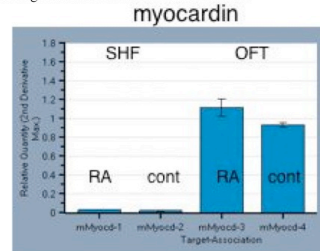
Expression of Tbx1

- Tbx1 is a responsible gene that induce cardiac abnormalities in 22q11.2 deletion syndrome (Nature, 2001;410:97-101).
- Tbx1 is a downstream target of Tbx1 are Fgf8 and Fgf10 (Development, 2004;131:5491-502).



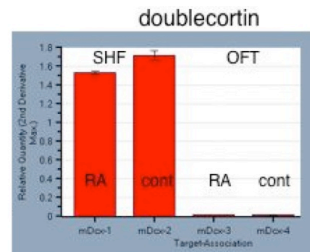
Expression of Myocardin

- Myocardin acts as coactivator for serum response factor, which plays a key role in vascular smooth muscle cell differentiation and cardiovascular development.
- Myocardin is expressed in cardiac myocytes and smooth muscle cells and its expression begins in the cardiac crescent at E7.75.



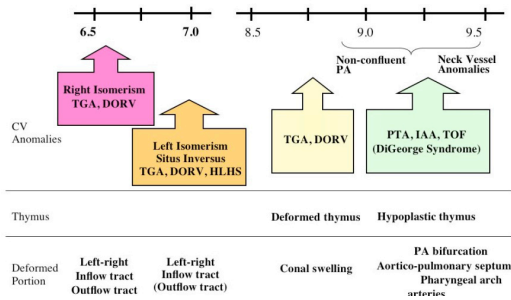
Expression of Doublecortin

- Doublecortin is a microtubule-associated protein necessary for neuronal migration.
- DCX is one of the responsible gene for human lissencephaly.



(上図) Tbx1, myocardin, double cortin の遺伝子発現 (real-time PCR) .

Embryonic Stages and Cardiovascular Anomalies



(上図) RA 投与による心奇形発症スペクトラムのまとめ。

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2件)

- 1) 白石 公. 第74回日本循環器学会学術集会「Maternal Administration of Retinoic Acid Induces Wide Variety of Complicated Congenital Heart Disease in Mice Embryos」2010年3月7日(日), 神戸.
- 2) Shiraishi I. “Current Topics of Cardiac Embryology for Congenital Heart Disease” 第5回 China-Korea-Japan Pediatric Heart Forum. 2009.9.10-11, Beijing.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)
該当なし

取得状況 (計0件)
該当なし

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 公・独立行政法人国立循環器病センター・小児循環器部・部長
研究者番号：80295659

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

森島 正恵・東京女子医科大学発生解剖学教室・特任助教
研究者番号：00241068