

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791004

研究課題名(和文)

心臓・大血管発生におけるイノシトール三リン酸受容体の組織特異的機能の解明

研究課題名(英文)

Tissue specific roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors for cardiovascular 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(和文):

イノシトール三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) の 3 種のサブタイプのうち、1 型および 3 型 IP<sub>3</sub>R を同時に欠損させたダブルノックアウト(1/3DKO)マウスは心臓血管発生異常をきたす。組織マーカーの発現解析と組織特異的 1/3DKO マウスの解析により、1 型・3 型 IP<sub>3</sub>R は、右心室から心臓流出路の発生において二次心臓領域のうち Tbx1 非発現領域で機能すると考えられた。さらに、血管内皮細胞に発現する 1 型・3 型 IP<sub>3</sub>R は、血管発生において血管新生の過程に必須の役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文):

We previously showed that inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) 1 and 3 double knockout (1/3DKO) mice exhibited the defect of cardiovascular development. Our results from the marker analyses and the generation of tissue-specific 1/3DKO mice suggested that IP<sub>3</sub>R1 and 3 do not function in the subpopulation of the second heart field originated from Tbx1 expressed cells during heart development, and that IP<sub>3</sub>R1 and 3 in the endothelial cells may play redundant roles for the angiogenesis during embryonic vascular development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児循環器学

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、循環器、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の初期発生では、胎盤の形成と胎仔発生の双方が確立することが必須である。特に、生命維持に必須である循環系は、胎仔臓器の中で最も早期に発生し、機能し始めるため、

心臓・大血管の発生時期は胎盤の形成時期に重なる。我々は、様々な心血管発生異常をきたすノックアウトマウスが作製したが、全身で遺伝子機能を喪失させる従来法では、しばしば、胎盤の異常が合併するため、胎仔の発

生異常の原因が胎仔における遺伝子機能喪失による特異的なものか、胎盤異常による二次的なものか、確定することが困難となる。我々は、細胞内カルシウムシグナルを担うイノシトール三リン酸受容体( $IP_3R$ )に着目し、3種のサブタイプ( $IP_3R1$ ,  $IP_3R2$ ,  $IP_3R3$ )のさまざまな組み合わせのノックアウトマウスを作製し、心臓発生における $IP_3R1$ ,  $IP_3R2$ の役割および、咽頭弓と血管発生における $IP_3R1$ ,  $IP_3R3$ の役割に関する基礎的研究に従事してきた。これまでの研究で、 $IP_3R2$ は心臓特異的に発現するが、 $IP_3R1$ ,  $IP_3R3$ は胎生8.5日以降ほぼ胎仔全体に発現すること、 $IP_3R$ の3種のサブタイプの単独KOマウスには、心臓血管発生異常は認められないが、 $IP_3R1 \cdot IP_3R2$ のダブルノックアウト(DKO)マウスおよび $IP_3R1 \cdot IP_3R3DKO$ には心臓・血管・咽頭弓の発生に異常が認められることを明らかにしてきた。具体的には、(1)右心室の低形成・心臓流出路の短縮、二次心臓領域マーカーである $Isl1$ と $BMP4$ の発現領域の狭小化(Nakazawa M, Uchida K, et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. in press)、(2)卵黄囊上の原始血管叢・胎仔体節間血管や背側大動脈の形態異常。(3)咽頭弓の低形成と神経堤細胞マーカーである $Barx1$ の発現低下。一方、 $IP_3R1 \cdot IP_3R2DKO$ において心臓発生異常と胎盤の形態異常(胎盤迷路の領域の狭小化と、胎仔血管の拡張)が認められた。さらに、胎仔心臓組織培養やゼブラフィッシュに非特異的 $IP_3R$ 阻害薬を投与すると心臓発生異常をきたした(投稿準備中)。これらの所見は、 $IP_3R$ を介するシグナル伝達が、心血管・咽頭弓発生に重要な役割を果たすことを示唆する。しかし、 $IP_3R1$ ,  $IP_3R3$ は胎盤にも発現していることから、これらの発生異常は胎盤異常の二次的な変化である可能性を否定できない。そこで、心臓、血管、咽頭弓特異的な $IP_3R1 \cdot IP_3R3$ コンディショナルダブルノックアウト(CDKO)マウスを作製することで胎盤の影響を排除し、 $IP_3R1$ ,  $IP_3R3$ の心臓・血管・咽頭弓発生における役割について解析するという本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

胎仔の心臓・血管・咽頭弓の各組織特異的にイノシトール三リン酸受容体( $IP_3R$ )遺伝子の機能をノックアウト(KO)したマウスを用いて、心臓・咽頭弓動脈発生における $IP_3R$ を介する細胞内カルシウムシグナルの組織特異的な役割を解明する。

## 3. 研究の方法

- (1) 二次心臓領域特異的  $IP_3R1 \cdot IP_3R3$  CDKO マウス作製：二次心臓領域マーカーとし

て  $Tbx1$  を用い、 $Tbx1Cre: IP_3R1^{+/+} \cdot IP_3R3^{-/-}$  と  $IP_3R1^{loxP/+} \cdot IP_3R3^{-/-}$  を交配して  $Tbx1Cre: IP_3R1^{loxP/-} \cdot IP_3R3^{-/-}$  を作製した。遺伝子型は、尾または卵黄囊から抽出した genome DNA を用いた PCR により確認した。 $Tbx1Cre: IP_3R1^{loxP/-} \cdot IP_3R3^{-/-}$  マウスの心臓血管異常の有無を実体顕微鏡下で観察した。

- (2) 血管内皮特異的  $IP_3R1 \cdot IP_3R3$  CDKO マウス作製：血管内皮細胞マーカーとして  $Tie2$  を用い、 $Tie2Cre: IP_3R1^{+/+} \cdot IP_3R3^{-/-}$  と  $IP_3R1^{loxP/+} \cdot IP_3R3^{-/-}$  を交配して  $Tie2Cre: IP_3R1^{loxP/-} \cdot IP_3R3^{-/-}$  を作製した。遺伝子型は、同様に PCR により確認した。 $Tie2Cre: IP_3R1^{loxP/-} \cdot IP_3R3^{-/-}$  マウスの心臓血管異常の有無を実体顕微鏡下で観察した。
- (3)  $IP_3R1$ ,  $IP_3R3DKO$  における血管発生マーカーの発現解析：*in situ* hybridization および免疫組織化学法を用いて、Semaphorin 3C, 3E, Plexin D1, Angiopoietin 1, Tie2, VE-cadherin, PECAM, Smooth muscle actin の発現を観察した。
- (4) *in vitro* 管腔形成能・細胞遊走能解析：血管内皮細胞株(HUVEC)をマトリゲル上で培養し形成された管腔の長さの総和(管腔形成能)を測定した。さらにボイデンチャンバーの上層にHUVECを培養し、VEGF投与により下層に移動するHUVECの細胞数(細胞遊走能)を測定した。管腔形成能と細胞遊走能を無投薬下および $IP_3R$ 阻害薬投与下で比較した。

## 4. 研究成果

- (1)  $Tbx1Cre: IP_3R1^{loxP/-} \cdot IP_3R3^{-/-}$  (二次心臓領域特異的  $IP_3R1 \cdot IP_3R3$  CDKO マウス) は新生仔期において実体顕微鏡下で観察しうる心血管系の形態異常は認められず、生後半年間正常に生存し続けたため、臓器発生異常は特にないと考えられた。したがって、二次心臓領域のサブポピュレーションである  $Tbx1$  陽性細胞群の下流には  $IP_3R1$  および  $IP_3R3$  は関与しない。この結果は、研究の背景で述べたように、すでに我々が観察した  $IP_3R1 \cdot IP_3R3DKO$  の右心室における二次心臓領域マーカー  $Isl1$  と  $BMP4$  の発現領域が狭小化したという結果と、さらに観察しえた  $Tbx1$  の発現が維持されていると結果(図1)に合致している。 $Isl1$  と  $BMP4$  はひろく二次心臓領域で発現する広域二次心臓領域マーカーであり、その一部に  $Tbx1$  発現領域が存在する。すなわち  $Tbx1$  非発現細胞群由来の二次心臓領域の下流に  $IP_3R1$

と  $IP_3R3$  が関与する可能性がある。

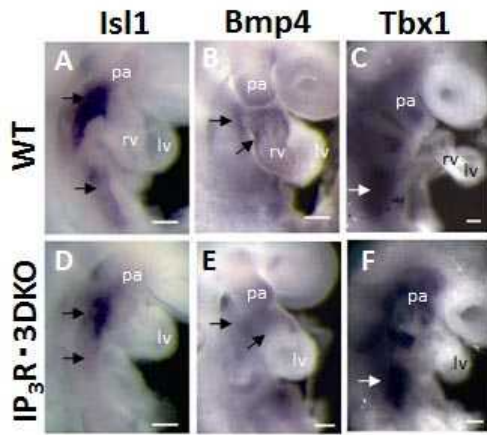


図1 二次心臓領域マーカーの発現比較  
胎生 9.25 日の野生型(WT) (A ~ C) および  $IP_3R1 \cdot IP_3R3DKO$  (D ~ E) の心臓および二次心臓領域を右側から見た像。Isl-1(A,D), Bmp4 (B, E), Tbx1 (C, F) の発現を *in situ* hybridization 法で観察し発現領域を比較した。矢印は二次心臓領域を示す。Pa は咽頭弓、lv は左心室、rv は右心室を表す。

(2) Tie2Cre:  $IP_3R1^{loxP/-} \cdot IP_3R3^{-/-}$  (血管内皮特異的  $IP_3R1 \cdot IP_3R3$  CDKO マウス) は現在のところ出生していないため、胎生致死が疑われた。現在、胎生期のどの時期で致死であるかを決定するために、さまざまな時期の胎仔の形態を観察しているところである。

(3)  $IP_3R1, IP_3R3DKO$  では、野生型と比較して、whole mount *in situ* hybridization 法による解析の結果、血管新生マーカーである Plexin D1, Semaphorin 3C, 3E, Angiopoietin 1 の発現低下が認められた (図 2)。

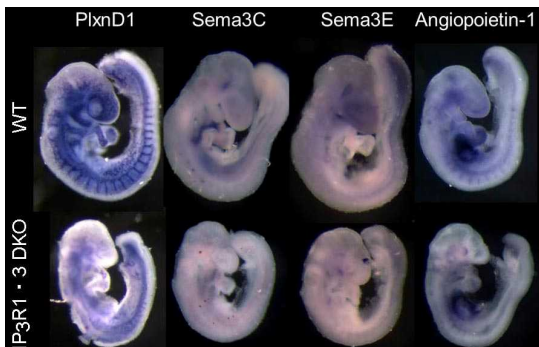


図2 血管新生マーカーの発現比較  
胎生 9.5 日の WT (上段) および  $IP_3R1 \cdot IP_3R3DKO$  (下段) の胎仔全体を右側から見た像。左から Plxn (Plexin) D1, Sema

(Semaphorin)3C, 3E, Angiopoietin-1 の発現を *in situ* hybridization 法で観察し発現量と発現領域を比較した。さらに、免疫組織化学法による解析の結果、平滑筋マーカーである Smooth muscle actin の発現が低下していた (図 3)。

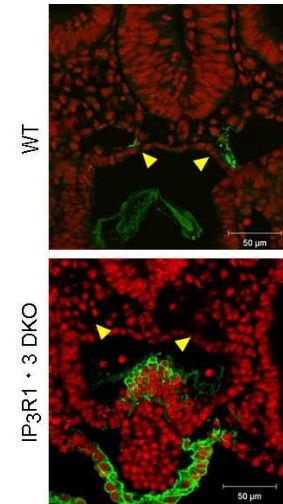


図3 血管平滑筋マーカーの発現比較  
胎生 9.5 日の WT (上段) および  $IP_3R1 \cdot IP_3R3DKO$  (下段) の心臓流出路レベルでの背側大動脈の横断面。Smooth muscle actin の発現を免疫組織化学法 (緑) で観察した。赤は核染色。

一方、血管内皮細胞マーカーかつ脈管形成マーカーである Tie2, VE-cadherin, PECAM, の発現は  $IP_3R1, IP_3R3DKO$  においても野生型と同様のレベルに維持されていた (図 4) 。したがって、 $IP_3R1$  と  $IP_3R3$  は、脈管形成には関与せず、血管新生に、遺伝的相補性をもって機能することが示唆された。

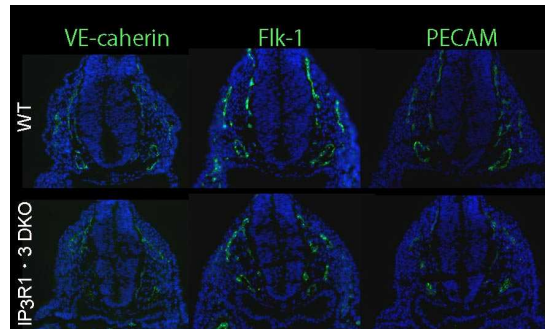


図4 血管新生マーカーの発現比較  
胎生 9.5 日の WT (上段) および  $IP_3R1 \cdot IP_3R3DKO$  (下段) の胎仔全体を右側から見た像。左から VE-cadherin, Flk-1, PECAM の発現を免疫組織化学法で観察し発現量と発現領域を比較した。

(4) HUVEC の管腔形成能と細胞遊走能は  $IP_3R$  阻害薬の存在下で有意に低下し (図 5) 、血管新生の障害は血管内皮細胞の  $IP_3R$  機能の低下が直接関与する可能性があることが示唆された。

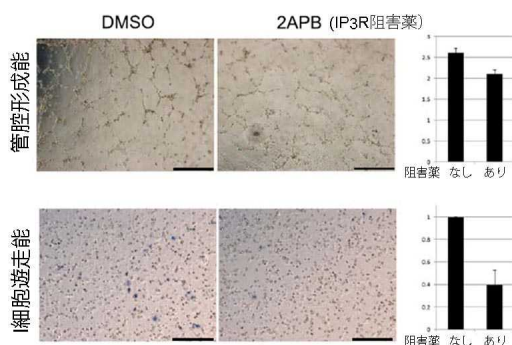


図 5 HUVEC の管腔形成能と細胞遊走能に対する  $IP_3R$  阻害薬の効果

HUVEC の管腔形成能 (上段) および細胞遊走能 (下段) を 2APB ( $IP_3R$  阻害薬) 投与下と非投与下 (溶媒 (DMSO) のみ) とで比較した。管腔の長さや遊走した細胞数を定量し、右にグラフで示した。エラーバーは標準偏差を示す。

本研究は、いまだ報告がない  $IP_3R1$  と  $IP_3R3$  の組織特異的ノックアウトマウスを用いた新規性の高い内容であり、これらの結果は、 $IP_3R1$  と  $IP_3R3$  が二次心臓領域由来の心臓発生と血管内皮細胞特異的に血管新生に機能することを示唆する重要な所見である。今後は、本研究で作製した血管内皮細胞特異的  $IP_3R1$ ,  $IP_3R3CDKO$  (Tie2Cre:  $IP_3R1^{loxP/-}$ ・ $IP_3R3^{-/-}$ ) を活用し、 $IP_3R$  の上流および下流のシグナルを探索し、血管発生におけるカルシウムシグナル伝達系を明らかにしていく予定である。本研究の成果は、心血管の発生におけるシグナル伝達系の解明につながるばかりでなく、小児科臨床でしばしば遭遇する先天性心血管疾患の発症分子機構の一部が明らかになり、先天性心血管疾患の発症予防や再生医療を含む治療への応用につながる発生学的基盤に新しい知見を加えるものとなることが期待される。

#### 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 3 件)

Nakazawa M, Uchida K, Aramaki M, Kodo K, Yamagishi C, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are essential for the development of the second heart field. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 査読あり, 2011 (in press).

Uchida K, Aramaki M, Nakazawa M, Yamagishi C, Makino S, Fukuda K, Nakamura T, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H. Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis. *PLoS ONE*, 査読あり, 5: 2010, pii: e12500.

Yamagishi H, Maeda J, Uchida K, Tsuchihashi T, Nakazawa M, Aramaki M, Kodo K, Yamagishi C. Molecular embryology for an understanding of congenital heart diseases. *Anatomical Science International*, 査読あり, 84: 2009, 88-94.

[学会発表] (計 1 件)

内田 敬子, Type 1 and 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in the Endothelium are Required for Angiogenesis during Embryonic Vascular Development, アメリカ心臓学会, 2010年11月16日, マコミックプレイス (米国, シカゴ)

[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]

ホームページ等  
なし

#### 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

なし

(3) 連携研究者

なし