

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25年 5月 1日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590183

研究課題名（和文） 心筋の発生分化機構

研究課題名（英文） Mechanisms for development and differentiation of cardiomyocytes

研究代表者

小久保 博樹 (HIROKI KOKUBO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：10270480

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、Wnt シグナルの調節因子をコードする遺伝子に着目し、その遺伝子改変マウスを用いた細胞の系譜を追跡し、左室側心筋に寄与する新たな細胞の起源を同定することを試みた。その結果、左心室までの領域に加えて、流出路領域にも寄与する新たな未分化細胞領域が存在することが明らかとなった。今回の解析から、“右心室以外に寄与する未分化細胞群と、左心室以外に寄与する未分化細胞群が、形成過程にある心筒内に流入することによって区画化された心臓が形成される”という新たな心臓形成モデルを提唱できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this research, we tried to identify the novel cell population, contributing to the left ventricle, by using genetically engineered mouse of the gene regulating Wnt signaling. As a result, we found a new undifferentiated domain, which contributes to the outflow tract, the atrium in addition to the left ventricle during heart development. This result suggests a new heart formation model: "the heart allows cell migration from at least two undifferentiated cell groups, which contribute the all heart region except for the right ventricle or except for the left ventricle."

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：解剖学一般

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：心筋

1. 研究開始当初の背景：心臓は原腸陥入に | よって生じた中胚葉の一部の細胞が前方に

移動し、卵筒胚期 (egg cylinder stage) で三日月型の心臓原基 (Heart crescent) として初めて認識されるようになる。その後、心臓原基から形成される原始心筒がルーピングして折りたたまれながら、二心房二心室の複雑な構造を形成していく。これまで心筋は、心臓原基が形成された段階で運命が決定され、心筋特異的遺伝子を発現し始めると考えられてきた。しかしながら最近、心臓原基において心筋特異的遺伝子を発現している一次心臓領域が左心室筋を、それに隣接した二次心臓領域が右心室・流出路と心房の一部を形成するという考え方が提唱されてきた (図 1)。さらに、心筒がルーピングを終え、

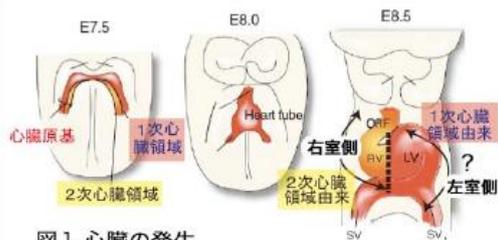


図1.心臓の発生
心臓原基は一次心臓領域と二次心臓領域に区画化され、右心室筋は左心室筋と由来が異なることが示されている。

ほぼ心臓の体裁を調える頃に心外膜が心臓全体を覆うが、この心外膜由来細胞も、心筋を支える間質線維芽細胞や冠動脈構成細胞に加え、心筋細胞に分化することが明らかとなってきた。このように、右室側心筋を形成する二次心臓領域や心外膜由来の細胞の性状が明らかになる一方で、左室側心筋の起源を含めた形成過程は未だ不明な点が多く、明らかにする必要がある。

2. 研究の目的：心筋の最終分化に重要な役

割を果たす Wnt シグナルの調節が心筋分化の制御や形態形成に重要であると予想し、ある Wnt シグナルに関連するタンパクをコードする遺伝子に着目した。本研究では、この遺伝子を発現した細胞の系譜を明らかにし、この遺伝子の心筋分化への機能を解析していくことで、左心系心筋の発生様式を解明することを目的とした。

3. 研究の方法：まず、GFP ノックインしたマウスを入手し、また Cre recombinase をノックインしたマウスを新たに作製してレポーターマウスと掛け合わせることによって、目的の遺伝子を発現した細胞を標識した。これらの標識された細胞の移動経路を同定し、左室側心筋を構成する新たな細胞系譜を解析した。また、免疫組織化学的方法やダブル *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、細胞が移動した先での分化状態を同定する。さらに、目的の遺伝子を欠失させたマウスの表現型を解析し、この遺伝子の心筋への分化に対する機能を検討した。

4. 研究成果：我々の着目した遺伝子の発現領域は、心臓原基の背側、心筒の尾側末端、更に横中隔の心外膜・静脈洞の前駆領域、そして静脈洞へと最終的に推移し、心臓を形成する領域には認められないことを発見した。これまでに心外膜の前駆細胞は、心外膜や心外膜を経由して形成される繊維芽細胞や心筋細胞の一部、さらに冠動・静脈の内皮や平滑筋細胞の前駆細胞へと分化していくとされるが、心外膜原基に発現するマーカー遺伝

子とほとんど一致しないことから、心外膜・静脈洞の前駆領域にあるが心外膜前駆細胞とは異なる細胞群であることが示された。

次に、この遺伝子座に GFP を挿入したマウスの発現解析を行った。心外膜・静脈洞の前駆領域の他に、mRNA の発現解析では認められなかった左心室から心房にかけての心臓領域にも GFP の発現が認められたことから、この遺伝子を発現した細胞が左心室から心房の心筋の起源となっている可能性が示唆された。そこで、この遺伝子を発現した細胞の運命を同定するために、この遺伝子座に Cre もしくは Ert2Cre を挿入したマウスを新たに作出し、発現細胞の系譜解析を行った。

その結果、GFP を挿入したマウスの発現解析から期待された心房から左心室までの領域に加えて、流出路領域にもこの遺伝子を発現した細胞が寄与することが明らかとなった。このことから、この遺伝子を発現している細胞が、右心室以外の心臓形成に寄与する未分化な細胞集団を標識する可能性が示唆された。つまりこの遺伝子が、1 次心臓領域の未分化細胞集団を特定する遺伝子マーカーであると考えられる。今回の解析から、右心室以外に寄与する 1 次心臓領域と左心室以外に寄与する 2 次心臓領域が心筒内に流入することによって、左右心室の領域の特異化していく新たな心臓形成モデルが提唱できるものと考えている。

また、この遺伝子の機能を調べるために、サブファミリー遺伝子をすべて欠失したマウスを作製したところ、胎生致死となり、GFP 発現細胞のほとんどが心臓の領域内に認め

られた。この結果から、この遺伝子は未分化性を維持する機能を持つことが推察された

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 5 件)

1. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Kume T, Yoshizumi M, Nakanishi T, Saga Y. Hes2 knockout mice develop aortic valve disease with advancing age. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 33: e84-92. 2013

2. Sakabe M, Kokubo H, Nakajima Y, Saga Y. Ectopic retinoic acid signaling affects outflow tract cushion development through suppression of the myocardial Tbx2-Tgfb2 pathway. *Development* 139: 385-95. 2012

3. Oyama T, Harigaya K, Sasaki N, Okamura Y, Kokubo H, Saga Y, Hozumi K, Suganami A, Tamura Y, Nagase T, Koga H, Nishimura M, Sakamoto R, Sato M, Yoshida N, Kitagawa M. Mastermind-like 1 (MamL1) and mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo. *Development* 138: 5235-46. 2011

4. Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, Ogasawara R, Uezumi A, Yoneda T, Matev MM, Motohashi N, Ito T, Zolkiewska A, Johnson RL, Saga Y, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H. Hes1 and Hes3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development*. 138: 4609-19. 2011

5. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium. *Development* 137: 3823-3833. 2010

[学会発表] (計 4 件)

1. 小久保 博樹 先天性心疾患から成人性心疾患まで 心臓発生研究会 (日本小児心臓学会) (招待講演) 平成 24 年 10 月 19 日 福島

2. 小久保 博樹, 坂口あかね、相賀裕美子

静脈洞から左心室に寄与する新たな細胞系
譜 小児循環器学会 (心臓血管発生研究会)
平成 23 年 10 月 8 日 福島

3. Asai, R. Kokubo, H. et al Endothelin
type-A receptor expression defines a
distinct subpopulation within the first
heart field contributing to chamber
myocardium 日本分子生物・生化学合同学会
平成 22 年 12 月 10 日 神戸

4. Sakabe, M., Kokubo H. et al T-box
transcription factor Tbx2 is a key factor
in the pathogenesis of congenital heart
disease including transposition of great
arteries 日本分子生物・生化学合同学会
平成 22 年 12 月 10 日 神戸

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保 博樹 (HIROKI KOKUBO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師
研究者番号：10270480

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：