

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 3 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460244

研究課題名(和文) 心臓前駆細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of cardiac precursor cells

研究代表者

小久保 博樹 (Kokubo, Hiroki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師

研究者番号：10270480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Wntシグナルに関わる遺伝子の発現解析、並びにCre/ERT2Creマウスを用いた発現細胞の系譜解析によって、右心室以外の心臓に寄与する新たな心臓未分化細胞領域が同定された。またノックアウトマウスや培養系の解析から、心臓未分化細胞群に於いてWntシグナルは、心筋への分化の制御というよりはむしろ増殖の制御に関わっていることが示唆された。心臓未分化細胞の未分化性を維持した培養法の確立については、今後の課題として残った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the new cardiac precursor population, which contributes to all heart components except for the right ventricle, by expression and lineage analysis of the gene related to the Wnt signaling. Studies with the knockout mice and cell culture system showed that Wnt signaling could regulate proliferation of the precursor cells rather than differentiation to the myocardium. Since Wnt signaling could not affect differentiation, the establishment of a culture system that maintained the undifferentiated state of cardiac precursor cells remained as a future assignment.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：心筋

1. 研究開始当初の背景

心臓は、心筋梗塞、心筋炎、心筋症などにより心筋に傷害が起こると、組織を再生することができないために機能が低下して心不全へと移行する。そのため、心臓の収縮力の源である心筋組織を外部から補填し、心機能を回復することが望まれている。現在、心臓の器官再生技術の一環として、自発的に拍動する心筋細胞を生み出すための、ES細胞、iPS細胞の培養法や初期中胚葉、繊維芽細胞への遺伝子導入法による分化誘導技術が確立されつつあるが、生着率の低さや、遺伝子導入された細胞の安全性など、心機能を十分に回復させるためには解決しなければならない問題が多い。増殖能を持ち且つ心臓の各構成要素に分化することを方向付けられた未分化な細胞群、いわゆる心臓前駆細胞を活用し、遺伝子導入を回避し、且つ複数の心臓構成細胞の供給源として活用できるため、高い生着率を持つ移植用組織の作出が可能になるものと期待される。

心臓は、原腸陥入によって形成される中胚葉が移動し、胚体の最も前方に到達して、馬蹄形の心臓原基として認識されるようになる(図1)。心臓原基は、頭部形成運動と呼応して前方へと移動するに従って心筒を形成し、心筒がさらに伸張しながらルーピングするとともに、心房を含む流入路が頭部側へと移動していき、流入路と流出路が頭部側にある成熟した心臓の位置関係となり、最終的に中隔と弁によって隔てられた四腔(2心房2心室)を持つ成熟した心臓を形成する。これまで、心臓原基において心筋特異的遺伝子の発現が認められることから、この心臓原基から将来の心臓が全て形成されると考えられていたが、最近になって、心筋特異的遺伝子の発現が認められるこれまでの心臓原基(一次心臓領域)の腹側側に臓側中胚葉となる領域が存在し、この臓側中胚葉の中に流出路から右心室並びに心房へと寄与する領域(2次心臓領域)が存在することが明らかとなった。現在も、左心室領域は従来通り、一次心臓領域(FHF)から作られるとされており、二次心臓領域(SHF)が心臓に寄与する唯一の前駆細胞だと考えられている。我々は、左心室領域に寄与する前駆細胞を同定し、その性状を明らかにすることは重要な課題である。

これまで、心筋細胞の分化にはWntシグナルの活性化と抑制の緻密な制御が必要とされ、競合阻害を行う分泌型の受容体の一つであるSecreted frizzled related protein (Sfrp)-1や-2が、心筋組織が傷害を受けると発現が活性化され

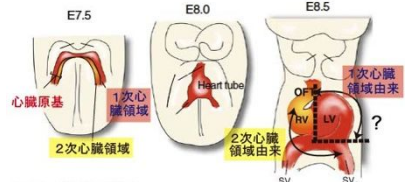


図1. 心臓の発生
心臓原基は、一次心臓領域と二次心臓領域に区分され、左心室は一次心臓領域由来の細胞群によってのみ構成されることになっている。

る遺伝子として同定されるなど、心筋の分化や維持に重様な役割を果たすことが示唆されている。そこで我々は、*Sfrp-1*、*-2*と同じサブファミリーに属する*Sfrp5*に着目した。心臓形成時期の発現を観察したところ、心臓原基の尾背側の発現に続いて心臓の流入路側の未分化中胚葉での発現を確認したが、一貫して心臓への発現は認められなかった。これに対し、*Sfrp5*遺伝子座に*venus YFP*遺伝子を挿入したマウスでは、流入路から左心室に掛けて*venus YFP*が残存することが観察された。我々は、*Sfrp5*遺伝子は心臓内では発現しないが、遺伝子を発現した細胞が心臓を構成する可能性を考えられることから、左心室領域を形成する心臓前駆細胞が存在すると推察した。

2. 研究の目的

心臓の構築の原理、すなわち中胚葉細胞がいかにして各構成細胞へと分化して、ダイナミックな形態形成を経て2心房2心室という複雑な構造体を形成するののかという問題は、まだ不明な点が多い。本研究では、左心室から心房を構成する新奇の心臓領域を同定し、この細胞群の性状を明らかにするとともに、この細胞群を細胞供給源として成熟した心室筋を人工的に構築し、心筋組織の再生医療技術の発展につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、*Sfrp5* 遺伝子発現細胞が、心房および左心室を構成する心臓の前駆細胞となりうるかどうか、また、それらの細胞が、心臓を構成するいずれの細胞へと分化するか、さらに、それらの細胞の移植用組織への有用性などを検討した。

1. *Sfrp5*発現細胞の系譜解析

*Sfrp5-Cre*及び*Ert2Cre*マウスを用いて、どの時期に発現した細胞が心臓のどの領域に寄与し、どういった心臓の構成細胞に分化していくのかを検討した。時間軸に沿ったlineage mapマップを作成した。

2. *Sfrp5*発現細胞の培養系の確立

*Sfrp5-venus YFP*マウスを用いて、*Sfrp5* 遺伝子を発現している細胞を選択・回収し、未分化状態を維持しながら増殖させる培養系、心臓の各構成細胞へ分化させる系の確立を試みた。

3. 未分化性維持に対する*Sfrp5*のWntシグナル阻害因子としての機能の解析

Sfrp5 遺伝子は心臓内で発現しなくなることから、*Sfrp5* が未分化性を維持している可能性が考えられる。*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の全てのサブファミリー遺伝子を欠失させたマウスを作出し、その表現系を解析することによって、*Sfrp*の未分化性維持に対する機能を明らかにした。

4. 研究成果

(A) *Sfrp5* 遺伝子の発現解析

心臓発生において Wnt シグナルが重要な役割を担うことは、多くの研究によって示唆されている。特に、中胚葉から心筋前駆細胞への初期誘導において、Wnt シグナルが抑制されることが必要だとされている。そこで、Wnt リガンドの decoy receptor で Wnt シグナルを抑制する機能を持つと報告のある *Sfrp* が、心筋前駆細胞の分化に関わり、心臓形成に重要な働きを果たす可能性を考え、未だ心臓形成に関わるとの報告のない *Sfrp5* 遺伝子に着目した。

まず、マウス胚発生初期における発現領域を、double whole mount *in situ* hybridization (WISH) 法もしくは、*Sfrp5-venusYFP* ノックイン (KI) マウスを導入して、2 重蛍光免疫染色法を用いて、各心臓形成領域のマーカー遺伝子との位置関係を比較した。

まず、心臓形成段階 (胎生 7.5~8.5) の心臓形成領域の遺伝子マーカーとして、分化した心筋細胞に特異的に発現するマーカー遺伝子 *Myosin light chain 2a (Mlc2a)* と比較したところ、*Sfrp5* は *Mlc2a* の発現する心臓形成領域とは異なり、その外側に隣接した中胚葉領域に発現していることが明らかとなった。

胎生 9.5 日目になると、心臓の静脈極の間葉組織に発現が認められた。静脈洞や心外膜の前駆細胞に発現する可能性が示された。そこで、静脈洞と心外膜のマーカー遺伝子である *Tbx18*、及び心外膜のマーカー遺伝子 *Wt1* との発現比較を行った。その結果、*Tbx18* とはほぼ共局在することが認められたが、*Wt1* は静脈極の間葉組織の辺縁部および心外膜に限られ、一部のみ共局在することが明らかとなった。これらの観察から、*Sfrp5* は主に静脈洞の原基となる細胞に発現している可能性が示唆された。

静脈洞の心筋細胞は、発生が進むと洞房結節を構成する様になり、心房や心室を構成する一般心筋とは異なる特殊心筋であることが示されている。そこで、一般心筋に特異的な転写因子をコードする *Nkx2-5* 遺伝子、心筋の筋原線維構造タンパクである TnT や、さらに、ペースメーカーチャネル分子である *Hcn4* を特異的なマーカーとして、その発現を比較し、*Sfrp5* 発現細胞が静脈洞の心筋細胞として分化し、さらに洞房結節を構成するか否かを検討した。その結果、胎生 9.5 日目においては、*Nkx2-5*、TnT、*Hcn4* のいずれも共局在していなかったが、胎生 10.5 日目では、TnT と *Hcn4* が共局在したが、*Nkx2-5* との共局在は認められなかった。この結果から、*Sfrp5* 発現細胞は、胎生 9.5 から 10.5 日にかけて心房や心室を構成する一般心筋ではなく、静脈洞を構成する特殊心筋細胞に分化すること、さらに静脈洞の心筋細胞に分化しても、その発現が維持されることが示唆された。

(B) *Sfrp5* 発現細胞の系譜解析

静脈洞に寄与する前駆細胞は、胎生 9.0 日以

降に発現を開始する *Tbx18* の発現によって同定されているが、胎生 9.0 日以前において静脈洞に寄与する前駆細胞に発現する遺伝子は明らかとなっていない。胎生 9.0 日以前に *Sfrp5* を発現している細胞が、静脈洞心筋の前駆細胞である可能性が考えられた。この可能性について検討するために、Cre/loxP 系を用いた *Sfrp5* 発現細胞の系譜追跡実験を行った。

Sfrp5 遺伝子座に Cre recombinase をコードする遺伝子を挿入した *Sfrp5-Cre* ノックイン (KI) マウスを作製した。作製した *Sfrp5-Cre* マウスと R26R レポーターマウスと掛け合わせ、*Sfrp5* 遺伝子発現細胞の細胞系譜を解析した。胎生 8.5 日では、*Sfrp5* を発現している静脈極の領域だけでなく、原始心筒内にも LacZ 染色された細胞が認められた。この結果から、原始心筒のほとんどの細胞が、*Sfrp5* を発現した細胞に由来することが示唆された。

さらに、心臓の各区画が明確となり原始心筒外からの細胞の流入が終了する胎生 13.5 日胚の心臓の LacZ 染色を行ったところ、左心室、心房、流出路、静脈洞のほとんどの細胞が LacZ 陽性となったが、右心室ではほとんど観察されなかった。従って、*Sfrp5* 発現した細胞は、予想された静脈洞へと寄与するだけでなく、流出路、左心室、および心房に寄与するが、右心室には寄与しないことが示唆された。

心臓内に寄与した細胞が、心臓のどのような構成細胞となっているのかを明らかにするため、*Sfrp5-Cre* マウスと *CAG-loxP-CAT-loxP-eGFP* レポーターマウスとかけ合わせ、各分化マーカーと二重免疫染色を行って解析した。心筋マーカーである TnT は、ほとんどで共発現が認められ、*Sfrp5* 発現細胞のほとんどが心筋に分化すると考えられた。また、心外膜のマーカーである *Wt1*、並びに心内膜のマーカーである CD31 の発現は、一部で共発現が観察され、心外膜、並びに心内皮にも一部寄与することが明らかとなった。

次に、いつの時期に *Sfrp5* を発現した細胞群がどの領域の心筋に分化しうるのか、また、いつの時期まで各領域に寄与する前駆細胞が存在しているかなど、明らかにするため、時期特異的に *Sfrp5* を発現した細胞を標識する目的で、タモキシフェン誘導型 Cre recombinase (*Ert2-Cre*) 遺伝子が *Sfrp5* 遺伝子座に挿入された *Sfrp5-Ert2Cre* KI マウスを作製した。R26R レポーターマウスと掛け合わせ、各時期にタモキシフェンを投与して標識した胚の LacZ 染色を行い、その細胞系譜を解析した。

胎生 6.5 日に標識した場合、流出路、左心室、右心房、左心房、および静脈洞に LacZ 陽性細胞が観察された。これは、*Sfrp5-Cre* マウスで行った実験と一致した結果で、胎生 6.5 日に発現した細胞は、流出路、左心室、右心房、左心房、および静脈洞へと寄与することが示唆された。これに対し、胎生 7.5 日から胎生 9.5 日へと標識する時期が遅れるにつれて、流出路や左心室の寄与率が減少するのに対し、心房や静脈洞への寄与率が増加する傾向が認められた。こ

の観察から、胎生 6.5 日に *Sfrp5* を発現する細胞群に、早期に分化を開始する左心室から比較的遅くに分化する静脈洞までの心筋細胞の全ての前駆細胞が含まれるのに対し、胎生 7.5 から 9.5 日の間では発現細胞から距離の近い、心房や静脈洞に限定的に寄与することが示された。

(C) *Sfrp5* は FHF の未分化細胞に発現する

これまでマウスの心臓は、左心室や心房の一部を形成する領域とされる FHF と、右心室、流出路、並びに心房の一部を形成する領域とされる SHF の二つの心臓領域より形成されるとされてきた。しかし本研究で、*Sfrp5* 発現細胞が FHF から形成される左心室だけでなく、SHF から形成される流出路並びに心房の一部へと寄与することが明らかとなったことから、*Sfrp5* 発現細胞が FHF および SHF の両心臓領域の前駆細胞である可能性が考えられた。そこで、*Sfrp5* 発現細胞と、FHF および SHF で構成される既存の心臓領域との関係性を明らかにするため、胎生 7.5 から 8.0 日目のマウス胚を用い、*Sfrp5* の発現と FHF のマーカー遺伝子として知られる *Nkx2.5*、*Tbx5* および *Hcn4* の発現を、二重蛍光染色を用いた WISH 法によって、その発現領域を比較検討した。

胎生 7.5~8.0 日の間を通して *Sfrp5* の発現は、*Nkx2.5* の発現する心臓原基の外側または尾側に認められ、*Sfrp5* の発現と重複していなかった。*Sfrp5* を発現した細胞は、*Nkx2.5* を発現する心室や心房の心筋細胞に分化することが系譜解析から明らかとなっていることから、*Sfrp5* は *Nkx2.5* の発現に先行して発現すると考えられる。また、*Sfrp5* の発現は、胎生 7.5 から胎生 9.5 日の間、*Hcn4* の発現とも重複することはなかった。これに対し、*Sfrp5* を発現した細胞が寄与する心臓内の心筋細胞で *Hcn4* を発現していたことから、*Sfrp5* は *Hcn4* の発現にも先行して発現することが示された。

一方、胎生 7.5 日目において、*Tbx5* と *Sfrp5* の発現は、ほぼ重複していることが観察された。胎生 8.0 日目になると、*Tbx5* の発現が心臓内にも認められたが、*Sfrp5* の発現は心臓内では認められないことから、*Tbx5* と *Sfrp5* はいずれも未分化な細胞に発現するが、*Tbx5* の発現は心筋細胞に分化しても維持されるのに対して、*Sfrp5* の発現は心筋細胞に分化すると消失すると考えられた。従って、*Sfrp5* は、FHF の未分化な細胞領域で発現し、分化すると *Sfrp5* の発現を消失すると考えられた。

(D) *Sfrp5* 発現細胞は、SHF の一部に寄与する

Sfrp5 を発現した細胞が、SHF 由来とされる流出路や心房にも寄与することから、FHF だけでなく SHF の前駆細胞でもある可能性が考えられた。そこで、*Sfrp5* を発現した細胞と SHF との関係性を明らかにするために、SHF の前駆細胞のマーカーである *Isl1* 遺伝子の発現を、二重蛍光 WISH 法を用いて比較した。

Sfrp5 が心臓原基 (Cardiac crescent) の外側で強く発現しているのに対して、*Isl1* の強い発現は Cardiac crescent の内側に隣接して発現し、*Sfrp5* の発現と重複することはなかった。

さらに、*Sfrp5-venusYFP* KI マウス胚を用いて、*Isl1* の遺伝子産物を標識するための抗-*Isl1* 抗体と抗-GFP 抗体を用いた二重免疫染色法を行って比較検討した。胎生 7.5 日目では、WISH 法と同様に *Sfrp5* は Cardiac crescent の外側に、*Isl1* はその内側に観察され、*Isl1* タンパク質との重複は観察されなかった。胎生 8.5-9.5 日胚においても *Sfrp5* は心臓領域の静脈極側の間葉系細胞に認められたのに対し、*Isl1* タンパク質は心臓領域の背側に位置する臓側中胚葉および流出路に局在し、重複は認められなかった。この観察から、*Sfrp5* と *Isl1* のタンパク質レベルでの発現が互いに排他的に分布していることが示された。

Sfrp5 と *Isl1* タンパク質の発現領域が、互いに異なることが確認された。しかし、*Sfrp5* を発現した細胞が SHF と考えられる臓側中胚葉や流出路にも認められることから、*Sfrp5* を発現した細胞が SHF へと移行する可能性がある。

そこで、*Isl1Cre/CAG-CAT-mRFP/Sfrp5-venusYFP* マウスおよび *Sfrp5Cre/CAG-CAT-eGFP* マウスを用いて、*Sfrp5* と *Isl1* の遺伝子発現細胞の系譜において、それぞれの遺伝子の発現を観察し、二重蛍光免疫染色法で解析した。その結果、胎生 9.5 日胚では、静脈極に存在する *Isl1* を発現した細胞系譜に *Sfrp5* は発現していないことが明らかとなった。これに対し、*Sfrp5* を発現した細胞系譜では、そのほとんどで *Isl1* 陽性細胞となることが明らかとなった。従って、*Sfrp5* 発現細胞は、一部の SHF に寄与することが示唆された。

(E) *Sfrp* の機能解析

本研究で、*Sfrp5* が発現する心臓の静脈極側の間葉系細胞群に心臓前駆細胞が存在し、心房や心室の心筋細胞に分化する一方で、心臓前駆細胞での *Sfrp5* の発現は、心房や心室の心筋細胞に分化すると消失することを見出した。その観察から、*Sfrp5* は心筋前駆細胞から心房心室への分化を抑制し、その発現の消失によって心筋前駆細胞の分化が促進される可能性が考えられた。そこで、*Sfrp5* 単独 KO マウスでは、心臓の発生に異常が認められなかったため、機能重複を考えて *Sfrp* のサブファミリー遺伝子である *Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* 全ての遺伝子を欠損させた三重遺伝子欠損 (TKO) マウスを解析し、*Sfrp5* が心筋の分化を制御する機能を持つか否かを検討した。

心臓特異的な分化マーカーの発現を胎生 9.5 日の TKO マウス胚を用いた *in situ* hybridization 法により観察した。心筋細胞特異的遺伝子の *Nkx2.5*、FHF のマーカー遺伝子の *Tbx5*、SHF のマーカー遺伝子の *Isl1*、静脈洞前駆細胞マーカー遺伝子の *Tbx18* の発現は、いずれも対照マウスと同様に TKO マウスにおいても心筋に発現することが観察された。従って、*Sfrp* サブ

ファミリー遺伝子群が欠損しても、各心臓領域に必要な前駆細胞は正常に発生し、心筋は正常に分化することが示された。

しかし、TKO マウスの心筒は流出路に比べ、流入路が拡大しているなど、形態異常が観察された。*Sfrp* 遺伝子は、Wnt のデコイレセプターをコードするため、その遺伝子群の欠失によって Wnt シグナルの異常な活性化が起こり、流入路の細胞群で細胞分裂が亢進している可能性が考えられた。

細胞分裂マーカーである Ki67 の発現について検討したところ、TKO マウス胚では YFP を発現する細胞で、高い Ki67 陽性率を示すことが観察された。この結果から、対照マウス胚では静脈極の心臓前駆細胞では細胞分裂が抑制されるが、*Sfrp* ファミリー遺伝子欠損した場合、細胞分裂が亢進することが明らかとなった。YFP を発現する間葉系細胞において、正常胚では認められない β -catenin の集積が認められた一方で、リガンドである Wnt2 の発現は、正常マウス胚と同様に流入路の細胞に発現していたことから、*Sfrp* は Wnt/ β -catenin 系を抑制することによって、心筋前駆細胞の細胞分裂を抑制していることが示唆された。

(F) *Sfrp5* 発現細胞の培養系の確立

Sfrp5 遺伝子を発現している細胞を選択・回収し、未分化状態を維持しながら増殖させる培養系、心臓の各構成細胞へ分化させる系を確立するため胎生9.5日目の *Sfrp5-venusYFP* KI マウス胚から YFP 陽性の細胞塊を実体顕微鏡下で摘出し、各シグナルのアゴニストやアンタゴニストを加えて数日間培養を行い、YFP 陽性細胞に対する増殖・分化への影響を検討した。

今回、Wnt シグナルの心筋前駆細胞の細胞分化、分裂に与える影響を詳細に解析するため、Wnt のアゴニスト及びアンタゴニストを加えて数日間培養を行い、YFP 陽性細胞に対する Wnt の効果を検討した。YFP 細胞塊は、何も添加しない場合、培養 1~2 日後より拍動を開始した。*Hcn4*、 *α MHC* や *Cx40* などの心筋細胞特異的遺伝子の発現は上昇し、*Sfrp5* の発現は低下した。この結果から、YFP 細胞塊は、培養下においても心筋細胞へ分化することが確認された。この系に、Wnt3a 及び *Sfrp5* を培養液に加え培養したところ、分化マーカーの発現に差はなかったが、*CyclinD1* などの増殖マーカーが Wnt 添加群で上昇し、*Sfrp5* 添加群で抑制された。この結果から、Wnt シグナルは、心筋の分化には影響しないが、*CyclinD1* といった細胞分裂に関連する遺伝子の発現を上昇させ、細胞分裂を促進させる効果が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 8 件)

- (1) *Dazl* is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. Kato Y, Katsuki T, Kokubo H, Masuda A, Saga Y. *Nat Commun.* 2016 Apr 13; 7:11272. doi: 10.1038/ncomms11272. 査読有
- (2) The Transcription Factor Hand1 Is Involved In Runx2-Ihh-Regulated Endochondral Ossification. Laurie LE, Kokubo H, Nakamura M, Saga Y, Funato N. *PLoS One.* 2016 Feb 26; 11(2): e0150263. doi: 10.1371/journal.pone.0150263. 査読有
- (3) Osteoprotegerin Prevents Development of Abdominal Aortic Aneurysms. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Yoshimura K, Aoki H, Orita Y, Ishida T, Ohtaki M, Nagao M, Ishida M, Yoshizumi M. *PLoS One.* 2016 Jan 19; 11(1): e0147088. doi: 10.1371/journal.pone.0147088. 査読有
- (4) Evidence of Notch-Hesr-Nrf2 Axis in Muscle Stem Cells, but Absence of Nrf2 Has No Effect on Their Quiescent and Undifferentiated State. Yamaguchi M, Murakami S, Yoneda T, Nakamura M, Zhang L, Uezumi A, Fukuda S, Kokubo H, Tsujikawa K, Fukuda S. *PLoS One.* 2015 Sep 29; 10(9): e0138517. doi: 10.1371/journal.pone.0138517. 査読有
- (5) Role of DNA damage in cardiovascular disease. Ishida T, Ishida M, Tashiro S, Yoshizumi M, Kihara Y. *Circ J.* 2014; 78(1): 42-50. Review. 査読有
- (6) Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. *PLoS One.* 2014 Aug 5; 9(8): e103993. doi: 10.1371/journal.pone.0103993. 査読有
- (7) Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in HESR1 knockout mice. Kanno K, Kokubo H, Takahashi A, Koide T, Ishiura S. *J Neurosci Res.* 2014 Mar; 92(3): 287-97. doi: 10.1002/jnr.23291. 査読有
- (8) Induction of Timp1 in smooth muscle cells during development of abdominal aortic aneurysms. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Ishida M, Ishida T, Yoshizumi M. *Hiroshima J Med Sci.* 2013 Sep; 62(3): 63-7. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Masao yoshizumi, Yumiko saga, and Hiroki Kokubo Identification of early progenitors for the sinus venosus in heart development 日本分

- 子生物学会 2015 年 12 月 1～4 日 横浜
- (2) 鎌田諒、小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、吉栖正生 腹部大動脈瘤の弾性繊維変性における骨形成因子の役割 循環器学会 中国地方会 2015 年 11 月 28 日 広島
- (3) 鎌田諒、小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、吉栖正生 腹部大動脈瘤に於ける *Osteoprotegerin* の役割 脈管学会 2015 年 10 月 29～31 日 東京
- (4) 鎌田諒、小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、吉栖正生 腹部大動脈瘤形成における骨形成因子の抑制的役割 第 8 回 大動脈分子病態研究会 2015 年 8 月 20 日 久留米
- (5) Hiroki Kokubo, Batmunkh Bumdelger, Ryo Kamata, and Masao Yoshizumi 大動脈瘤形成における血管平滑筋細胞による *TIMP1* 遺伝子の発現誘導 脈管学会 2014 年 10 月 30 日から 11 月 1 日 倉敷
- (6) 小久保博樹 心血管系における *Hes2* の役割 遺伝医学研究会 2014 年 7 月 25 日 東京
- (7) Batmunkh Bumdelger, Hiroki Kokubo, Ryo Kamata, Masayuki Fujii, Hiroki Aoki, Mari Ishida, Takafumi Ishida and Masao Yoshizumi Induction of *Timp1* in Smooth Muscle Cells during Development of Abdominal Aortic Aneurysms. IVBM 国際血管学会 2014 年 4 月 14～17 日 京都
- (8) 小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、鎌田諒、吉栖正生 *Osteoprotegerin* の大動脈瘤形成に果たす役割 第 6 回 大動脈分子病態研究会 2013 年 8 月 23 日 久留米

〔図書〕(計 2 件)

- (1) マウス実験の基礎知識 第2版 小出 剛 編 オーム社 2013年 **第13章「トランスジェニックマウスを作製しよう」** P171-180, **第14章「ノックアウトマウスを作製しよう」** P181-196, **執筆担当 小久保博樹**
- (2) 遺伝子図鑑 国立遺伝学研究所「遺伝子図鑑」編集委員会編 悠書館 2013年 第二章 2-2 人間を構成する器官(2)消化器系・循環器系 p28-29, 第六章 6-3 動物の発生を制御する遺伝子 p124-125, **執筆担当 小久保博樹**

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
広島大学・小久保 博樹 (Kokubo Hiroki)
大学院医歯薬保健学研究院(医)・講師
研究者番号：10270480

(2) 研究分担者
広島大学・吉栖 正生 (Yoshizumi Masao)
大学院医歯薬保健学研究院(医)・教授
研究者番号：20282626

(3) 連携研究者
()

研究者番号：