

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460273

研究課題名(和文) In vivo胚心筋傷害モデルの作製とマイクロアレーを用いた心筋再生機構の検討

研究課題名(英文) In vivo and microarray analyses of mechanisms regulating embryonic myocardial maturation and regeneration

研究代表者

中島 裕司 (NAKAJIMA, Yuji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80207795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：初期心臓発生における心室心筋の成長と分化に対する心外膜の役割と胚心筋傷害の修復過程について検討した。原始心外膜は心室心筋の緻密層の成長と分化に関与し、原始心外膜と心筋の組織間相互作用を司るシグナルはTGFとFGFであった。原始心外膜の形成阻害によって心室心筋緻密層の菲薄化が起こった。凍結傷害による心外膜形成前の心筋傷害モデルを作製した。その傷害修復過程では、凝血塊形成、瘢痕形成、瘢痕収縮と心筋肥大(肥大については未確認)が経時的に起こったが、心筋細胞の過剰な増殖と心筋再生は検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：In this project, roles of primitive epicardium against the myocardial development before the onset of coronary circulation was investigated; and a cardiomyocyte injury model was established to examine the restoration process of the injured cardiomyocytes during development. Primitive epicardium was required for proper development of the compact ventricular layer and the signaling molecules regulating the cardiomyocyte differentiation and maturation were FGF and TGF. The investigator also established cryoinjury model of the developing heart during embryogenesis. The restoration process of the injured heart included formation of the clot, scar formation, scar contraction and cardiomyocyte hypertrophy surrounding the injury. Neither cardiomyocyte proliferation nor regeneration was observed at the acute phase of restoration. Further experiments are necessary to elucidate the mechanisms underlying the restoration of the injured heart during development.

研究分野：解剖学・発生学

キーワード：胚心臓 心筋傷害 心筋修復 冠状血管 心外膜 心内皮細胞 発生学 解剖学

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生初期(初期神経胚) 左右の前方側板中胚葉に存在する予定心臓領域が融合して一本の原始心筒として形成され、拍動(循環)が開始する。原始心筒は内側の内皮細胞層と外側の心筋層で構成される。原始心筒は伸長し、右に曲がったループ心筒を形成する。ループ心が形成されると、心臓静脈門(静脈洞)前壁の中胚葉組織から心外膜原基が発生し、心外膜原基から派生した原始心外膜が第三の層として心筋表面をシート状に覆う。原始心外膜は上皮間葉移行によって間葉細胞を心外膜下に供給する。この間葉細胞は血管内皮細胞、平滑筋細胞、外膜細胞に分化し冠循環を司る冠状血管を形成する。さらに心臓間質細胞を供給し、心筋層の形成にも関与する。しかし原始心外膜がどのようなメカニズムで心筋層成長に係るかは不明である。また心外膜マーカーを用いたマウスの研究で原始心外膜から心筋が分化し傷害心筋の再生に寄与する可能性が示唆されたが否定的な報告もある。

(2) 哺乳動物の心臓は冠状動脈の閉塞等による心筋傷害(心筋梗塞)を起こすと、障害心筋は癒痕組織に置換され、心筋細胞は再生しない。したがって広範囲の心筋傷害は心不全を惹起する。一方、イモリ(有尾両生類)やゼブラフィッシュ(硬骨魚類)は再生能力を持ち、四肢(魚類では鰭)のみでなく成体心臓の傷害も再生し心筋組織によって修復される。しかしこの心筋再生を司る細胞機構や分子機構は不明である。また有羊膜類の胚子・胎児の心筋再生に係る研究はなくアフリカツメガエル(無尾両生類)では変態前の胚子期の心筋再生能力が知られている。

2. 研究の目的

(1) 原始心外膜の除去によりどのような心筋発生異常(心筋傷害)が起こるかを明らかにしその分子機構について検討する。

(2) 原始心外膜形成前の心筋傷害モデルを

作製し、その修復過程を明らかにする。また心筋再生(新生や過剰な増殖)が起こればそのメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚心臓を用いた心外膜形成不全モデルの作製: ニワトリ受精卵の卵殻を開窓し発生ステージ16のニワトリ胚(心ループが形成されたステージ)の心膜体腔を開放し、心外膜原基をバイプレッションニードルによって切除した。また心外膜原基を卵殻膜で覆い原始心外膜の伸展をブロックした。

(2) ニワトリ胚心臓を用いた心筋傷害モデルの作製: 心外膜形成前の発生ステージ16の原始心室心尖部に、凍結、切除、熱傷害を与え適切な傷害モデルを検討した。

(3) 組織学的検討: 作製したモデルの心臓は緩衝ホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィンあるいはOCTコンパウンドに包埋し、それぞれパラフィン切片、凍結切片標本作製した。パラフィン切片はヘマトキシリンエオジン染色を行い形態変化を観察し、凍結切片は特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行い目的分子の組織内局在を検出した。培養細胞は固定し蛍光免疫染色によって目的分子の局在を検出した。

(4) 器官培養: 胚心臓から心筋組織あるいは心外膜組織を単離し、心筋単独あるいは共培養(心筋+心外膜)を無血清培地にて行った。検討する目的の分子あるいはその阻害物質を培地に添加し機能獲得実験と機能阻害実験を行った。

(5) ウェスタンブロット: 組織をSDSサンプルバッファーに可溶化し、SDSポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルに展開した蛋白分子はPTFD膜に転写し特異的抗体を用いて目的のタンパク質を検出した。

(6) *in vivo*での遺伝子機能阻害: 目的分子のドミナントネガティブレセプター(組織に発現し目的分子の細胞内シグナルを抑制する)の遺伝子を遺伝子導入試薬(リポフェク

トアミン)に混和し、心膜体腔に微量注入し心筋に遺伝子導入を行った。再孵卵後、心筋組織の分化を組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 心外膜除去モデルの心室緻密層は菲薄化していた：ヘマトキシリンエオジン染色の組織切片で観察すると心外膜除去モデルの心室心筋はコントロール群に比較し外層の緻密層が菲薄化していた。心筋細胞の横紋構造を筋肉アクチニン、細胞膜をカドヘリン、核を DAPA で染色した。その結果、心外膜除去モデルでは横紋構造が未発達で単位面積当たりの心筋細胞の数が増加していた。この結果は心外膜除去モデルでは心筋の横紋構造が未発達で心筋細胞が小さい(正常心筋肥大の抑制)ことを示しており、心筋分化とその成長には心外膜が必要であることが判明した。

(2) 心外膜除去モデルの心筋では FGF と TGF β シグナルが減少していた：心外膜除去モデルで、心筋発生に係る FGF(繊維芽細胞増殖因子)、TGF β (形質転換成長因子)、BMP(骨形成因子)の発現およびシグナルについて免疫染色とウエスタンブロットによって検討した。その結果、心外膜には TGF β が発現していたため、心外膜除去モデルでは心筋の TGF シグナル伝達(リン酸化 Smad2)が低下していた。また心筋除去モデルの緻密層では FGF の発現が低下し、FGF シグナル(リン酸化 ERK)が低下していた。BMP シグナルに差はなかった。以上の結果から、心外膜除去モデルの心筋では TGF β 、FGF シグナルが减弱していることが明らかになった。

(3) TGF と FGF シグナルは培養心筋の分化と肥大化を促進した：心外膜除去モデルでは心室緻密層の心筋分化と正常心筋肥大が抑制され緻密層が菲薄化していた。この結果は心外膜由来のシグナルが心筋分化と肥大を誘導していることを示唆する。心室心筋を培養し、培養した心外膜の培養上清を添加したところ心筋分化と肥大化が誘導された。次

に心外膜と共培養した心室に TGF β のインヒビターを投与したところ心筋分化と肥大化が抑制された。また FGF インヒビターの投与によって肥大化が抑制された。次に無血清培養した心室心筋の培地に TGF β と FGF のリコンビナントタンパクを添加したところ、心筋分化と心筋肥大化を誘導することができた。この結果は心室心筋緻密層の成長には心外膜から分泌される、あるいは心外膜によって心筋に誘導される TGF β 、FGF シグナルが関与していることが明らかになった。

(4) *in vivo* 心室のドミナントネガティブ TGF β レセプターとドミナントネガティブ FGF レセプターの共発現は心筋分化と肥大化を抑制した：培養での TGF β と FGF の作用を確認するために発生ステージ 16 の心室心筋にドミナントネガティブ TGF β レセプターとドミナントネガティブ FGF レセプターを遺伝子導入し、発生ステージ 29 で心室心筋緻密層の成長を検討した。その結果、実験群では心筋分化と心筋細胞の正常肥大化が抑制されていた。

以上の結果から、冠循環完成前の心室心筋緻密層の成長(分化と正常肥大)には原始心外膜由来の誘導シグナルが必要で、TGF β と FGF がシグナルの一端を担っていることが明らかになった。発生過程において心尖部心外膜は最も後に形成される。今回の研究結果から心外膜形成不全はヒトに発症する心尖部心筋緻密化障害の原因の一つであることが示唆された。

(5) 心室傷害モデルの作製：心外膜形成前の胚心臓の心筋傷害モデルの作製を行った。傷害は冷凍、切除、熱傷害の3方法について検討した。傷害後の心臓組織切片で傷害組織が確認され生存率が高い冷凍傷害をモデルとして選択した。冷凍傷害モデルは、液体窒素で1分間冷却した直径200マイクロメートルの自家製チタンプローブを使用した。発生ステージ16まで孵卵した受精卵は4で約1

時間冷却し拍動を停止させた。心臓を心外膜腔から露出させ心室心尖部に冷却したプローブを接触させ傷害を作った。1分間の接触後、ペニシリン・ストレプトマイシンを含有するタイロイド緩衝液を心膜体腔内に投与し、卵殻窓をセロハンテープで閉鎖して再孵卵した。目的のステージで心臓を摘出し組織学的検討を行った。

(6) 胚心臓冷凍傷害モデルの修復過程：冷凍傷害・再孵卵後胚心臓を摘出しヘマトキシリンエオジンで染色した連続組織標本作製し修復過程を観察した。傷害後1日では冷凍傷害部位の心筋は完全に欠損していた。欠損心筋部位に隣接する内皮細胞は心室外に突出し、突出した内皮細胞の袋内に血球細胞が認められた。また内皮細胞は形成された原始心外膜に接触していた(内皮細胞、凝血塊、心外膜による修復)。傷害後2日目では修復部位の内皮細胞および心外膜下に間葉細胞が集積していた。これらの間葉細胞はそれぞれ心内膜、心外膜の上皮間葉移行によって形成されたものと推測された(癒痕形成)。傷害3から4日では傷害部位の間葉細胞が増殖し癒痕様組織を形成し、心内膜の袋状突出(心内膜嚢)の頸部は狭小化していたが心筋に置換されてはいなかった。傷害5日後には癒痕組織は残っているものの心内膜嚢頸部の内腔は消失していたが内皮細胞は残っていた。また癒痕周辺の心筋細胞は厚くなっているように見えた(癒痕収縮と心筋細胞の増殖あるいは肥大)。今後、さらに長期的に経過を追跡する予定である。

(7) 心内膜および心外膜由来の癒痕組織中に幼弱心筋細胞は認められなかった：癒痕形成期の癒痕組織から心筋細胞が発生しうるかについて、幼弱心筋マーカーの免疫染色で検討した。その結果、癒痕組織内に幼弱心筋細胞は認められなかった。すなわち心外膜あるいは心内膜が脱分化し新たに心筋に形質転換する修復過程を検出することはできな

かった。

(8) 急性期の修復過程で過剰な心筋細胞の増殖は検出できなかった：傷害2日から7日の間で心筋増殖を検討した。凍結切片を作製し、細胞分裂M期のマーカー分子リン酸化ヒストンH3と心筋分化マーカーMef2Cの二重蛍光免疫染色を行った。心筋傷害周辺でM期の心筋細胞の過剰増加は認められなかった。今後は急性期の心筋細胞の肥大と、亜急性期、慢性期の心筋細胞の増殖および肥大について検討する必要がある。心筋が過剰増殖している時期を明らかにし、DNAマイクロアレーを実施し増殖にかかわる分子機構について検討したい。

(9) 結論

冠状血管形成前の心室心筋緻密層分化と成長には心外膜と心筋の相互作用が必要であり、TGFβ、FGFシグナルがその一端を担っている。

心外膜形成前の凍結心筋傷害モデルを作製した。

心外膜形成前の心筋傷害の急性期の修復は凝血塊形成、癒痕形成、癒痕収縮と心筋肥大(肥大については未確認)が経時的に起こった。

癒痕組織からの心筋再生(新生)傷害部位周辺の過剰心筋増殖は検出できなかった。

心筋傷害修復過程と心筋増殖については亜急性期、慢性期での検討が必要である。

<引用文献>

Sakabe M, Matsui H, Sakata H, Ando K, Yamagishi T, Nakajima Y. Understanding heart development and congenital heart defects through developmental biology: A segmental approach. *Cong Anomalies* 45, 107-118, 2005

Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K. New insights into the developmental mechanisms of coronary vessels and epicardium. *Int Rev*

Cell Mol Biol 303, 263-317, 2013

Uygun A, Lee RT. Mechanisms of cardiac regeneration. Dev Cell 36:362-374, 2016

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)

Takahashi M, Yamagishi T, Narematu M, Kamimura T, Kai M, Nakajima Y. The epicardium is required for sarcomeric maturation and cardiomyocyte growth in the ventricular compact layer mediated by TGF β and FGF before the onset of coronary circulation. Congenital Anomalies 54:162-171, 2014.

doi:10.1111/cga.12048. (査読あり)

Narematu M, Kamimura T, Yamagishi T, Fukui M, Nakajima Y. Impaired development of left anterior heart field by ectopic retinoic acid causes transposition of the great arteries. J Am Heart Assoc 2015;4:e001889 pp1-11

doi:10.1161/JAHA.115.001889(査読あり)

Nakajima Y Signaling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects. Cong Anom 55, 17-25, 2015.

doi:10.1111/cga.12072. (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

高橋真樹子、山岸敏之、馴松麻悠、上村竜也、甲斐理武、中島裕司 冠状血管形成前の心室緻密層の成長は TGF β と FGF により促進される 第 53 回日本先天異常学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) 2013 年 7 月 21 日

高橋真樹子、寺迫優美、柳川成章、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司 特定の咽頭弓の心臓形成領域の発生異常が特定の円錐動脈幹奇形を起こす可能性 第 53

回日本先天異常学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) 2013 年 7 月 21 日

安藤克己、山岸敏之、中島裕司 ウズラ胚における上行大動脈壁の成熟と冠状動脈形の形成に関する免疫組織化学的研究 第 53 回日本先天異常学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市) 2013 年 7 月 21 日

山岸敏之、甲斐理武、中島裕司 心臓弁・中隔原基である心内膜床での sox9 と slug の強調作用 第 53 回日本先天異常学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)、2013 年 7 月 21 日

上村竜也、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司 心臓冠状血管内皮細胞の起源について:鳥類胚を用いた検討 日本解剖学会第 89 回近畿支部学術集会 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市) 2013 年 11 月 30 日

上村竜也、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司 心臓冠状血管内皮細胞の起源について:鳥類胚を用いた検討 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市) 2014 年 3 月 28 日

山岸敏之、山本宗之、北条未佳、上村竜也、甲斐理武、山岸敏之、中島裕司 ニワトリ胚心外膜発生過程におけるカドヘリン 11 の局在 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市) 2014 年 3 月 28 日

Nakajima Yuji, Narematu Mayu, Kamimura Tatsuya. Impaired development of left anterior heart field by ectopic retinoic acid causes transposition of the great arteries in the chick embryonic heart. 第 120 回日本解剖学会総会・学術集会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015 年 3 月

22 日

Ando Katsumi, Yamagishi Toshiyuki,

Nakajima Yuji. Immunohistochemical

observation of the aorta and heart outflow tract during the initial formation of proximal coronary arteries. 第 120 回日本解剖学会 総会・学術集会 神戸国際会議場(兵庫県 神戸市) 2015 年 3 月 22 日

馴松麻悠、上村竜也、山岸敏之、中島裕司 左前方咽頭弓の二次心臓領域の発生異常によって完全大血管転位が起こる 第 55 回日本先天異常学会学術集会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2015 年 7 月 26 日

馴松麻悠、上村竜也、山岸敏之、中島裕司 左前方咽頭弓に存在する心臓領域の発生異常によって完全大血管転位(TGA)が起こる 第 91 回日本解剖学会近畿支部学術集会 京都工芸繊維大学(京都府京都市) 2015 年 11 月 28 日

上村竜也、中島裕司 鳥類冠状血管内皮細胞は心外膜原基の静脈洞由来内皮細胞および臓側中胚葉細胞から発生する 第 121 回日本解剖学会総会・学術集会 ビックパレット福島(福島県郡山市) 2016 年 3 月 30 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/organic/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中島 裕司 (NAKAJIMA, Yuji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 80207795