

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32822

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462147

研究課題名(和文) 二弁性大動脈弁における神経堤細胞の役割とその分子基盤の解析

研究課題名(英文) Role of neural crest cells in bicuspid aortic valve

研究代表者

富田 幸子 (Miyagawa-Tomita, Sachiko)

ヤマザキ学園大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：40231451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：左室流出路の出口に位置し血液逆流を防ぐ大動脈弁は3弁で構成される。先天的性二弁性大動脈弁は最もよく見られる先天性心疾患で、一般人口の約0.5-2%を占め、男性に多く、大動脈壁の異常とも関連する。成人の大動脈弁はfibrosa、spongiosa、ventricularisの細胞外基質の3層構造からなり、各々collagen、proteoglycan、elastinが構成する。大動脈弁の形成には心内皮由来細胞、二次心臓形成領域由来細胞、神経堤由来細胞が関わる。本研究で、大動脈弁での後耳胞神経堤と前耳胞神経堤細胞の分布が異なり、大動脈壁の合併疾患と関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aortic valve which consists of three valve leaflets prevents regurgitant blood flow at the outflow tract of the left ventricle. Bicuspid aortic valve is the most common congenital heart defect, occurring in 0.5% to 2% of the general population, with a higher prevalence in men. Mature aortic valves are stratified into extracellular matrix layers rich in elastin (ventricularis), proteoglycan (spongiosa) and collagen (fibrosa). Formation of the aortic valve is involved in endocardial cells, second heart field derived cells, and neural crest derived cells. In our research, postotic and preotic neural crest cells were shown distinctive patterns in the aortic valve leaflets. And we confirmed that neural crest cells were involved in the development of the ascending aorta.

研究分野：循環器発生学

キーワード：大動脈弁 二弁性大動脈弁 神経堤細胞 1細胞解析

1. 研究開始当初の背景

先天性二弁性大動脈弁は最もよく見られる先天性弁疾患の1つで、一般人口の0.5~2%を占め、男性に多い。本疾患は大動脈弁狭窄、逆流、大動脈壁の異常とも関連している(Abdulkareem, et al. 2013)。弁形成は、局所心筋により心内皮細胞が間葉系細胞に形質転換して弁が形成(de Lange, et al. 2004)され多くの転写因子やシグナル因子が関連しているが、弁形成の詳細なメカニズムは依然として不明なことが多い。

最近の研究で半月弁(大動脈弁と肺動脈弁)形成には、心内皮由来細胞(Noden, 1991; Tirosch-Finkel, et al. 2006; Park, et al. 2008; Watanabe, et al. 2010)、二次心臓形成領域細胞(Park, et al. 2008)、神経堤細胞(Kappetein, et al. 1991; Makki, et al., 2012; Arima et al. 2012)が関与することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈弁を構成する細胞成分の起源とその分布を明らかにし、弁における神経堤細胞のふるまいを検討することである。さらに流出路における神経堤細胞に発現する遺伝子についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 神経堤マーカーマウス *Wnt1-Cre* と *R26R* レポーターマウス交配で得た胚をステージ毎に弁を検討した。*Wnt1-Cre* と *R26REYFP* マウスを交配し、YFP 発現する胚の心流出路から蛍光発現する細胞をソーターで抽出して細胞1個ずつの性質について Fluidigm を使って検討した。

(2) ウズラ-ニワトリ神経堤移植キメラ胚の弁を検討し、前耳胞と後耳胞の移植キメラデータを Amira ソフトで 3D 解析した。

4. 研究成果

(1) *Wnt1-Cre ; R26R* マウス胚を各発達段階に採取し、神経堤細胞の分布の様子を検討したところ表1のように大動脈弁と肺動脈弁の

右冠動脈弁(右半月弁)(RCC)と左冠動脈弁(左半月弁)(LCC)に多数の神経堤細胞の分布を認めたと、大動脈弁の無冠動脈弁(NCC)には細胞分布が少なく、肺動脈弁の前半月弁には神経堤細胞は認められなかった。

表 1

Mouse <i>Wnt1-Cre</i> positive Cells	
AOV	PAV
RCC(+++)	RCC(+++)
NCC(+)	ACC(-)
LCC(+++)	LCC(+++)

(2) キメラ胚の結果を表2に示した。後耳胞キメラ胚(postotic)では、肺動脈弁に多数の神経堤細胞の分布を認めた。大動脈弁では右冠動脈弁にのみ神経堤細胞の分布を認めたが、他の左冠動脈弁および無冠動脈弁には神経堤細胞が認められなかった。前耳胞キメラ胚(preotic)では、多数の神経堤細胞が大動脈弁3弁に分布していた。肺動脈弁3弁にも神経堤細胞を認めたが大動脈弁よりも数は少なかった。これらの所見は Amira ソフトで 3D 解析を実施し確認した。

表 2

Chick NCC			
postotic		preotic	
AOV	PAV	AOV	PAV
RCC (++)	RCC (+++)	RCC (+++)	RCC (++)
NCC (-)	ACC (+++)	NCC (+++)	ACC (++)
LCC (-)	LCC (+++)	LCC (+++)	LCC (++)

(3) *Wnt1-Cre;R26REYFP* で得た YFP 発現する胚の心流出路で、細胞1個ずつの性質を検討したところ、Sox10 と cKit 発現がみられた。cKit は心臓内に分布する神経堤細胞の報告がすでにあるため、今後 Sox10 他について調べる必要がある。

<引用文献>

Abdulkareem N, et al. Bicuspid aortic valve aortopathy: genetics, pathophysiology and medical therapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;17(3):554-9.

de Lange FJ, et al. Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res*. 2004;95(6):645-54.

Noden DM. Origins and patterning of avian outflow tract endocardium. *Development*. 1991;111(4):867-76.

Tirosh-Finkel L, et al. Mesoderm progenitor cells of common origin contribute to the head musculature and the cardiac outflow tract. *Development*. 2006;133(10):1943-53.

Park EJ, et al. An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. *Development*. 2008;135(21):3599-610.

Watanabe Y, et al. Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. *Circ Res*. 2010;106(3):495-503.

Kappetein AP, et al. The neural crest as a possible pathogenetic factor in coarctation of the aorta and bicuspid aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991;102(6):830-6.

Makki N, et al. Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Hum Mol Genet*. 2012;21(1):26-31.

Arima Y, et al. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nat Commun*. 2012;3:1267.

〔雑誌論文〕(計10件)

Maeda K, 他6名中6番目. Postotic and preotic neural crest cells differently contribute to thyroid development. *Dev Biol*, 査読有, Vol.409, 2015, pp.72-83. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.10.026.

Moriya M, Inoue S, Miyagawa-Tomita S, 他8名. Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. *Hum Mol Genet*, 査読有, Vol.24, 2015, pp.7349-7360. doi: 10.1093/hmg/ddv435.

Kitazawa T, 他13名中8番目. Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids. *Nat Commun*. 査読有, Vol.6, 2015, pp.6853-6858. doi: 10.1038/ncomms7853.

Kitazawa T, 他19名中14番目. Distinct effects of Hoxa2 overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratohyal boundary maps within the styloid process. *Dev Biol*, 査読有, Vol. 402, 2015, pp.162-174. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.007.

Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Miyagawa-Tomita S. Tenascin-C in development and disease of blood vessels. *Anat Rec (Hoboken)*, 査読有, Vol 297, 2014, pp.1747-1757. doi: 10.1002/ar.22985.

Inoue S, 他10名中3番目. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet*, 査読有, Vol.23, 2014, pp.6553-6566. doi: 10.1093/hmg/ddu376.

Vincent SD, 他6名中4番目. Prdm1 functions in the mesoderm of the second heart

field, where it interacts genetically with Tbx1, during outflow tract morphogenesis in the mouse embryo. *Hum Mol Genet*, 査読有, Vol.23, 2014, pp.5087-5101. doi: 10.1093/hm/ddu232.

宮川-富田幸子, 他 4 名. 新たな心臓系譜: 前耳胞神経堤細胞. *細胞工学*, 査読無, Vol.33, 2014, pp.1130-1135.

Inagawa M, 他 15 名中 14 番目. Histone H3 lysine 9 methyltransferases, G9a and GLP are essential for cardiac morphogenesis. *Mech Dev*, 査読有, Vol.130, 2013, pp.519-531. doi: 10.1016/j.mod.2013.07.002.

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, 他 5 名. *Hesr2* knockout mice develop aortic valve disease with advancing age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読有, Vol.33, 2013, pp.e84-92. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300573.

[学会発表](計 27 件)

丸山和晃, 宮川-富田幸子, 他 8 名. Semaphorin3E-PlexinD1 は冠動脈形成に重要な役割を果たす. 日本心臓血管発生研究会、2015 年 12 月 18-19 日、磐梯熱海、福島

瀬谷大樹, 宮川-富田幸子, 他 6 名. 心流出路に遊走する神経堤細胞の系譜とレチノイン酸の作用の検討. 日本心臓血管発生研究会、2015 年 12 月 18-19 日、磐梯熱海、福島

丸山和晃, 宮川-富田幸子, 他 8 名. Semaphorin3E-PlexinD1 は冠動脈形成に重要な役割を果たす. 日本血管生物医学会、YIA-JV-2. 2015 年 12 月 10-12 日、神戸

井上晋一, 守谷充司, 宮川-富田幸子, 他 9 名. がん原遺伝子 BRAF の機能獲得性変異は先天性異常を引き起こす. 第 38 回日本分子生物学会年会, 1W5-p-4, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸

Maruyama K, Miyagawa-Tomita S, 他 8 名 (2015) Semaphorin3E- Plexin D signaling is important for coronary artery formation. 第 38 回日本分子生物学会, 1P0924, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸

Maruyama K, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Semaphorin 3E-Plexin D1 signaling is important for coronary artery formation. Weinstein Cardio-vascular Development Conference. Boston, USA. April 29- May 2, 2015.

井上晋一, 守谷充司, 渡辺祐介, 宮川-富田幸子, 他 7 名. BRAF ノックインマウス作製によるRASopathiesの病態解明と治療法研究. (2014, 11月25-27日)第37回日本分子生物学会、2W8-3(2P-0856)、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜

丸山和晃, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. Semaphorin3E, PlexinD1の心臓血管系発生における役割の解明. (2014, 11月25-27日)第37回日本分子生物学会、1P-0585、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜
前田和宏, 浅井理恵子, 栗原裕基, 宮川-富田幸子. Preotic neural crest cells contribute to thyroid

bilobation. (2014, 11月25-27日)第37回日本分子生物学会1P-0589, パシフィコ横浜, 神奈川, 横浜

丸山和晃, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. Semaphorin3E, PlexinD1の心臓血管系発生における役割の解明. (2014, 10月17-18日)第13回日本心臓血管発生研究会, 磐梯熱海温泉ホテル華の湯, 福島県, 郡山市
井上晋一, 守谷充司, 渡辺祐介, 宮川-富田幸子, 他 7 名. BrafQ241R ノックインマウスによるcardio-facio-cutaneous症候群の病態解明と治療法研究(2014, 10月17-18日)第13回日本心臓血管発生研究会, 磐梯熱海温泉ホテル華の湯, 福島県, 郡山市

浅井理恵子, 宮川-富田幸子, 他 6 名. 胚外壁側葉中胚葉は心血管形成に寄与する (2014, 10月17-18日) 第13回日本心臓血管発生研究会, 磐梯熱海温泉ホテル華の湯, 福島県, 郡山市

井上晋一, 守谷充司, 渡邊裕介, 宮川-富田幸子, 他 7 名. 新規BRAFノックインマウスの作製によるcardio-facio-cutaneous症候群の病態解明と治療法研究(2014, 11月19-22日) 第59回日本人類遺伝学会, タワーホール船堀, 東京, 江戸川区

赤池 徹, 大森衣理子, 梶村いちげ, 宮川-富田幸子, 他 2 名. 鳥類の動脈管閉鎖時に弾性線維構造が断裂・減弱する (2014, 7月3-5日) 第50回日本小児循環器学会, 11-P-077, 岡山コンベンションセンター, 岡山県, 岡山市

S Miyagawa-Tomita, 他 5 名. The cardiac neural crest concept revisited.(2014, May 8-10)Weinstein Cardiovascular Development Conference, Madrid, Spain

S Miyagawa-Tomita, 他 6 名(2014, Jan 15) The preotic neural crest directly contributes to the coronary artery.東京女子医学内研究交流会,東京

前田和宏, 宮川-富田幸子, 中西利雄. (2014年1月15日) 甲状腺と心臓血管系の形態形成における関係.東京女子医学内研究交流会,東京

北沢太郎, 久米秀明, 宮川-富田幸子, 栗原裕基 (2013 Dec 3-6) 鼓膜の発生とエンドセリン-Dlx5/6 経路: ほ乳類と八虫類の比較発生学. 第 36 回日本分子発生生物学会, 3P-0605, 神戸

Miyagawa-Tomita S, 他 13 名(2013 July 13-15) The preotic neural crest directly contributes to the coronary arteries. P-5. The 7th Takao International symposium on Etiology and Morphogenesis of Congenital

Heart Disease –From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-. Tokyo, Japan

⑳ Miyagawa-Tomita S, 他 6 名. (2013 July 13-15) The “cardiac neural crest” concept revisited. The 7th Takao International Symposium on etiology and morphogenesis of congenital heart disease –from gene function and cellular interaction of morphology-. SIX.3, pp.57, Tokyo, July 13-15.

㉑ Kurihara H, Arima Y, Maeda K, Asai R, Kurihara Y, Miyagawa-Tomita S. (2013 July 13-15) The preotic neural crest; a novel origin of coronary artery smooth muscle. The 7th Takao International Symposium on etiology and morphogenesis of congenital heart disease –from gene function and cellular interaction of morphology-. SIII.1, pp35, Tokyo, July 13-15.

㉒ Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Nakanishi T(2013 July 13-15) The role of thyroid hormone in developing heart. P-18. The 7th Takao International symposium on Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease –From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-. Tokyo, Japan

㉓ Asai R, Arima Y, Seya D, Kim KS, Kawamura Y, Kurihara Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H (2013 July 13-15) Endothelin receptor type A expressing cell population in the inflow tract contributes to chamber formation and conduction system development. P-11. The 7th Takao International symposium on Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease –From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-. Tokyo, Japan

㉔ K Maeda, S Miyagawa-Tomita, T Nakanishi. The role of thyroid hormone in developing

heart. 第 46 回日本発生生物学会,2013 年 5 月 28-31 日,島根

- ②6 S Miyagawa-Tomita, 他 13 名. The preotic neural crest directly contributes to the coronary arteries. (2013, May 16-18) Weinstein Cardiovascular Development Conference, Tucson, AZ, USA
- ②7 R Asai, Y Arima, D Seiya, KS Kim, Y Kawamura, Y Kurihara, S Miyagawa-Tomita, H Kurihara. Endothelin receptor type A expressing cell population in the inflow tract contributes to chamber formation and cardiac conduction system development (2013, May 16-18) Weinstein Cardiovascular Development Conference, Tucson, AZ, USA

〔図書〕(計 3 件)

K Maeda, S Miyagawa-Tomita, T Nakanishi. Role of the thyroid in developing heart. In Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease (The 7th Takao Symposium Proceeding Book), Springer. 2016(in print).

R Asai, 他 7 名中 6 番目. Endothelin receptor type A expressing cell population in the inflow tract contributes to chamber formation and conduction system development. In Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease (The 7th Takao Symposium Proceeding Book), Springer. 2016(in print).

S Miyagawa-Tomita, 他 2 名. The 'cardiac neural crest' concept revisited. In Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease (The 7th Takao Symposium Proceeding Book), Springer. 2016 (in print).

〔その他〕

プレスリリース:がん原遺伝子 BRAF の発生期の役割を解明-先天性疾患 CFC 症候群の病態解明と治療法開発へ (2014 年 7 月 22 日) 東

北大学. 青木洋子、小椋利彦、宮川-富田幸子. 東北大学、東京女子医科大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富田 幸子 (TOMITA, Sachiko)
ヤマザキ学園大学・公私立大学の部局等・
教授
研究者番号 : 4 0 2 3 1 4 5 1

(4)研究協力者

長尾 博明 (NAGAO, Hiroaki) 東京女子医科大学・医学部・技師
前田 和宏 (MAEDA, Kazuhiro) 東京女子医科大学・医学部・大学院生
瀬谷 大貴 (SEYA, Daiki) 東京大学・大学院医学研究科・大学院生
丸山 和晃 (MARUYAMA, Kazuaki) 東京大学・大学院医学研究科・大学院生
栗原 裕基 (KURIHARA, Hiroki) 東京大学・大学院医学研究科・教授