

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04883

研究課題名(和文) 心血管系の発生・形態形成に働くシグナル伝達機構の研究

研究課題名(英文) Signaling pathways that regulate cardiovascular development and morphogenesis

研究代表者

中川 修 (Nakagawa, Osamu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：40283593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：心血管発生・形態形成は多様な細胞間・細胞内情報伝達系・遺伝子発現調節機構によって制御され、ヒト先天性心疾患の病因として転写調節因子やシグナル伝達因子の変異・機能異常が重要である。本研究では心血管発生・形態形成に重要な情報伝達系において重要な遺伝子群の欠損によるマウスモデルにおける異常を詳細に解析するとともに、それら遺伝子の発現制御機構の解明につながる知見を得た。本研究の成果は心血管発生・形態形成の分子メカニズム解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular development and morphogenesis are controlled by a variety of cellular signaling pathways and gene regulatory systems, and their defects cause human congenital cardiovascular diseases. In this research project, we studied physiological significance of the genes that functioned as downstream targets of Notch and ALK1 signaling pathways by examining the abnormalities observed in the mouse models with gene deletions. In addition, we identified and characterized the enhancer regulatory regions for vascular endothelial expression of these genes. The information obtained in this project helps understand the molecular mechanisms of cardiovascular development and morphogenesis and the etiologies of congenital cardiovascular diseases.

研究分野：循環器医科学

キーワード：心血管系 発生 形態形成 シグナル伝達 転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

心血管系の発生・形態形成は胎児発育に必須の初期ステップであり、先天性心疾患は出生児約 100 人に 1 人発症する最も多い先天性臓器構造異常である。心血管発生は多様な情報伝達系・遺伝子発現調節機構によって制御されており、多くの転写因子やシグナル伝達因子の変異や機能異常がヒト心血管構造異常の原因となる。

Notch 情報伝達系は心血管発生に必須の役割を有し、Alagille 症候群をはじめとするヒト疾患の原因となる。私たちは Notch シグナルの心血管系における主要下流転写因子 Hey ファミリーを同定し、その生理的意義を報告してきた。Hey2 欠損マウスは三尖弁閉鎖・心室中隔欠損症モデルとして重要であり、成長後の心収縮能にも異常を示す。また、Hey1・Hey2 をともに欠損するマウスは全身の血管形成異常によって胎生致死となった。一方、TGFβファミリーに属する Bone morphogenetic protein 9(BMP9)と BMP10 も ALK1 受容体の活性化により内皮分化と血管形態形成を制御する。ALK1 の欠損マウスは動脈形成異常により胎生致死となり、ヒト遺伝子変異は遺伝性出血性末梢血管拡張症や肺動脈性肺高血圧症の原因となる。私たちは ALK1 系の新規下流遺伝子 Tmem100 を同定して、Tmem100 欠損マウスが ALK1 欠損マウスと酷似する心血管形態形成・内皮分化の障害により胎生致死となることを報告した。これらの欠損マウスは様々な心血管形態形成異常を示すヒト先天性心疾患の新しいモデルとしても有用であることが示された。

2. 研究の目的

本研究では、Hey1 および Tmem100 欠損マウスにおいて発見した心血管異常に焦点をあて、組織学的手法・生化学的手法・分子生物学的手法を組み合わせ、Hey ファミリーと Tmem100 の心血管形態形成における意義を解析する。また、これら遺伝子の発現制御様式の解析を通して、上流のシグナル伝達機構も合わせて明らかにする。本研究は胎生期の心血管形態形成機構を明らかにし、ヒト先天性心血管構造異常の病因解明、新しい診断・治療法の発見にもつながる基盤情報をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

Hey1 および Tmem100 の欠損マウス・組織特異的 conditional 欠損マウスと新しい分子生物学的手法を組み合わせ、これら分子の機能と生体における意義を解析した。組織特異的遺伝子欠損を実現するために、Hey1 および Tmem100 の Floxed 遺伝子マウスシステムを作成するとともに、Tek-Cre・Tagln-Cre・Wnt1-Cre などの Cre 発現マウスシステムを導入した。また、

遺伝子発現制御機構の解析のため、大腸菌人工染色体ベクター系を用いた遺伝子発現制御領域解析レポーターマウスシステムを作成し、これら遺伝子の発現調節に働くエンハンサー領域の同定を試みた。

4. 研究成果

Hey2 欠損マウスの心臓形態形成異常と対照的に、Hey1 欠損マウスは大動脈弓原基である胎生期第 4 咽頭弓動脈の特異的欠失を生じ、大動脈弓離断症などの胸部大動脈異常を示すことが明らかになった。大動脈弓離断は 22q11.2 欠損症候群患者などにおいて認められる先天構造異常であり、Hey ファミリーの病態生理的意義がさらに高まった。

さらに、Hey1 欠損マウスにおいて咽頭弓動脈異常が生ずる分子メカニズムを解析し、Jag1 膜リガンドの発現低下を起点とした血管周囲細胞における Notch シグナル異常の重要性を提唱した。これらを報告する論文発表を行い、引き続き Hey1 欠損による異常を引き起こす細胞特異的分子機構を明らかにするために細胞特異的 Hey1 欠損マウスの作出を行った。血管内皮細胞・平滑筋細胞・神経堤由来細胞などにおける特異的 Hey1 欠損の結果を比較検討することにより、これまで大動脈弓離断症の原因として広く知られている Tbx1-Fibroblast growth factor シグナル系と異なる分子メカニズムの異常が生じていることが示唆された。

一方、ALK1 情報伝達系の新しい下流遺伝子として同定した Tmem100 について、全身の遺伝子欠損マウスには明らかな心内皮・間葉細胞転換異常が認められたが、現在までに心内膜内皮細胞特異的欠損マウスには検出可能な心臓構造異常を認めなかった。この結果は全身の血流障害による心内皮・間葉細胞転換への影響を示唆するものであるが、その分子機構は明らかになっていない。現在、より効率的な細胞特異的遺伝子欠損を生ずる実験系を用いて心内膜内皮細胞における Tmem100 の意義を再検討するとともに、誘導型遺伝子欠損系を用いた表現型解析も進めることを計画している。

Hey1 発現制御には Notch シグナル・ALK1 シグナルが関与することは報告されていたが、その転写調節エンハンサーは未同定のままであった。今回の研究によって、Hey1 の遺伝子発現は複数の組織特異的なエンハンサー領域を介して行われることが示された。血管系・心臓・体節・咽頭弓などの Hey1 発現領域において異なるメカニズムの転写調節が行なわれている可能性が注目された。

Tmem100 の胎生期血管内皮特異的発現制御機構に働くエンハンサー領域、さらには転写調節機構もこれまで未解析のままであったが、本研究において Tmem100 mRNA 発現様式を忠実に再現するエンハンサーが同定された。このエンハンサーに相当する染色体 DNA

領域はマウス・ヒトで保存されており、転写活性化の血管内皮特異性も共通であることが確認された。

先述のように、Hey1 欠損マウスに認められる大動脈弓離断症はヒトにおいても生じる先天構造異常であり、同じ転写調節因子ファミリーに属する Hey2 欠損によって生ずる心室中隔欠損症・三尖弁閉鎖などと合わせて、Hey ファミリーの病態生理的意義が注目される。今後さらに Hey ファミリーの心血管発生・形態形成における意義、特に発現制御を行うターゲット遺伝子群の同定を目指して研究を進めている。また、Tmem100 は血管発生に必須の因子であることを明らかにすることができたが、膜分子としての分子機能メカニズムには不明の点が多い。今後、複合体構成因子を介した分子機能の解析を通じ、Tmem100 が血管発生・形態形成に働く機序を明らかにして行きたいと考えている。さらに、これら遺伝子の発現制御機構の解析も継続して、心血管発生・形態形成を制御するシグナル伝達系との関連について検討を進める方針である。

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 7 件)

- ① Araki M, Hisamitsu T, Kinugasa-Katayama Y, Tanaka T, Harada Y, Nakao S, Hanada S, Ishii S, Fujita M, Kawamura T, Saito Y, Nishiyama K, Watanabe Y, Nakagawa O. Serum/glucocorticoid -regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 21:415-423, 2018. 査読有
- ② Watanabe Y, Miyasaka KY, Kubo A, Kida YS, Nakagawa O, Hirate Y, Sasaki H, Ogura T. Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbn1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophoblast. *Sci Rep* 7:46135, 2017. 査読有
- ③ Tai-Nagara I, Yoshikawa Y, Numata N, Ando T, Okabe K, Sugiura Y, Ieda M, Takakura N, Nakagawa O, Zhou B, Okabayashi K, Suematsu M, Kitagawa Y, Bastmeyer M, Sato K, Klein R, Navankasattusas S, Li DY, Yamagishi S, Kubota Y. Placental labyrinth formation in mice requires endothelial FLRT2/UNC5B signaling. *Development* 144:2392-2401, 2017. 査

読有

- ④ Fujita M, Sakabe M, Ioka T, Watanabe Y, Kinugasa-Katayama Y, Tsuchihashi T, Utset MF, Yamagishi H, Nakagawa O. Pharyngeal arch artery defects and lethal malformations of the aortic arch and its branches in mice deficient for the Hrt1/Hey1 transcription factor. *Mech Dev* 139:65-73, 2016. 査読有
- ⑤ Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos. *Dev Dyn* 244: 31-42, 2015. 査読有
- ⑥ 深山 俊治, 瀬谷 大貴, 井原 大, 川村 晃久, 渡邊 裕介, 中川 修. 「心臓・大血管の形態形成と転写調節因子」 *生体の科学* 68:531-535, 2017
- ⑦ 渡邊 裕介, 久光 隆, 片山 由美, 荒木 睦, 石井 修平, 藤田 匡秀, 坂部 正英, 中川 修. 「心血管形態形成における Hrt/Hey 転写調節因子の意義」 *循環器病研究の進歩 (通巻 55 号)* 36: 74-82

[学会発表] (計 16 件)

- ① 深山 俊治, 渡邊 裕介, 瀬谷 大貴, 井原 大, 荒井 勇二, 磯本 祥恵, 川村 晃久, 中川 修 日本心血管内分泌代謝学会学術集会 「胎生期血管内皮細胞における Hey1 遺伝子の発現制御機構」 2017 年 12 月 10 日 大阪市
- ② 荒木 睦, 渡邊 裕介, 久光 隆, 田中 亨, 原田 恭弘, 片山 由美, 川村 晃久, 中川 修 日本血管生物医学学会学術集会 「BMP-ALK1 シグナル伝達系の新しい下流 遺伝子 としての Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) の意義」 2017 年 12 月 8 日 大阪市
- ③ 渡邊 裕介, 石井 修平, 深山 俊治, 上本 泰生, 井原 大, 西谷 友重, 荒井 勇二, 中川 修 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 「Hey1 expression in pharyngeal arch and presomitic mesoderm is regulated by a distal enhancer」 2017 年 12 月 8-9 日 神戸市
- ④ 深山 俊治, 渡邊 裕介, 瀬谷 大貴, 井原 大, 荒井 勇二, 磯本 祥恵, 中川 修 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 「胎生期血管内皮細胞における Hey1 遺伝子の発現制御機構」 2017 年 12 月 8-9 日 神戸市
- ⑤ 片山 由美, 富松 彩佳, 渡邊 裕介, 瀬

- 谷 大貴、荒井 勇二、磯本 祥恵、斎藤 能彦、中川 修 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会 「胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における発現制御機構の解析」 2017 年 12 月 7 日 神戸市
- ⑥ Yusuke WATANABE, Masahide FUJITA, Shuhei ISHII, Toshiharu FUKAYAMA, Dai IHARA, Daiki SEYA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease 「Significance of Hey1 transcription factor in pharyngeal arch artery formation and regulatory mechanisms of its expression during embryonic development」 2017 年 10 月 7 日 松江市
- ⑦ Mutsumi ARAKI, Yusuke WATANABE, Takashi HISAMITSU, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Toru TANAKA, Yukihiro HARADA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease 「Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 signaling in vascular endothelial cells」 2017 年 10 月 7 日 松江市
- ⑧ 渡邊 裕介、中川 修 日本解剖学会総会全国学術集会 「咽頭弓に存在する二次心臓領域発生の分子機構」 2017 年 3 月 28 日 長崎市
- ⑨ 石井 修平、渡邊 裕介、上本 泰生、井原 大、久光 隆、深山 俊治、中川 修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 「Hrt1/Hey1 遺伝子の血管内皮発現制御機構における Notch および ALK1 シグナリングによる協調的転写調節メカニズム」 2016 年 12 月 17 日 東京都
- ⑩ 片山 由美、渡邊 裕介、富松 彩佳、佐藤 玄基、岩田 裕子、荒井 勇二、斎藤 能彦、中川 修 日本血管生物医学学会学術集会/日韓血管生物合同シンポジウム 「胎生期血管内皮遺伝子 TMEM100 の心血管形態形成における発現制御機構の解析」 2016 年 12 月 9 日 長崎市
- ⑪ 渡邊 裕介、石井 修平、深山 俊治、上本 泰生、井原 大、久光 隆、荒井 勇二、中川 修 日本血管生物医学学会学術集会/日韓血管生物合同シンポジウム 「Synergistic regulatory mechanisms of endothelial Hrt1/Hey1 gene transcription by Notch and ALK1 signaling pathways」 2016 年 12 月 9 日 長崎市
- ⑫ 片山 由美、岩田 裕子、富松 彩佳、渡邊 裕介、斎藤 能彦、中川 修 日本分子

生物学会年会 「胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における発現制御機構と分子機能の解析」 2016 年 12 月 1 日 横浜市

- ⑬ 石井 修平、渡邊 裕介、上本 泰生、井原 大、久光 隆、深山 俊治、中川 修 日本分子生物学会年会 「Hrt1/Hey1 遺伝子の血管内皮発現制御機構における Notch および ALK1 シグナリングによる協調的転写調節メカニズム」 2016 年 11 月 30 日 横浜市
- ⑭ 中川 修 日本血管生物医学学会春季特別シンポジウム 「Significance of downstream target genes of Notch and ALK1 signaling pathways during cardiovascular development and disease」 2016 年 6 月 3 日 吹田市
- ⑮ 荒木 睦、渡邊 裕介、坂部 正英、久光 隆、中尾 周、藤田 匡秀、片山 由美、井岡 朋子、中川 修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 「血管内皮細胞における BMP9/BMP10-ALK1 シグナル下流遺伝子群の解析」 2015 年 12 月 12 日 神戸市
- ⑯ 片山 由美、渡邊 裕介、水田 賢、坂部 正英、井岡 朋子、荒木 睦、石井 修平、染川 智、斎藤 能彦、中川 修 日本血管生物医学学会学術総会 「血管内皮細胞における BMP9/BMP10-ALK1 シグナル下流遺伝子群の解析」 2015 年 12 月 11 日 神戸市

〔図書〕(計 2 件)

- ① Mizuta K, Sakabe M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. TMEM100, a novel intracellular transmembrane protein essential for cardiovascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2016.
- ② Sakabe M, Morioka T, Kimura H, Nakagawa O. Roles of endothelial Hrt genes for vascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2016.

〔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（日本語）
http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/index.html
ホームページ（英語）
http://www.ncvc.go.jp/english/res/molecular_physiology/
Facebook
<https://www.facebook.com/ncvc.molecular.physiology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA Osamu)
国立循環器病研究センター・研究所・
部長
研究者番号：40283593

(2) 研究分担者

渡邊 裕介 (WATANABE Yusuke)
国立循環器病研究センター・研究所・
室長
研究者番号：20562333

西谷 友重 (NISHITANI Tomoe)
国立循環器病研究センター・研究所・
室長
研究者番号：50393244

久光 隆 (HISAMITSU Takashi)
国立循環器病研究センター・研究所・
室長
研究者番号：50327946

岩田 裕子 (IWATA Yuko)
国立循環器病研究センター・研究所・
室長
研究者番号：80171908

片山 由美 (KATAYAMA Yumi)
国立循環器病研究センター・研究所・
流動研究員

研究者番号：20570675

深山 俊治 (FUKAYAMA Toshiharu)
国立循環器病研究センター・研究所・
流動研究員
研究者番号：60779304

瀬谷 大貴 (SEYA Daiki)
国立循環器病研究センター・研究所・
流動研究員
研究者番号：30806021

田中 亨 (TANAKA Toru)
国立循環器病研究センター・研究所・
流動研究員
研究者番号：50806065

坂部 正英 (SAKABE Masahide)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00525983

山岸 敬幸 (YAMAGISHI Hiroyuki)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40255500

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し