

## 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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390238

研究課題名（和文）心血管形成に寄与する新たな細胞系譜の同定と領域特異的な細胞運命決定機構の解明

研究課題名（英文） Identification of novel cell lineages contributing to cardiovascular development and clarification of mechanisms underlying their fate determination

研究代表者

栗原 裕基（KURIHARA HIROKI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20221947

研究成果の概要（和文）：心発生初期において、エンドセリン-A 受容体発現細胞群が一次心臓領域の腹側に特異的な心臓起源領域を形成すること、原始心筒形成後にその左側壁を上行して左室と両心房の心筋に分化すること、エンドセリンシグナルが ERK リン酸化や Tbx5 遺伝子発現制御により心室筋形成に寄与することを明らかにした。血管形成に関しては、血管新生過程の細胞動態の可視化とコンピューター解析により樹状構造を形成する細胞の複雑な振る舞いや先端細胞の入れ替わり現象を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Early endothelin receptor type A expression defines a subdomain of the first heart field contributing to chamber formation, in which endothelin signaling is involved by stimulating ERK phosphorylation and Tbx5 expression. In angiogenesis, complex cell behavior and tip cell overtaking were revealed to contribute to branching morphogenesis by a time-lapse imaging and computer-assisted analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、心筋細胞、心臓発生、細胞分化、血管内皮細胞、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

心臓の起源は、これまで胚の頭側に生じる心臓半月と呼ばれる中胚葉由来の領域とされてきたが、2001年に鰓弓に由来する二次心臓予定領域が心流出路や右室、両心房の起源として同定されて以来、複数の領域に由来する細胞が集まって心臓原基を形成し、それらの相互作用を経て精緻な器官構造が形成さ

れていくことが次第に明らかにされてきた（Buckingham M et al., *Nat. Rev. Genet.* 6:826, 2005）。また、大血管も二次心臓予定領域を含む中胚葉と外胚葉に由来する心臓神経堤細胞など領域毎に異なる起源をもち、冠血管や一部の心筋は心流入路近くに形成される心外膜前駆組織に由来することが明らかにされ、その血管形成過程や機能的特徴も領域毎

に特異性をもつことが知られている (Majesky MW, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:1248, 2007)。このように、心臓大血管は、従来考えられていた以上に多様な細胞集団が会合し、全体として合目的な統合性をもった器官として形成されると考えられており、これらの過程で細胞間シグナルがどのように働き、多彩な細胞分化の遺伝子プログラムを作動させるのかが現在極めて注目されている。

こうした器官形成に関する知見が大きく発展してきた背景には、遺伝子改変マウスを中心とする発生工学研究の貢献が大きい。特に、領域毎の起源及びその派生細胞で特異的に発現する遺伝子マーカーが Cre-loxP システムの導入などにより次々に報告され、遺伝子欠損による心血管系の形成異常から、細胞諸系譜において重要な役割を果たす遺伝子群が数多く報告されてきた。しかし、個々の分子をつなぐシグナル機構や転写因子ネットワーク機構、さらには派生細胞に至る細胞系譜の全貌は多くが明らかになっていない。例えば、心臓の刺激伝導系の起源については未だに謎に包まれている (Anderson RH et al., *Anat. Rec.* 280:8, 2004)。ごく最近でも心筋分化に寄与する新たな領域・細胞系譜が報告されるなど (Moretti A et al., *Cell* 127:1151, 2006; Cai CL et al., *Nature* 454:104, 2008)、この分野の研究は今進展が著しい。

我々はこれまでマウス遺伝学的研究により、エンドセリン-1 (Edn1) / エンドセリン A 型受容体 (Ednra) シグナル経路が神経堤細胞による鰓弓・心大血管の形成に重要な因子であることを明らかにしてきた。さらに、Cre-変異 lox 系を用いたリコンビナーゼ依存性遺伝子交換 (RMCE) によって Ednra 遺伝子座に外来遺伝子を高い効率でノックインできる系を確立し (Sato T et al., *Development* 135:755, 2008)、これにより Edn1 がホメオボックス遺伝子 Dlx5/6 の誘導を介して上顎・下顎領域決定の分子スイッチとして機能することを証明した (Sato T et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:18805, 2008)。他の研究グループからはマウス・ゼブラフィッシュの遺伝学的解析により、MEF2C が Edn1 / Ednra → Dlx5/6 経路に関与している可能性が示された (Verzi MP et al., *Dev. Cell* 12:645, 2007)。

一方、この系により lacZ をノックインしたマウス胚では、その発現は頭部/心臓神経堤細胞に認められたが、それ以外に心臓原基の流入路腹側の領域に lacZ 陽性細胞が特徴的なパターンで分布することを見いだした。さらに、神経堤に由来する Ednra 陽性細胞の一部が大血管の平滑筋細胞へと分化することが示されるとともに、胎生期に新生血管内皮とともに神経管に侵入し、脳血管の壁細胞分化に寄与することを見いだした。これらの

細胞の系譜や領域特異性・細胞分化や器官形成に至る細胞間相互作用の機構を解明することにより、心血管系の形成メカニズムの理解、さらには再生治療の基盤づくりに貢献できると考え、本研究を着想するに至った。さらに本研究では、血管形成のメカニズムをより詳細に理解するため、タイムラプスイメージングとコンピューター解析による血管新生過程の細胞動態解析を試みた。以下に、(1) 心臓形成における Ednra 陽性細胞の動態と役割、(2) 新手法によって同定された血管新生過程における新たな細胞動態の2つを中心的な成果として報告する。

## 2. 研究の目的

心血管形成の理解とは、多様な細胞系譜間の相互作用がどのようにして機能的構造を形成するか、そのダイナミックな変容過程を統合的に解明することである。そのためには構成細胞の起源と分化系譜を明らかにすること、一定の形態・構造を創り出す細胞動態や細胞間相互作用を解析する新しい手法を確立することが重要である。本研究では、新しい細胞系譜として心臓発生初期に見出された Ednra 陽性細胞群に注目し、この細胞群が心臓の発生過程でどのように発生し、どのような動態を経てどのような細胞に分化するのか、他の細胞とのどのような相互作用が器官形成に重要かを明らかにする。さらに、器官形成過程における細胞の動態をより詳細に理解するため、血管新生をモデルとして細胞のライブイメージングを行い、これに基づくデータの数値化とコンピューター解析によって血管新生過程の細胞動態をモジュール化し、細胞動態に基づく器官形成理解のための新たな方法論的プラットフォームの確立を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウス

Ednra-lacZ, Ednra-EGFP マウスは、既報の通りリコンビナーゼ依存性カセット交換

(RMCE) を用いて作成した。即ち、Ednra 遺伝子第2エクソンに変異型 lox 配列 (lox71, lox2272) で挟んだ neomycin 耐性遺伝子を導入した ES 細胞に対し、上記変異型 lox に対応する配列 (lox66, lox2272) で挟んだ lacZ, EGFP 遺伝子断片それぞれを含むプラスミドを電気穿孔法で導入して Cre リコンビナーゼ遺伝子を含むアデノウィルスベクター

(AxCANCre) を感染させて lox 配列に相同組み換えを起こさせ、導入遺伝子を Ednra 遺伝子座にノックインした ES 細胞株を得た。これらよりキメラマウスを作成し、生殖細胞系列に寄与したキメラマウスよりノックインマウスを得た。

マウスは温度 23±2°C、湿度 50-60%、12 時

間毎の明暗サイクル下に飼育し、実験に供した。実験は東京大学動物実験規則に則り、東京大学医学系研究科動物実験委員会により承認された実験計画のもとで行われた。

#### (2) $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色

LacZ 遺伝子発現による  $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性は、全胚固定標本または凍結切片標本において、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl  $\beta$ -D-galactoside) を基質とした発色反応により検出した。

#### (3) 免疫染色

凍結切片標本において、一次抗体反応後にペルオキシダーゼ、FITC、ビオチンで標識した二次抗体を反応させ、蛍光または発色反応によって可視化した。

#### (4) in situ ハイブリダイゼーション

全胚固定標本または凍結切片標本において、digoxigenin で標識した RNA プロブを用いて通常の方法で行った。

#### (5) 蛍光色素ラベリング

マウス胎生 8.25 日胚の心流入路領域に対して、蛍光色素 PKH67 (緑) または PKH26 (赤) をマイクロインジェクションした。その後、DMEM/F2+50%ラット血清存在下で回転培養を 30 時間行い、蛍光実体顕微鏡 (Leica MZFLIII stereomicroscope+Hamamatsu digital camera C4742-95) で観察した。

#### (6) 組織移植・培養

マウス胎生 8.25 日胚の心流入路 EGFP 発現領域より組織片を切り出し、一部の試験では蛍光色素 SYTO16 で細胞をラベルした後、同じ発生段階のマウス胚の流入路領域に移植した。対照群として、心流出路、心筒領域、尾部の組織を移植片に用いた。移植を受けた胚は、 $\alpha$ -MEM+10%ウマ血清存在下で低酸素状態 (5% CO<sub>2</sub>、95% N<sub>2</sub>) で 24 時間培養し、(5) と同様に観察した。

心筋培養については、マウス胎生 8.25 日胚の心流入路 EGFP 発現領域より組織片を切り出し、トリプシン処理により細胞を単離した後、マウス胎仔心臓より調整した心臓線維芽細胞をフィーダーとして培養した。

#### (7) 細胞増殖の評価

増殖細胞は BrdU の取り込み (S 期)、リン酸化ヒストン H3 染色 (M 期) により評価した。

#### (8) ERK のリン酸化

抗リン酸化 ERK 抗体、抗 ERK 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、リン酸化 ERK/全 ERK 比を定量的に評価した。

#### (9) RT-PCR

遺伝子発現について、特異的プライマーを用いてコンベンショナル PCR、定量的リアルタイム PCR の両方の方法で評価した。

#### (10) 大動脈リングアッセイ

マウスより摘出し、周囲の脂肪・結合織を取り除いた大動脈の組織小片を I 型コラーゲンゲル上に静置し、medium-199+5%胎仔ウシ

血清+50 ng/ml ヒト型リコンビナント VEGF 存在下で培養した。

(11) マウス生体内での網膜血管新生解析  
蛍光ラベルした BS-1 レクチンを生後 1 日のマウス心腔内に注射し、網膜新生血管への取り込みを経時的に追跡した。

#### (12) タイムラプスイメージング

大動脈リングアッセイ開始 5-6 日後、蛍光色素 SYTO-16 または SYTO-61 (0.1  $\mu$ g/ml, Molecular Probes) で内皮細胞をラベルし (内皮細胞が選択的ラベルされることは、細胞カーカーとの二重染色、FACS 解析により証明)、タイムラプス画像を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (オリンパス FluoView FV10i) により 15 分毎に 36 時間にわたって記録した。得られた画像を、FLUOVIEV ソフトウェアを用いてデジタル化し、解析に供した。

細胞のモザイク解析では、培養開始前に EGFP 発現アデノウィルスで大動脈リング標本に感染させた。ウィルス力価は、一部の内皮細胞が感染するように条件を設定した。

#### (13) コンピューター解析

ImageJ、MTrackJ、MATLAB の解析ソフトを用いて、以下の解析を行った。ラベルされた各細胞をマニュアルでプロットし、その時系列データをピクセル座標として蓄積した。各分枝の伸長方向を軸として、各プロットの位置と速度を変換した。そのデータから、細胞の速度、方向性の相関、連続性、先端細胞の伸長動態などをモジュール化し、それぞれを表現するパラメータを独立性の検証を経て数値化し、数理統計手法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 心臓形成における Ednra 陽性細胞の動態と役割

① Ednra-lacZ/EGFP マウスを用いた Ednra 陽性細胞群の動態解析

ETAR-lacZ マウスと ETAR-EGFP マウスを用いて、心臓形成過程における Ednra 発現細胞群の動態を解析した。Ednra 陽性細胞群はマウス胎生 8.0 日胚 (E8.0) の心臓原基腹側において最初に認められ、原始心筒形成期には心臓流入路の腹側に局在していた。その発現は、in situ ハイブリダイゼーションによる Ednra 遺伝子の発現パターンとほぼ一致しており、内在性 Ednra の発現を反映すると考えられた。この初期の発現は、一次心臓予定領域マーカーである Nkx2.5 や Mlc2a の発現領域の一部と一致していたが、二次心臓予定領域マーカーである Is11 とは重ならず、Ednra 発現細胞は一次心臓予定領域に含まれる細胞集団であると考えられた。その後 E8.5 の心ループ形成期には、Ednra-lacZ の発現は心流入路から腹側にかけて左心室および右心房方向へ分布が広がる様子が観察された。この分布拡大から、Ednra-lacZ 陽性細胞群は

E8.25 の心流入路腹側から左側壁（大彎側）を経て左心室・右心房へ移動する可能性が考えられ、以下の実験により検証した。まず、E8.25 の *Ednra* 陽性心流入路領域に蛍光色素をマイクロインジェクションし、胎外培養を行った結果、標識された細胞群が左心室及び右心房に向かって移動する様子が観察された。さらに、E8.25 *Ednra*-EGFP 陽性領域を野生型胚心流入路に移植した結果、移植先の左心室で EGFP シグナルが認められた。これらの移動は、心筒中央部（心室）領域、心流出路領域の移植では観察されなかった。これらの結果より、*Ednra* 陽性細胞は一次心臓領域の亜集団であり、心ループ形成期に心流入路から大彎を経て左心室や心房に移動し、作業心筋の形成に寄与することが示された。

#### ②心臓発生初期におけるエンドセリンシグナルの機能解析

心臓形成初期における *Edn1/Ednra* シグナルの役割を明らかにするため、*Ednra* ノックアウト胚における発生期の心臓を解析した。その結果、E9.5 *Ednra* 欠損胚の一部において、心室の低形成が認められた。そこで、BrdU の取り込み、ヒストン H3 のリン酸化を指標に細胞増殖の評価を行ったところ、*Ednra*-lacZ 陽性細胞群が主に寄与する左心室の心筋において、*Ednra* 欠損胚で増殖活性の顕著な低下が認められた。この増殖活性の低下が ERK のリン酸化を介しているか検証するため、*Ednra* 欠損（ホモ接合体）胚・ヘテロ接合体胚・野生型胚から心臓を摘出し Western blotting を行った結果、*Ednra* アリルの数に応じたリン酸化 ERK の低下が見られた。さらに、左心室マーカーの発現を E9.5 *Ednra* 欠損（ホモ接合体）胚・ヘテロ接合体胚で比較した結果、*Ednra* 欠損胚では *Tbx5* とその下流遺伝子 *Cx40* の発現低下が見られた。また、*Ednra* 欠損胚左心室では *Tbx2* の異所的発現も観察されたことから、エンドセリンシグナルが *T-box* 遺伝子群の発現調節機構に関与している可能性が考えられた。*Tbx5* は心臓と上肢に複合奇形を示す先天性疾患 Holt-Oram 症候群の原因遺伝子であり、心臓形成において重要な転写因子である。これらの結果から、ETAR シグナルは ERK のリン酸化を介して、心筋細胞増殖や *Tbx5* による心室形成に寄与していることが示唆された。

#### (2) タイムラプスイメージングによる血管新生過程の細胞動態の解明

マウス大動脈組織片培養による血管新生モデルにより、細胞のライブイメージングとコンピューター解析を行った。マウス大動脈片を I 型コラーゲンゲル上で組織培養することにより、CD31 陽性の血管内皮細胞による樹枝状構造の伸長が認められた。この過程を血管新生モデルとして血管内皮細胞を選択的に SYTO 蛍光色素でラベルし、タイムラプス

イメージングを行うことにより、従来予想されていた以上に細胞が複雑な動態を示すことが明らかになった。特に、内皮細胞は全体としての樹枝状構造を保持しながら常に異なる速度で遊走し、相互の相対的位置関係を常に変えていく「混ざり合い」現象を呈した。また、これまで特定の形質をもつ細胞と考えられていた先端細胞（tip cell）は恒常的なものではなく、細胞の追い越し現象によって常に入れ替わっていくことが明らかになった。こうした「混ざり合い」「先端細胞の入れ替わり」は、マウス生体内での網膜血管新生過程で起きていることも、レクチンを用いた内皮細胞ラベリングで明らかになった。

さらに、新たに示された細胞動態の生理的意義や分子機序を明らかにするため、得られたタイムラプス画像から細胞一つ一つの位置情報を時間軸に沿って抽出し、それを基に細胞動態を特徴づけるパラメータを設定し定量評価した。血管新生は、血管の伸長や分岐といった質的に異なる要素（モジュール）が時空間的に組み合わせることにより血管全体の形態的構造が構築されていると考えることができる。そこで、モジュールの一つである血管伸長の検討を行った。最も代表的な血管新生促進因子である VEGF の作用点に関して検討した結果、VEGF は血管内皮細胞の平均速度の増加や方向性運動の質的向上、さらに先端細胞の遊走距離増加を介して、血管伸長に対して促進的に作用することが示唆された。さらに薬理学的実験から、VEGF によって誘導される血管伸長反応の一部は、Delta-like 4-Notch シグナルを介した内皮細胞間相互作用により負に制御され、また内皮細胞-壁細胞間の相互作用により正に制御されることが示され、早期血管新生における内皮細胞-壁細胞間相互作用の役割が示唆された。これらの知見は、血管新生における樹状構造形成の細胞生物学的基盤に新しい理解を与えるとともに、細胞動態に基づく器官形成理解のための新たな方法論的プラットフォームとして多方面への応用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 17 件、すべて査読あり）

1. Kushiyama A, Okubo H, Sakoda H, Kikuchi T, Fujishiro M, Sato H, Kushiyama S, Iwashita M, Nishimura F, Fukushima T, Nakatsu Y, Kamata H, Kawazu S, Higashi Y, Kurihara H, Asano T.

(2012) . Xanthine Oxidoreductase Is Involved in Macrophage Foam Cell Formation and atherosclerosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 291-298.

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.234559

2. Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y,

- Kurihara Y, Kurihara H. (2011). Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development*. 138, 4763-4776. DOI: 10.1242/dev.068023
3. Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. (2011). Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney. *Gene Expr. Patterns*. 11, 371-377. DOI: 10.1016/j.gep.2011.04.001
4. Tonami K, Kurihara Y, Arima S, Nishiyama K, Uchijima Y, Asano T, Sorimachi H, Kurihara H. (2011). Calpain 6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *J. Cell Sci*. 124, 1214-1223. DOI: 10.1242/dev.068023
5. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. (2010). Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *J. Clin. Invest*. 120, 2817-2828. DOI: 10.1172/JCI42020.
6. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. (2010). Endothelin receptor type-A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field, with a later implication of this signaling pathway in chamber myocardium formation. *Development*. 137, 3823-3833. DOI: 10.1242/dev.054015
7. Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, Nishiyama K, Kurihara Y, Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, Kurihara H. (2010). Establishment of mice expressing EGFP in the placode-derived inner ear sensory cell lineage and FACS-array analysis focused on the regional specificity of the otocyst. *J. Comp. Neurol.* 18, 4702-4722. DOI: 10.1002/cne.22468
8. Heude E, Bouhali K, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107, 11441-11446. DOI: 10.1073/pnas.1001582107
9. Vieux-Rochas M, Mantero S, Heude E, Barbieri O, Astigiano S, Couly G, Kurihara H, Levi G, Merlo GR. (2010). Spatio-temporal dynamics of gene expression of the Edh1-Dlx5/6 pathway during development of the lower jaw. *Genesis*. 48, 262-273. DOI: 10.1002/dvg.20625
10. Gitton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Levi G. (2010) Evolving maps in craniofacial development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 21, 301-308. DOI: 10.1016/j.semcdb.2010.01.008
11. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi SI, Kurihara H, Uchida T, Asano T. (2010) Pin1 associates with and induces translocation of CRT2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J. Biol. Chem*. 285, 33018-33027. DOI: 10.1074/jbc.M110.137836
12. Cui X, Kushiyama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, Shiomi M, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T. (2010) Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 57-63. DOI: 10.1016/j.diabres.2009.10.011,
13. Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S, Kato M. (2010). Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood*. 115, 4138-4147. DOI: 10.1182/blood-2009-05-223057
14. Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M. (2010). Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H431-439. DOI: 10.1152/ajpheart.00466.2010
15. Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H. (2009). Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 180, 326-338. DOI: 10.1164/rccm.200812-18270C
16. Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson R O, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki E M, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* 16, 398-410.

DOI:10.1016/j.devcel.2009.02.003

17. Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. (2009). A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE*. 4:e4943. DOI: 10.1371/journal.pone.0004943

[学会発表] (計 68 件、国際学会のみ抜粋)

1. Yukiko Kurihara “Involvement of non-coding RNA: Evf2 in the Endothelin signaling in branchial arch development” Keystone Symposia Conference Non-Coding RNAs 2012年4月2日 Snowbird Cliff lodge (USA)
2. Taro Kitazawa “Hox gene function and possible crosstalk with Dlx genes in craniofacial morphogenesis” Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2012年3月19日・20日 Four Points by Sheraton Los Angeles (USA)
3. Yumiko Kawamura “Protective role of Sirt3 against p53-dependent developmental arrest induced by oxidative stress in preimplantation embryos” Keystone Symposia “Sirtuins in metabolism, aging and disease” 2012年2月13日 Granlibakken Resort, Tahoe City, California (USA)
4. Koichi Nishiyama “Collective endothelial cell movement in angiogenic morphogenesis” American Heart Association Scientific Session 2011年11月15日 Orlando Convention Center (USA)
5. Yuichiro Arima “Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A receptor knockout mice” American Heart Association Scientific Session 2011年11月15日 Orlando Convention Center (USA)
6. Rieko Asai “The first heart field subdomain defined by endothelin receptor type-A expression contributes to conduction system development” ESC Working Group on Developmental Anatomy and Pathology 2011年9月24日 Liblice Casstle (Czech)
7. Rieko Asai “Endothelin receptor type-A expression defines a distinct subdomain within the heart field and contributes to chamber myocardium ” Weinstein Cardiovascular Development Conference 2011年5月6日 Hilton Cincinnati (USA)
8. Ki-Sung Kim “Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway” 2011 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research joint meeting 2011年5月1日 Denver Convention Center (USA)
9. Rieko Asai “Endothelin type-A receptor

expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium ” Weinstein 2010 cardiovascular development conference 2010年5月21日 Royal Tropical Institute, AMSTERDAM (Netherlands)

10. Yukiko Kurihara “ Non-coding RNA regulation of endothelin signaling in branchial arch development” Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月13日 Il Ciocco Hotel & Resort, Lucca (Italy)

11. Kou Fujisawa “Subtype-specific domain functions of endothelin receptors in craniofacial development.” Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月12日 Il Ciocco Hotel & Resort, Lucca (Italy)

12. Koichi Nishiyama “ Id1 regulates angiogenesis by determining the specification and the timing of Notch signaling” American Heart Association, scientific session 2009年11月8-12日 Orange County Convention Center, Orlando (USA)

13. Rieko Asai “Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium ” Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 2009年5月7-9日 Hyatt Embarcadero Hotel, San Francisco (USA)

[その他]

ホームページ <http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

・栗原 裕基 (KURIHARA HIROKI)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20221947

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

- ・栗原 由紀子 (KURIHARA YUKIKO)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80345040
- ・西山 功一 (NISHIYAMA KOICHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80398221
- ・内島 泰信 (UCHIJIMA YASUNOBU)  
東京大学・大学院医学系研究科・助手  
研究者番号：90272426
- ・富田 幸子 (TOMITA SACHIKO)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40231451