

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05305

研究課題名(和文) 心臓中隔欠損に伴う肺高血圧発症機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Versican Is Crucial for the Initiation of Cardiovascular Lumen Development

研究代表者

牧野 伸司 (Makino, Shinji)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・准教授

研究者番号：20306707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々のグループは化学変異剤を用いて、心臓や血管の空間形成に異常をきたす変異体を樹立し、原因となる細胞外マトリックスを発見した。確立された変異体はIhtと命名した。この変異体は、世界で最初のヴァーシカンに点変異を持った動物モデル個体である。どのような未知の生命現象も可視化をすることにより、その理解に格段の進歩をあたえる。心臓や血管が外部から生きたままで可視化できるメダカ変異体と、蛍光蛋白を用いたトランスジェニック魚を組み合わせ、体外から心臓血管形成の評価が定量的に再現性をもって可能とした。この新たに構築したシステムにより、心臓・血管腔の形成にはヴァーシカンが必須であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋・血管系を構成する遺伝子では95%以上のDNA配列がメダカとヒトとの間で保存されていることより、メダカを用いて得られた心室・血管形成の知見は、ヒトでも共通することが予想された。心血管系の複雑な三次元構造は、異なる前駆細胞の移動によって達成されることが確認され、これらの異常により先天性の心血管障害が発症することが証明された。メダカ変異体を用いて可視化した観察によって、中隔欠損症と肺高血圧症が合併する機序を前駆細胞の移動の点から解明した。この機序は、動脈硬化やがんの転移時の血管形成に対する創薬のターゲットにもなる可能性が高く、新しい概念からの有効な薬の開発への成果も今後期待できる。

研究成果の概要(英文)：Versican is an evolutionary conserved extracellular matrix proteoglycan. We performed ENU mutagenesis screening to identify medaka mutants with defects in embryonic cardiovascular development. In this study, we described a recessive point mutation in the versican resulting in reduced versican protein expression. The homozygous mutant showed termination of cardiac development at the linear heart tube stage and exhibited absence of cardiac looping, a constricted outflow tract, and no cardiac jelly. Additionally, progenitor cells did not migrate from the secondary source towards the arterial pole of the linear heart tube, resulting in a constricted outflow tract. Furthermore, mutants lacked blood flow and vascular lumen despite continuous peristaltic heartbeats. These results enhance our understanding of the mechanistic basis of versican, and this mutant represents a novel genetic model to investigate the mechanisms of vascular tubulogenesis.

研究分野：循環器内科

キーワード：心臓・血管腔形成 先天性心疾患

1. 研究開始当初の背景

小児期の外科治療技術の発達と内科管理の進歩により、先天性心疾患患者の9割以上が成人期に達するようになった。日本の成人先天性心疾患数は40万人おり、毎年約一人ずつ患者が増えている。

一方で成人先天性心疾患患者に対する診療体制の構築は遅れている。その理由の一つに、先天性心疾患では解剖学的重症度や心内修復の状態、全身合併症の程度が患者ごとに異なり、病因や治療体系が明確ではないことがあげられる。成人先天性心疾患治療は基礎研究と臨床の総合力が要求される循環器疾患の新たな挑戦分野となってきた。

先天性心血管疾患の成因が判明した先天性心疾患患者は、全体の15%以下で、残りの85%は成因不明である。ほとんどは胎内における環境要因により疾患遺伝子関与と前駆細胞の移動異常の程度が左右され、表現型の多様性と深くかかわっていることが予想される。

メダカ等の小型魚類では拡散により初期胚の栄養供給を行うため、胎生致死となる心臓変異体も哺乳類に比べると長い期間生存可能である。卵が透明であるために生体外から心臓形態の観察が可能である。我々は心臓に表現型をもつメダカ突然変異体を用いて、心臓発生の新たな概念を細胞移動に注目することにより解明したいと考え、化学変異剤のENUを用いた心臓前駆細胞の移動に異常を呈するメダカのスクリーニングに世界に先駆けて成功した。この変異体は、閉鎖循環器系が形成されず心臓が一本の管の状態が発生が停止する。受精後約7日目に循環不全のため致死となり、心筋の前駆細胞が移動できないことによる奇形であることを発見した。このような表現型を呈する突然変異体は、ゼブラフィッシュでもこれまでに報告がなく、この突然変異体の原因遺伝子を解明、遺伝子の機能解析を行うことで、「心筋前駆細胞の移動」というこれまで着目されたことのない現象を紐解くことができると考えた。

2. 研究の目的

心血管系の複雑な三次元構造と特異的な細胞機能は、異なる前駆細胞の分化・増殖・移動によって達成される。近年の分子生物学、細胞生物学の進歩により心臓は少なくとも4種類の前駆細胞(一次心臓領域・二次心臓領域・心臓神経堤・心外膜前駆組織)から分化する細胞群によって構成される。正常な胎内の循環器系形成のためには、(1)前駆細胞に適切な濃度と種類の(2)増殖因子を供給して、複数の前駆細胞群が適切に移動するための微小環境(3)細胞外マトリックスが必要である。先天性心疾患は出生100人に1人の割合でみられる最も頻度の高い疾患で、(1)(2)(3)のどの要素に異常が生じても発症する。我々は化学変異剤(ENU)を用いたメダカ変異体スクリーニングより、心臓前駆細胞の移動に異常をきたす変異体を樹立し、原因となる(3)の細胞外マトリックスを発見した。メダカ変異体を用いて可視化した4次元の観察を用いて、多様な先天性心疾患の病因を細胞移動の観点から理解して、新たな治療概念を模索することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

これまで同定された先天性心疾患の遺伝子変異の多くは転写因子や増殖因子の機能異常によるものであった。本研究では心臓形成において多様な細胞群がどのように移動して統合された循環器系を形成するのか細胞移動を可視化する。具体的には、各前駆細胞の蛍光蛋白トランスジェニック魚とメダカ変異体を掛け合わせて4次元的心臓前駆細胞の移動の異常を可視化する。さらに愛知医科大学の渡辺教授との共同研究でversicanコンディショナルノックアウトマウスの解析を行う。予備実験で心室中隔欠損症、動脈管開存症、大血管転位症、ファロー四徴症様の形態が得られることがエコーで確認されている。メダカ変異体を用いた可視化システムとノックアウトマウスを組み合わせ、成人先天性心疾患のモデルマウス確立を行う。心臓前駆細胞移動の機構を明らかにすることによって、同じ先天性心疾患でも多様性が生じる機構を明らかにする。

4. 研究成果

我々のグループは化学変異剤を用いて、心臓や血管の空間形成に異常をきたす変異体を樹立し、原因となる細胞外マトリックスを発見した。確立された変異体は*lht*変異体と命名した。この変異体は、世界で最初のヴァーシカンに点変異を持った動物モデル個体である。どのような未知の生命現象も可視化をすることにより、その理解に格段の進歩をあたえる。心臓や血管が外部から生きたままで可視化できるメダカ変異体と、蛍光蛋白を用いたトランスジェニック魚を組み合わせ、体外から心臓血管形成の評価が定量的に再現性をもって可能とした。この新たに構築したシステムにより、心臓・血管腔の形成にはヴァーシカンが必須であることを解明して、英文雑誌に報告した。(Scientific Reports 2019)

心筋・血管系を構成する遺伝子では95%以上のDNA配列がメダカとヒトとの間で保存されていることより、メダカを用いて得られた心室・血管形成の知見は、ヒトでも共通することが予想された。心血管系の複雑な三次元構造は、異なる前駆細胞の移動によって達成されることが確認され、これらの異常により先天性の心血管障害が発症することが証明された。メダカ変異体を用いて可視化した観察によって、中隔欠損症と肺高血圧症が合併する機序を前駆細胞の移動の点から解明した。この機序は、動脈硬化やがんの転移時の血管形成に対する創薬のターゲットにも

なる可能性が高く、新しい概念からの有効な薬の開発への成果も今後期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kimura M, Kohno T, MAKINO S, Okuda S, Nawata K, Yanagisawa R, Kojima H, Nishiyama T, Aizawa Y, Yuasa S, Murata M, Maekawa Y, Okamoto K, Shimizu H, Fukuda K	4. 巻 pii: S0147-9563(18)
2. 論文標題 A Tale of Two Sisters with Hypertrophic Cardiomyopathy and Recurrent Embolism: When is the Optimal Timing of the Intervention for Left Atrial Appendage?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Lung.	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrtlng.2018.08.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oda M, Wakabayashi S, Ari Wijetunga N, Yuasa S, Enomoto H, Kaneda R, Yoon SH, Mittal N, Jing Q, Suzuki M, Grealley JM, Fukuda K, MAKINO S.	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Selective modulation of local linkages between active transcription and oxidative demethylation activity shapes cardiomyocyte-specific gene-body epigenetic status in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics.	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-018-4752-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishihama Natsumi, Koishi Ryuta, MAKINO Shinji	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Fat Storage-Inducing Transmembrane Proteins 1 and 2 as Putative Therapeutic Targets for Heart Failure by Integrated Analysis of Proteome and Transcriptome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics & Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 173-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/jpb.1000484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishihama Natsumi, Nagayama Takahiro, MAKINO Shinji, Koishi Ryuta	4. 巻 5
2. 論文標題 Mice lacking fat storage-inducing transmembrane protein 2 show improved profiles upon pressure overload-induced heart failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e01292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 清奈帆美、和井内由充子、牧野伸司、河邊博史	4. 巻 55(1)
2. 論文標題 13年間における当大学での自動体外式除細動器の使用経験	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CAMPUS HEALTH	6. 最初と最後の頁 195-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 牧野伸司、和井内由充子	4. 巻 35
2. 論文標題 心臓震盪 (しんぞうしんとう) とは	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 慶應保健研究	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 和井内由充子、牧野伸司	4. 巻 35
2. 論文標題 大学生における先天性心疾患の管理状況	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 慶應保健研究	6. 最初と最後の頁 29-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, MAKINO S, Nakamura T, WATANABE H.	4. 巻 138
2. 論文標題 Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Cancer.	6. 最初と最後の頁 630-641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.29804.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 牧野伸司、和井内由充子、武田彩乃、畔上達彦、広瀬寛、西村知泰、横山裕一、河邊博史、森正明
2. 発表標題 大学生における先天性心疾患の管理状況
3. 学会等名 日本内科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji MAKINO, Nishant Mittal
2. 発表標題 Versican is crucial for the initiation of cardiovascular lumen development in Medaka fish
3. 学会等名 Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Wainai, Shinji MAKINO
2. 発表標題 Usefulness of School Cardiac Checkup in University Students
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji MAKINO
2. 発表標題 Dilated Cardiomyopathy (DCM)-linked Heat shock protein 60 (HSP60) mutations cause upregulation of ROS and autophagy through mitochondrial dysfunction.
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田彩乃、神田武志、広瀬寛、西村知泰、牧野伸司、森正明
2. 発表標題 若年女子の軽度腎機能低下と出生時体重の関連
3. 学会等名 日本内科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinji MAKINO
2. 発表標題 DCM-linked HSP60 mutations cause upregulation of ROS and autophagy through mitochondrial dysfunction.
3. 学会等名 Weinstein cardiovascular development meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 牧野伸司	4. 発行年 2018年
2. 出版社 慶應義塾大学出版会株式会社	5. 総ページ数 228
3. 書名 保健衛生 (遺伝と疾病)	

1. 著者名 牧野伸司	4. 発行年 2018年
2. 出版社 慶應義塾大学保健管理センター編	5. 総ページ数 6ページ
3. 書名 保健衛生 (遺伝と疾病)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤田 深里 (FUJITA Misato) (60633550)	神奈川大学・理学部・助教 (32702)	
研究 分担者	渡辺 秀人 (WATANABE Hideto) (90240514)	愛知医科大学・付置研究所・教授 (33920)	