

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591203

研究課題名（和文）冠動脈開口部の発生機序および心臓外に由来する細胞の役割解明

研究課題名（英文）Developmental analysis of the proximal portion and orifices of the coronary arteries and the role of extracardiac cells in their morphogenesis

研究代表者

中川 雅生（NAKAGAWA MASAO）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40188909

研究成果の概要：冠動脈の大動脈近位部発生、特に大動脈への開口の過程と関与する細胞や接着分子について検討した。動脈幹分割や大血管の弁形成に関与する神経堤細胞や右心室流出路形成に関与する二次的心臓前駆細胞はこの過程に直接関与せず、心外膜前駆細胞から分化し大動脈周囲に形成される冠動脈原基と大動脈内皮との間の直接的なシグナル交換により冠動脈口が形成されることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発生・分化、細胞・組織、動物、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

冠循環は高度な分化を遂げた脊椎動物に認められる循環システムである。しかし、冠動脈が大動脈に開口する機序については不明な点が多い。冠動脈の発生について、その原基は心外膜前駆組織であることが明らかにされつつあるが、大動脈近位部の形成、特に大動脈への開口にあたっては、動脈幹の分割や動脈の弁形成に関与する神経堤細胞、右心室の流出路形成に関与する二次的心臓前駆細胞等の心臓外に起源を有する細胞の関与も示唆されているが定説はない。また、大動脈内皮が外に向かって突出するのか、大動脈周囲の組織が大動脈内に入り込むのかも明らかにされていない。

2. 研究の目的

冠動脈近位部の発生過程を明らかにするため、心臓外に起源を有し、かつ心臓（特に動脈幹や冠動脈）の発生に深く関与することが明らかな細胞に注目し研究を行うこととした。具体的には、冠動脈原基となる心外膜前駆組織（proepicardial organ:PEO）由来の細胞、それに心臓神経堤細胞（cardiac neural crest cell:cNCC）と二次的心臓前駆細胞（second heart field:SHF）について、心臓発生過程におけるこれらの細胞の相互作用、動脈幹の分割と冠動脈発生への関与と両者の解剖学的な関係を明らかにする。また、テネイシンや PECAM、HNK-1 等の接着分子の役割についても検討する。

3. 研究の方法

PEO 由来の細胞から冠動脈が発生する過程で cNCC や SHF 細胞が与える影響について in vitro と in vivo で検討した。特に冠動脈近位部における cNCC や SHF 等の心臓外組織由来細胞の分布について組織学的に検討した。また、PEO とその他の細胞の相互作用を検討するため、ニワトリ及びマウス胚から抽出した PEO 細胞の培養系を確立し、他の細胞との共培養を実施した。

(1) マウス胚での細胞接着分子の分布

胎生 12-14 日のマウス胚を用い、テネイシン C や PECAM 等の細胞接着分子の冠動脈開口部付近の分布の変化について組織化学的に検索し、cNCC、PEO、SHF 細胞との関連性について検討した。

(2) PEO 細胞と cNCC の共培養

HH16-17のニワトリ胚と胎生8.5日のマウス胚からPEO細胞を抽出し、血清添加コラーゲンゲル上で37℃にて2週間培養した。

HH10-11のニワトリ胚からcNCCを含む神経管の部分を抽出しコラーゲンゲル上にて培養した。この培地上にHH16-17のニワトリ胚から抽出したPEOを加えて培養を試みた。同様に胎生8.5日のマウス胚からcNCCを含む神経管の一部を抽出し、コラーゲンゲル上にて培養しPEOを加えて培養を試みた。また、この継続として両方の培養面を密着させ、共培養の代用とすることを試みた。

(3) PEO 細胞と SHF 細胞の共培養

HH14のニワトリ胚からSHFを含む咽頭弓部分を抽出し、コラーゲンゲル上にて培養した。この培地上にHH16-17のニワトリ胚から抽出したPEOを加えて培養し、形態変化を実態顕微鏡下に観察した。

(4) 心臓周囲の神経由来組織の分布

平成 19 年度と 20 年度の途中までの結果を踏まえ、cNCC を含む神経系組織と心臓発生との関係を再検討する目的で、神経系組織のマーカーである HNK-1 を用いて冠動脈形成前から形成期にあたる胎生 12.5 日から 16.5 日のラット胚における発現を検索した。

4. 研究成果

(1) マウス胚での細胞接着分子の分布について

①大動脈周囲での冠動脈の形成

胎生 13 日のマウス胚では大動脈周囲にテネイシン C 陽性の組織がメッシュ状に形成され (図 1 A, D)、それが胎生 14 日になると密に集合し大動脈に接近するのが観察された (図 1 B, E)。さらに胎生 14 日の後半になると冠動脈は大動脈に開口し、大動脈と冠動脈内皮にのみテネイシン C は陽性であった (図 1 C, F)。

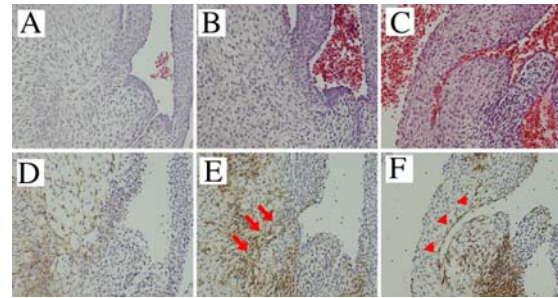


図 1. 胎生 13 日から 14 日のマウス胚におけるテネイシン C の発現 (A, B, C は HE 染色、D, E, F はテネイシン C 抗体を用いた免疫染色で、矢印は開口前の矢印頭は開口後の冠動脈を示す)

胎生 14 日のマウス胚の心臓をテネイシン C と血管内皮のマーカーである PECAM との二重染色したものを図 2 に示す。テネイシン C は大動脈と冠動脈の内皮だけでなく、さらに周囲の組織にも強く発現していることが明らかとなった。

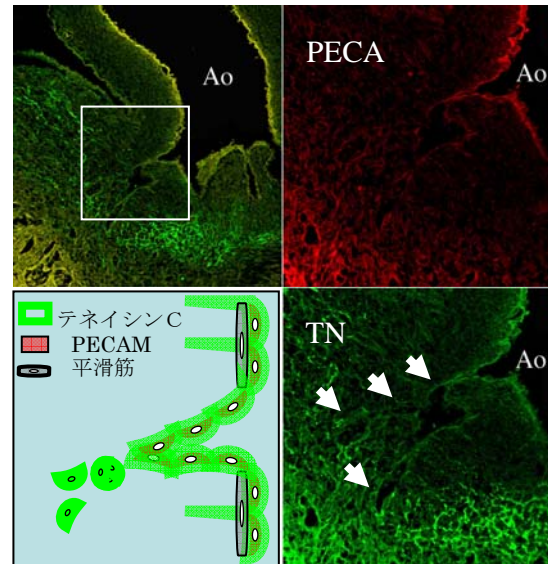


図 2. 胎生 14 日のマウス胚の心臓におけるテネイシン C と PECAM の発現

②冠動脈開口部の形成と内皮マーカーの発現

冠動脈開口の過程を明らかにするため初期の血管内皮マーカーであるレクチンと PECAM 発現を冠動脈の開口前後で検討した。胎生 13 日のマウス胚 (開口前) では大動脈周囲の冠動脈原基の内皮と大動脈の内皮にレクチンが強く発現していたが、大動脈周囲の組織における PECAM の発現は明らかでなかった。胎生 14 日の開口時も開口前と同様の所見であった (図 3、4)。しかし、胎生 14 日の冠動脈開口後には PECAM が冠動脈内皮に発現するのが観察された。さらに周囲の冠動脈原基の内皮においてはレクチンのみが発

現しており、PECAM の発現は見られなかった (図 5)。

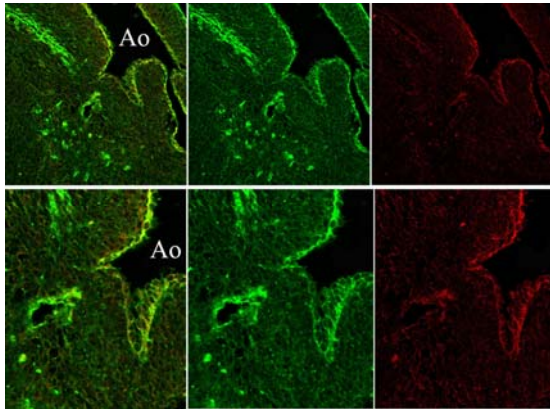


図 3. 冠動脈が大動脈に開口する前 (胎生 13 日) のマウス胚心臓におけるレクチン (緑) と PECAM (赤) の発現

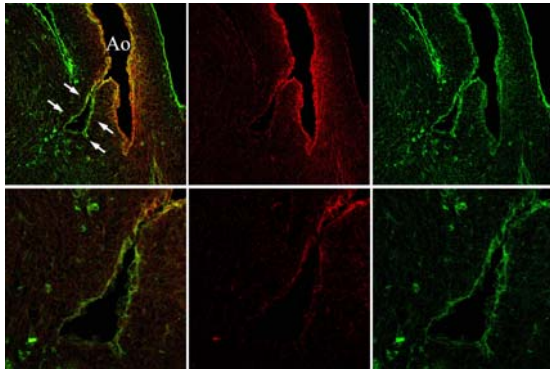


図 4. 冠動脈が大動脈に開口する時期 (胎生 14 日早期) のマウス胚心臓におけるレクチン (緑) と PECAM (赤) の発現

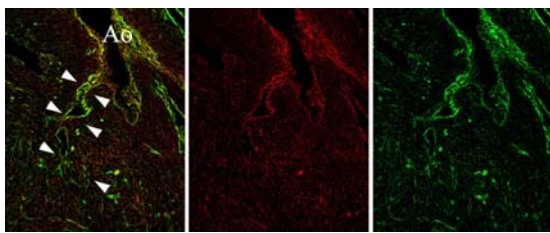


図 5. 冠動脈が大動脈に開口した後 (胎生 14 日後期) のマウス胚心臓におけるレクチン (緑) と PECAM (赤) の発現

以上より、大動脈周囲の冠動脈原基と冠動脈口となる部位の大動脈内皮はレクチン陽性の極めて primitive な内皮であり、開口した後、冠動脈が成長するにつれ大動脈内皮側から PECAM 陽性の成熟した内皮が冠動脈の抹消側に向かって順次伸張していく事が示された。

(2) PEO 細胞と cNCC の共培養

HH16-17 のニワトリ胚と胎生 8.5 日のマウス胚から抽出した PEO 細胞は血清添加カラー

ゲンゲル上で 37°C、2 週間の培養で成長し、血管内皮のマーカーの発現も見られ血管組織に分化することが明らかとなった (図 6)。

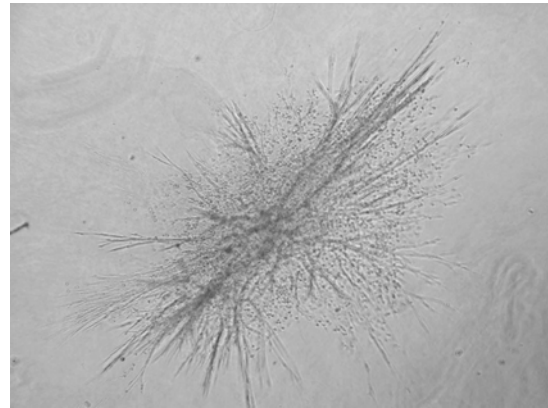


図 6. 2 週間培養した PEO 細胞

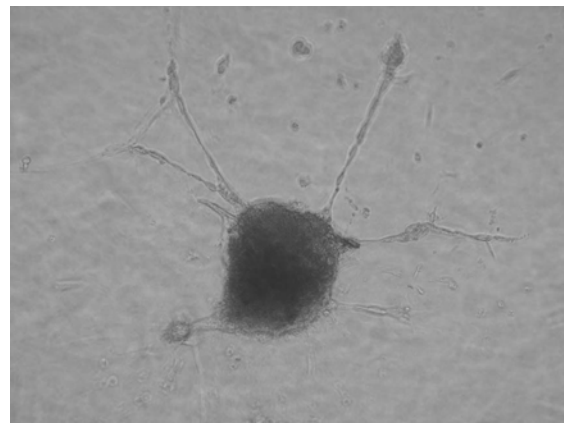


図 7. cNCC と共培養した PEO 細胞

しかし、cNCC との共培養や培養面を接着させる方法では PEO 細胞の形態変化や分化は見られなかった (図 7)。この結果から、PEO が冠動脈に分化するうえで cNCC が重要な因子である可能性は少ないと考えられた。

実験の限界として、発生ステージの異なる時期の細胞を共培養したり、哺乳類で発生環境の異なる組織の細胞を共培養する方法論に問題がありそうで、方法を再考する必要があると考えられた。

(3) PEO 細胞と SHF 細胞の共培養

(2)の結果と同様、PEO 細胞と SHF を含む咽頭弓部分の共培養や培養面を接着させる方法では PEO 細胞の形態変化や分化は見られなかった。この結果から、PEO が冠動脈に分化するうえで SHF の細胞が重要な因子である可能性は少ないと考えられた。

実験の限界として、(2)に加え、咽頭弓部は種々の細胞群で構成されていることが問題となっている可能性がある。SHF の細胞を単離する方法を用いる必要がある。

また、上記の結果から、当初予定していた Suzuki HR らの方法に準じて HH10-HH11 のニ

ワトリ胚の cNCC を含む神経管の部分（耳胞一第3体節）と、Wardらの方法に準じてHH14のニワトリ胚のSHFを含む咽頭弓の部分にカルボシアニン色素であるDiIを微量注入し、冠動脈周囲の分布を追跡する実験は実施せず、研究の方法の(4)を行うことにした。この結果を以下に示す。

(4) 心臓周囲の神経由来組織の分布について

胎生12.5日のラット胚において、HNK-1陽性細胞は背側間葉組織に発現し、胎生13.5日には心房中隔にも発現した。このステージは一次中隔の発達と肺静脈が背側に進展するのとは一致していた。

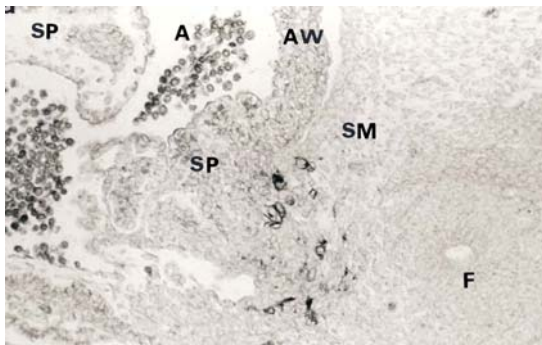


図8. 胎生12.5日ラット胚におけるHNK-1の発現

胎生14.5日にはHNK-1陽性細胞は心房中隔全域から静脈弁、上下大静脈、洞房接合部に及ぶ広い分布を示し、反回神経や迷走神経叢と直接連続していた(図9)。これらの細胞群は自律神経組織や一部刺激伝導系に分化する可能性が示された。

また、胎生16.5日には右心房に沿うHNK-1陽性組織から連続して大動脈周囲にも強いHNK-1陽性の細胞群が確認された(図10)が、この時期は冠動脈が大動脈に開口する時期とは一致せず、冠動脈の開口には直接関係しないことが示唆された。

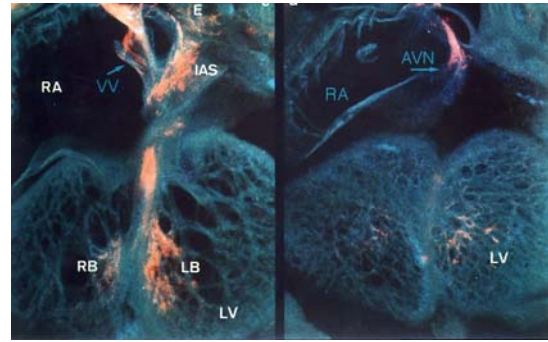
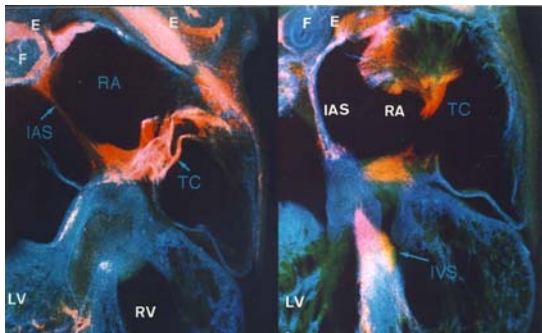


図9. 胎生14.5日ラット胚における心房と背側間葉組織(左欄下段)と心室及び房室接合部(上段)におけるHNK-1の発現

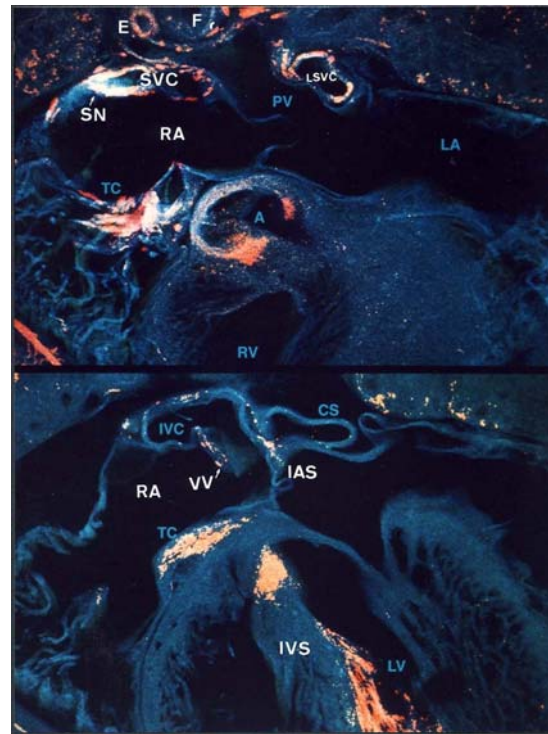


図10. 胎生16.5日ラット胚におけるHNK-1発現

以上より、冠動脈が大動脈に開口する過程において、心臓外に起源を有する細胞のうちPEOの細胞は大動脈周囲に細胞群を形成し冠動脈の原基を形成するとともに開口に大きく関与することが明らかになったが、cNCCやSHFの細胞は直接関与しないことが示唆された。また、大動脈周囲に局限したシグナル、すなわち大動脈とその周囲の冠動脈原基との間にタイムリーに発信されるテネイシン等の接着分子の相互作用によって開口が完成されると判断された。

この過程で作用する分子とその情報伝達の機序を明らかにすることが今後の大きな課題である。

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 5 件)

- ① 中川雅生、小児不整脈に対する抗不整脈薬適応外使用の現状、CLINICIAN(クリニシアン)、55:1106-1110, 2008(査読なし)
- ② 柴田昌美、古川央樹、藤野英俊、中川雅生、竹内義博、岡本暢彦、急性期の冠動脈拡大病変が軽度であったにもかかわらず右冠動脈の閉塞をきたした川崎病既往の 1 例、Progress in Medicine、28:1683-1686, 2008 (査読なし)
- ③ Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, Kamisago M, Momma K, Katayama H, Nakagawa M, Fujiwara Y, Matsushima M, Mizuno K, Tokuyama M, Hirota H, Muneuchi J, Higashinakagawa T, Matsuoka R. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. Nature Genetics. 39:1013-1017, 2007 (査読あり)
- ④ 佐地 勉、中川雅生、肺高血圧症への sildenafil 治療に関する使用実態調査結果、日本小児循環器学会雑誌、23:75-76, 2007. (査読あり)
- ⑤ 伊藤英介、宗村純平、赤堀史絵、藤野英俊、中川雅生、竹内義博、松井克之、岡本暢彦、学校心臓検診で看過され torsade de pointes で発症した先天性 QT 延長症候群の 1 例、心臓、39:661-666, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 花戸貴司、中川雅生、竹内義博、今中 - 吉田恭子、マウス冠動脈発生過程における血管内皮マーカーの発現、「心臓血管発生：先天性心疾患予防へ向けて」、第 44 回日本小児循環器学会総会、2008. 7. 2-4、郡山
- ② 山岸敬幸、中川雅生、心臓血管発生—先天性心疾患予防は可能か? 「心臓血管発生：先天性心疾患予防へ向けて」、第 44 回日本小児循環器学会総会、2008. 7. 2-4、郡山
- ③ 花戸貴司、星野真介、黄瀬一慶、西島節子、藤野英俊、中川雅生、左心房近傍の肺静脈発生に関する検討、第 11 回小児心血管分子医学研究会、2008.7.3、郡山
- ④ 黄瀬一慶、花戸貴司、西島節子、藤野英俊、中川雅生、左心房近傍の肺静脈発生に関する検討—成長因子の関与について—、第 43 回日本小児循環器学会総会、2007. 7. 6-8、東京

[図書] (計 3 件)

- ① 中川雅生、講義録小児科学、佐地勉、有阪治、大澤真木子、近藤直実、竹村司編、冠動脈奇形、メジカルビュー社(東京)、pp491-493、2008
- ② 中川雅生、臨床心臓発生学、山岸敬幸、白石公編、冠動脈の発生・生理と病態、メジカルビュー社(東京)、pp158-162, 2007
- ③ Matsuoka R, Minamisawa S, Akimoto K, Ichida F, Ohta Y, Ogata S, Ono Y, Oyama K, Kuroe K, Kosaka K, Satomi G, Joo K, Seguchi M, Takahashi E, Nakagawa M, Haneda N, Baba K, Fukushige J, Furutani Y, Maeda J, Murai T, Mori K, Yoshinaga M, Yamagishi H, Ando M, Strong association between single-gene etiology and the intrauterine environment. Future Aspects of Medical Sciences and Education. Nadal-Ginard B. and Takakura K. eds., International Research and Educational Institute for Integrated Medical Science (IREIIMS), Tokyo, pp151-154, 2007,.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 雅生 (NAKAGAWA MASAO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40188909

(2) 研究分担者

藤野 英俊 (FUJINO HIDETOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：40209078

(3) 連携研究者

今中 - 吉田 恭子 (IMANAKA-YSHIDA KYOUKO)

三重大学・医学部・准教授
研究者番号：00242967

研究協力者

花戸 貴司 (HANATO TAKASHI)
黄瀬 一慶 (KISE KAZUYOSI)
西島 節子 (NISHIJIMA SETSUKO)
渡邊 格子 (WATANABE NORIKO)

