

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03622

研究課題名(和文)動物モデルとヒトiPS細胞を用いた環境と遺伝子相互作用による心疾患形成機構の解明

研究課題名(英文)Genetic-environmental interaction for congenital cardiovascular disease

研究代表者

山岸 敬幸 (YAMAGISHI, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40255500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：22q11.2欠失症候群に合併する先天性心疾患の責任遺伝子であるTBX1の発現を遺伝子改変技術で低下させたマウスモデルにおいて、妊娠母マウスに葉酸を投与することにより、胎仔の先天性心疾患表現型を軽症化することに成功し、葉酸によりNOTCHシグナルが活性化され、心臓前駆細胞である神経堤細胞の発生分化異常が救済される機序が示唆された。また、遺伝子改変マウスの交配実験によりTBX1と同じ遺伝子群のTBX20が心臓発生において遺伝的相補性を持って機能することが明らかになり、下流転写因子PITX2の発現を制御することにより心臓ルーピングおよび心室中隔形成に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題におけるTBX1とTBX20の遺伝的相補性が示された成果は、多因子遺伝と考えられる複雑先天性心疾患の発症分子機序解明のための一つの基礎的知見として重要である。また、ヒト染色体・遺伝子異常そのものを治療・修復する医療は困難だが、葉酸によるTbx1発現低下マウスの心疾患表現型の軽症化および心臓神経堤細胞の機能回復とその分子経路を示唆した本研究の学術的意義は高く、将来的にヒト22q11.2欠失症候群の心疾患を軽症化する治療・予防法につながる可能性を示すことから、数多くの心疾患への応用を含めて社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model in which the expression of TBX1, the gene responsible for congenital heart disease associated with 22q11.2 deletion syndrome, was downregulated by genetic engineering technology, folic acid administration to pregnant mother mice successfully reduced the congenital heart disease phenotype in the fetuses, and a mechanism in which folic acid activates NOTCH signaling and rescues defects of development/differentiation in a cardiac progenitor cell lineage, namely cardiac neural crest, was suggested. In addition, crossbreeding experiments with transgenic mice revealed that TBX20, a member of the same gene family as TBX1, functions in cardiac development with genetic interaction and may be involved in cardiac looping and ventricular septum formation by regulating the expression of the downstream transcription factor PITX2.

研究分野：小児循環器学

キーワード：多因子遺伝 総動脈幹症 TBX1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は、最近の我が国の全国調査では年間約 14000 例 (約 1.4%) の頻度で新規発症する先天異常であり、内科的管理・外科的治療の進歩により生存率は向上し、成人に達する例も急増している。しかし、難病指定されている多くの先天性複雑心疾患は予後不良で、術後遠隔期の合併症や再手術が必要となる。これら複雑心疾患の発症分子機構の解明が再生医学等を応用した新たな治療法・予防法の確立に必須だが、先天性心疾患の成因のほとんどは多因子遺伝とされ、これまでの研究でも発症分子機構を特定することが困難な現状である。多因子遺伝による先天性心疾患の発症分子機構を解明すると同時に、環境因子の作用を明らかにし、治療・予防に応用するための基礎的知見が必要である。

私たちは Tbx1 発現低下マウスを樹立し、ヒト 22q11.2 欠失症候群で高率に見られる総動脈幹症が認められることを報告してきた (Trends Mol Med 2003, Development 2004, Sci Rep 2017, Front Cardiovasc Med 2021)。総動脈幹症の表現型形成機序は不明だが、疾患発症予防という観点では、大規模ゲノム研究により先天性心疾患の成因として DNA メチル化遺伝子が報告された (Nature 2013)。また、葉酸摂取量の増加が心臓流出路発生異常の頻度を低下させるという大規模人口統計データが報告された (Circulation 2016)。葉酸はメチル基を供給する基質であり epigenetic に心臓発生を制御することが想定されるが、これまでに科学的検証はなく作用機序は不明である。そこで私たち独自のモデルマウスを用いて、本研究課題に着想した。葉酸などの化合物をスクリーニングして臨床応用への道を実現するために、これまでのモデルマウスによる検討にヒト iPS 細胞を組み合わせた実験系を考えた。また、ヒト iPS 細胞から TBX1 および TBX20 を発現する心臓前駆細胞 (二次心臓領域細胞) を特異的に分化誘導し、その過程における TBX1 および TBX20 の変異が与える影響を検討することにより、これまでモデルマウスを用いて解明されてきた TBX1 および TBX20 の分子基盤について、ヒト細胞で検証することができ、さらに細胞レベルの詳細なデータが得られることが期待される。そしてスクリーニングされた有用な化合物については、ヒト細胞およびモデルマウスを用いて in vitro および in vivo で検証できるシステムを構築することに着想した。

2. 研究の目的

本研究課題では、複雑心疾患の中でも最も数の多い心臓流出路異常の新たな治療法・予防法の確立を目指して、心臓流出路を形成する心臓前駆細胞の発生に、複数の遺伝子および環境因子がどのように作用して、心臓流出路異常の表現型に関与するかを解明することを目的とした。本研究課題の特色は、先天性心疾患の成因で最も重要だが、いまだ解明されていない多因子遺伝の分子機構について、私たちがこれまで独自に研究を進めてきた心臓前駆細胞の発生および流出路形成異常に関与する T-box 転写因子の遺伝子改変マウスに、ヒト iPS 細胞を組み合わせた新たな実験系を確立し、心臓前駆細胞を制御する分子機構と、先天性心疾患を治療・予防するための新たな基礎的知見を創成することである。私たちの Tbx1 遺伝子発現低下マウスは、ヒト 22q11.2 欠失症候群のモデルマウスとして、Tbx1 遺伝子量の変化に他の遺伝子や環境因子の効果が加わった場合の多因子遺伝の表現型の変化を連続的に解析することができる。先天性複雑心疾患に対する新たな治療・予防戦略の創造には、iPS 細胞など幹細胞から分化した心臓前駆細胞を利用した再生医療が期待され、本研究課題の目的である個々の複雑心疾患の発症分子機序解明の蓄積は、オーダーメイド医療のための基礎的知見として重要である。ヒト染色体・遺伝子異常そのものを治療・修復する医療は困難だが、本研究で Tbx1 発現低下マウスの心疾患表現型を軽症化する環境因子・分子経路を特定できれば、将来ヒト 22q11.2 欠失症候群の心疾患を軽症化する治療・予防法につながる可能性を示し、数多くの心疾患への応用を含めて社会的意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 環境因子が心疾患表現型に与える影響の解明: 22q11.2 欠失症候群モデルマウスを用いた実験系で、葉酸が先天性心疾患を軽症化する分子機構を解明する。私たちは、Tbx1 発現低下ヘテロ (Tbx1neo/+) 妊娠マウスを葉酸過剰餌で飼育または葉酸 25 mg/kg/day を腹腔内注射し、表現型の変化を観察した。Tbx1 発現低下胎仔 (Tbx1neo/neo) には、流出路の中隔が形成されない先天性心疾患 (総動脈幹症) が認められる。Tbx1 発現低下マウスの総動脈幹症の表現型を詳細に解析すると、通常に発生した場合には Van Praagh A2 型であるが、葉酸を投与した場合には Van Praagh A1 型に変化することがわかった。主肺動脈がなく左右肺動脈が総動脈幹から直接起始する Van Praagh A2 型に比し、主肺動脈が形成されて総動脈幹から分岐する Van Praagh A1 型に変化したことは、流出路の中隔形成異常が軽症化したと考えられ、この機序を明らかにできれば環境因子による胎児心臓発生への介入に発展する可能性がある。そこで以下の 3 つの方法で、この機序を解明する。①細胞機序の解明: 心臓流出路の発生および総動脈幹症の発症に重要な前駆細胞である心臓神経堤細胞の挙動を解析する。Tbx1 発現低下マウスでは、心臓流出路中隔を形成する間葉系細胞数減少・apoptosis 亢進が認められたが、葉酸投与によりこの apoptosis が抑制され、間葉系細胞数の減少も改善する結果が得られた。この間葉系細胞は心臓神経堤由来細胞と考えられ、さらに解析数を増やし特異的分子マーカー (P0-Cre) を用いて心臓神経堤由来細胞

を蛍光標識して可視化し、再現性を確認しながらより詳細に検討する。②epigenetic 機序：葉酸はメチル基を供給する基質であり、Tbx1 発現低下マウスにおける葉酸投与による DNA メチル化の変化を網羅的に解析し、候補分子経路を特定する。過去に報告された方法 (JoVE 2012, Nat Protocol 2013, Stem Cell Dev 2012) を改変して、マウス心臓神経堤細胞の単離培養法プロトコルを新規に開発した。胎生 9.5 日マウス胚から神経管を単離培養し、神経堤細胞を増殖させて葉酸を添加し、DNA を抽出する。DNA メチル化パターンについて、バイサルファイト処理後、パイロシークエンスを用いて CpG アイランドメチル化解析する。③分子機序：Tbx1 発現低下マウスにおいて葉酸投与による遺伝子発現変化を網羅的に解析し、候補分子経路を特定する。

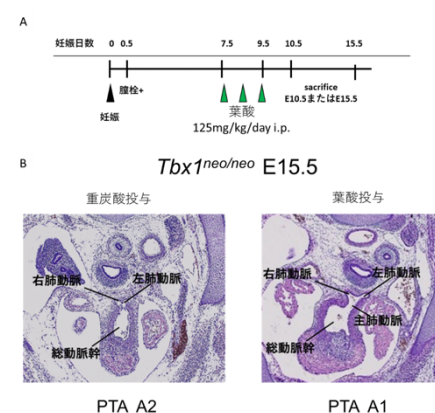
(2) ヒト iPS 細胞実験系を用いた心臓流出路発生を担う心臓前駆細胞の制御機構とそれを修飾する環境因子の解明：目的を達成するために、TBX1 および TBX20 が発現する二次心臓領域由来心臓前駆細胞を、ヒト iPS 細胞から分化誘導・純化する方法を開発する。具体的には、心臓領域特異的マーカー遺伝子の制御下に発現する蛍光蛋白遺伝子を、ゲノム編集技術を用いてヒト iPS 細胞に導入・選別する。予備実験では、心筋分化誘導開始 6 日目より 2 種類の蛍光 (GFP, RFP) の発現が認められ、誘導開始 10 日目に GFP および RFP シグナルの有無により FACS を用いて 4 分画に選別でき、各分画はトロポニン T、TBX5 など想定される各心臓領域特異的前駆細胞の遺伝子発現パターンに合致し、システムの有用性が確認できた。さらに二次心臓領域由来の前駆細胞を特異的に標識するシステムを開発するため、同様にゲノム編集技術を用いて蛍光蛋白を発現するヒト iPS 細胞株を作製する。上記作製したヒト iPS 細胞株において、TBX1 の開始コドンに CRISPR/Cas9 で非同相末端結合によって破壊することにより TBX1 の発現を障害したヒト iPS 細胞を作製し、その心筋分化誘導過程における、分化効率、増殖能、トランスクリプトーム、プロテオームを解析し、ヒトとマウスの異同を明らかにすると同時に、TBX1 の発現を障害したヒト iPS 細胞株の表現型の異常に関与するシグナルを同定する。そのシグナルを修飾する化合物について、ヒト iPS 細胞実験系を用いてスクリーニングする。

(3) TBX1・TBX20 複合遺伝子変異マウスの心疾患表現型の解析による複数の遺伝子変異の遺伝的相互作用が心疾患表現型におよぼす影響ならびに分子機序の解明：過去の報告 (PLoS One 2014) および私たちの臨床経験から、TBX20 ヘテロ変異は他の因子との複合 (多因子) により先天性心疾患の様々な表現型に関与すると考えられる。22q11.2 欠失症候群の臨床表現型も多様であり、TBX1 の欠失と同時に他の二次性遺伝的要因の関与が推定される。TBX20 と TBX1 は T-box ファミリーの中で特に構造・起源が近く、どちらも二次心臓領域細胞に発現している。そこで、TBX1 と TBX20 には遺伝的相互作用があると仮説を立て、遺伝子改変マウスを用いて検証する。Tbx20 遺伝子改変マウスについては、CRISPR/Cas9 法により exon2 の locus を挟むように 2 種の guide RNA を作製し、機能に重要な T-box ドメインを欠損したマウスの樹立を試みた。実体顕微鏡下に胎生 9.5 日胚を観察し、心臓流出路を中心とした低形成および卵黄膜血管発生異常が認められ、Tbx20 遺伝子改変マウスが良好に樹立されたことが確認された。Tbx1 および Tbx20 遺伝子改変マウスを交配し、Tbx20/Tbx1 ダブルノックアウトマウス胎仔の心血管表現型を解析する。実体顕微鏡による全体像の観察、心臓組織切片の作製、分子マーカー (一次心臓領域マーカー、二次心臓領域マーカー、心臓神経堤細胞マーカーなど) を用いた検討により、心疾患表現型と分子機序を詳細に解明する。また、Tbx20/Tbx1 ダブルホモ変異マウス、Tbx20 ヘテロ/Tbx1 ホモ変異マウスなど、種々の遺伝子発現を持つ胎仔を解析し、複数の心臓発生関連因子の遺伝子発現量の変化により心疾患表現型が決定される機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 環境因子が心疾患表現型に与える影響の解明：葉酸投与による心臓表現型の変化を再現性をもって観察するために、最適な葉酸投与法を検討した結果、Tbx1 発現低下アレルをヘテロで有する雄雌マウス (Tbx1neo/+) を交配し、妊娠 7.5~9.5 日に 1 日 1 回葉酸 125mg/kg/回を腹腔内注射することにより、Tbx1 発現低下胎仔 (Tbx1neo/neo) に発症する総動脈幹症の表現型変化を確実に観察することが可能となった (図 1)。心臓流出路中隔形成には、心臓神経堤細胞が背側の神経管より遊離、遊走し、心臓流出路に到達することが必須であり、心臓流出路中隔を形成する間葉系細胞は心臓神経堤由来と考えられている。葉酸投与による心臓流出路における心臓神経堤由来細胞の分布を明らかにするため、神経堤細胞を標識可能な Tbx1 発現低下マウス (Tbx1neo/+::CAG-CAT-EGFP::P0-Cre) を作製した。このマウスは、P0 遺伝子プロモーターの制御下に神経堤細胞に Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現する。Cre リコンビナーゼは CAG-CAT-EGFP 遺伝子の CAT 遺伝子配列を切り出し、CAG エンハンサー制御下に恒常的に EGFP 遺伝子を発現させるため (Cell Stem Cell 2008)、Tbx1 遺伝子の発現が低下したマウスにおいて神経堤細胞を EGFP で標識することができる。このトリプルラン

図 1 葉酸投与による Tbx1 発現低下胎仔の心臓表現型改善



スジェニックマウスを交配し、胎仔を解析することにより Tbx1 発現低下胎仔の神経堤細胞の細胞動態を可視化して、正確に評価することが可能となった。その結果、Tbx1 発現低下胎仔の背側に異所性に神経堤由来細胞塊が形成されていることがわかった。このトランスジェニックマウスの妊娠母体に前述のプロトコルで葉酸を投与し、心臓流出路における神経堤細胞分布を解析した結果、母体葉酸投与により Tbx1 発現低下マウスの心臓流出路(近位・遠位)の神経堤細胞数が増加することが確認された(図2)。

さらに詳細に GFP 陽性細胞の分布を観察するために、任意の断面で観察できるライトシート顕微鏡を用いて解析した結果、咽頭弓領域において Tbx1 発現低下胎仔で認められた異所性の GFP 分布パターンに変化が観察された。咽頭弓動脈に着目してより詳細に解析すると、母体葉酸投与により左第 VI 咽頭弓動脈周囲の GFP 陽性細胞が増加する様子が観察された。この GFP 陽性細胞の分布変化が、心臓表現型改善につながる分子機構を明らかにするため、野生型胎仔、Tbx1 発現低下胎仔、母体葉酸投与 Tbx1 発現低下胎仔の3群における網羅的遺伝子発現解析を行った結果、葉酸投与により Notch シグナルの変化がもたらされる可能性が示唆された(図3)。

そこで咽頭弓動脈領域における Notch シグナルの活性化を解析したところ、GFP 陽性神経堤由来細胞の分布増加が認められた左第 VI 咽頭弓動脈周囲において、神経堤由来細胞に一致して Notch1 intracellular domain(N1ICD)の存在が確認され、Notch シグナルの活性化が明らかになった(図4)。次に、Tbx1 発現低下胎仔に認められた神経堤由来細胞の背側の異所性細胞塊の分化パターンを解析したところ、この細胞塊は神経系譜へ分化していること、および葉酸投与により、その異所性の神経系譜細胞への分化が抑制されていることが明らかとなった。以上より、“葉酸が心臓神経堤細胞における Notch シグナルの活性化に寄与し、神経堤細胞を未分化で遊走可能な状態に保つことにより、心臓流出路へ到達し、流出路中隔形成に寄与する細胞数を増加させ、流出路表現型の改善につながる”というモデルが考えられた(図5)。

(2) ヒト iPS 細胞実験系を用いた心臓流出路発生を担う心臓前駆細胞の制御機構とそれを修飾する環境因子の解明：当初の計画にしたがい、ゲノム編集技術を用いた複数種の心臓前駆細胞系譜特異的マーカー遺伝子の発現を可視化可能とするヒト iPS レポーター細胞株樹立を目指し、TBX1 および TBX20 が発現する二次心臓領域由来心臓前駆細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導・純化するための実験を行なったが、複数回のゲノム編集によって細胞にかかるストレスにより、細胞の多能性を維持することが困難で難航した。加えて上記(1)の結果より、葉酸が心臓流出路発生異常の表現型に与える影響は、心臓前駆細胞として二次心臓領域由来細胞よりも心臓神経堤細胞の発生の変化としてもたらされる部分が多いと考えられ、二次心臓領域ヒト iPS レポーター細胞株を利用せず、コントロールヒト iPS 細胞より神経堤細胞様細胞(Induced Neural Crest Like Cell: iNCLC)を分化誘導する実験に変更した(Sci Rep 2018)。分化誘導し

図2 葉酸投与による心臓流出路の心臓神経堤細胞分布の変化

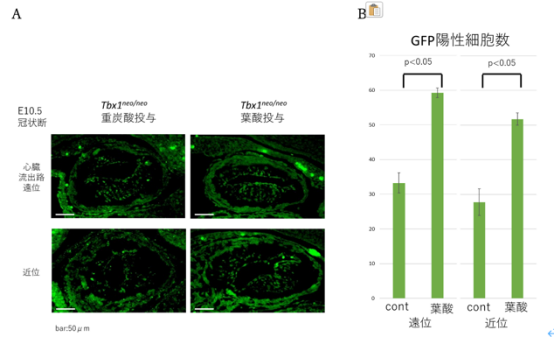


図3 マウス E10.5 胚 Whole embryo RNA-seq 解析における Notch 遺伝子発現量変化

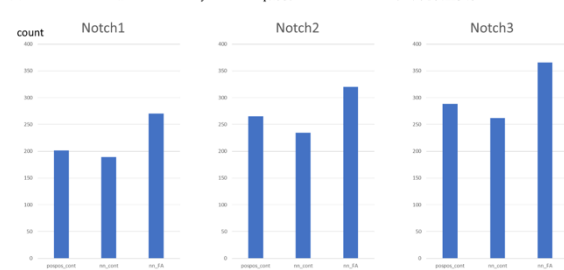


図4 胎生 10.5 胎仔の左第 VI 咽頭弓動脈冠断面拡大図：母体葉酸投与により第 VI 咽頭弓動脈周囲の神経堤細胞(緑)に一致した N1ICD(赤)の発現上昇が認められる。

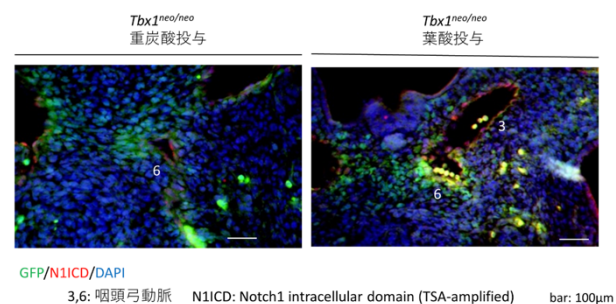
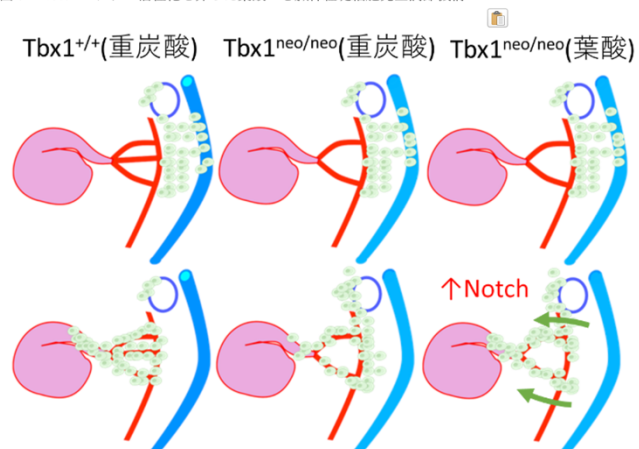


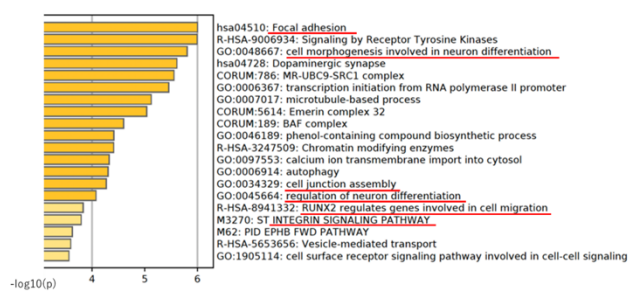
図5 Notch シグナル活性化を介した葉酸の心臓神経堤細胞発生調節機構



心臓流出路発生異常の表現型に与える影響は、心臓前駆細胞として二次心臓領域由来細胞よりも心臓神経堤細胞の発生の変化としてもたらされる部分が多いと考えられ、二次心臓領域ヒト iPS レポーター細胞株を利用せず、コントロールヒト iPS 細胞より神経堤細胞様細胞(Induced Neural Crest Like Cell: iNCLC)を分化誘導する実験に変更した(Sci Rep 2018)。分化誘導し

た iNCLC を用いて、葉酸添加の有無に応じた遺伝子発現変化を解析することにより、上述の Tbx1 発現低下マウス胎仔で認められた、神経堤細胞動態の分子制御機序の解明を目指すこととした。培地への葉酸添加の有無に応じた、細胞遊走能の変化を migration assay を用いて検討したが、有意な変化は認められなかった。そこで、iNCLC に生じる遺伝子発現の変化を RNA-sequencing により解析したところ、葉酸投与の有無により神経分化や細胞の接着に関わる経路の関連が示唆された (図 6)。さらに single cell RNA-sequencing を用いて葉酸投与の有無に応じた Tbx1 発現低下胎仔および野生型胎仔の咽頭弓〜心臓流出路領域の遺伝子発現プロファイルを解析しており、その結果によりどの心臓前駆細胞にどのような遺伝子発現変化が生じて、心臓表現型の変化に影響しているかが明らかになることが期待される。また、本研究計画でこれまでに明らかになった葉酸と Notch シグナルを結ぶメカニズムについて、メチル化および ATAC-sequencing を用いた epigenetic 環境変化の解析に着手している。

図 6 iPS 由来神経堤様細胞を用いた RNA-sequencing



(3) TBX1・TBX20 複合遺伝子変異マウスの心疾患表現型の解析による複数の遺伝子変異の遺伝的相互作用が心疾患表現型におよぼす影響ならびに分子機序の解明：Tbx1 と Tbx20 の遺伝的相互作用の有無を検討するために、Tbx1/Tbx20 ダブルヘテロ変異マウス同士を交配し、Tbx1+/-Tbx20-/-や Tbx1-/-Tbx20-/-胎仔を胎生 9.5 日に観察した。Tbx1+/-Tbx20-/-は外観上 Tbx20-/-と著変なく、ともに原始心筒のルーピングが見られたが、その先の発生が障害されていた。一方、Tbx1-/-Tbx20-/- (ダブルホモ変異マウス) では、ルーピングがより強く障害されており、流出路低形成もより顕著であった (図 7)。

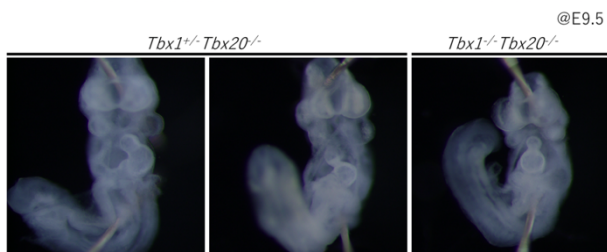


図 7 Tbx1/Tbx20 ダブルホモ変異マウス胎仔像

以上より、Tbx1 と Tbx20 は遺伝的相補性をもって、心臓の初期発生に機能することが示唆された。さらに、胎生 18.5 日の Tbx1/Tbx20 ダブルヘテロ変異マウス胎仔の心臓表現型を解析したところ、高率に心室中隔欠損が認められた (図 8)。振り返って胎生 18.5 日の Tbx20 単独ヘテロ変異マウス胎仔を詳細に解析したところ、やはり心室中隔欠損が認められ、Tbx20 のヘテロ変異がこの心臓表現型に中心的な役割を果たすことが示唆された。さらに解析個体数を増やして、Tbx1 のヘテロ変異がこの心臓表現型を修飾しているかどうかを検討している。また、以上 Tbx1/Tbx20 変異マウスが、発生初期のルーピング異常、発生後期の心室中隔欠損に関連することから、発生初期に体の左右軸を制御し、心室中隔形成にも関与することが報告されている転写因子 Pitx2 の発現を解析した。定量 qPCR での検討で、Tbx20 ホモ変異マウスにおいて Pitx2 の発現量の低下が認められた。さらに解析個体数を増やして Tbx1 変異がこの Pitx2 の発現低下を修飾するかどうかを検討する。

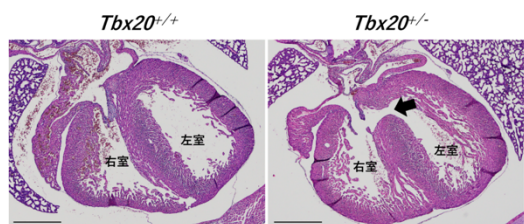


図 8 Tbx20+/-マウスに認められた心室中隔欠損 (矢印) | 胎生 18.5 日

参考文献

Yamagishi & Srivastava. Trends Mol Med 2003;9:383-389
 Hu et al. Development 2004;131:5491-5502
 Kodo et al. Sci Rep 2017;7:6771
 Kodo et al. Front Cardiovasc Med 2021;8:653244
 Zaidi et al. Nature 2013;498:220-223
 Liu et al. Circulation 2016;134:647-655
 Elise et al. JoVE 2012;64:e4134
 Etchevers et al. Nat Protocol 2011;6:1568-1577
 Töpf et al. PLoS One 2014;9:e95453
 Ishii et al. Stem Cell Dev 2012;21:1069-3080
 Nagoshi et al. Cell Stem Cell 2008;10:392-403
 Kimura et al. Sci Rep 2018;8:10071

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kodo Kazuki, Uchida Keiko, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic and Cellular Interaction During Cardiovascular Development Implicated in Congenital Heart Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	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) 10.3389/fcvm.2021.653244	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 Takatsuki S, Furutani Y, Inai K, Kobayashi T, Inuzuka R, Uyeda T, Kamisago M, Muneuchi J, Kaneko M, Misaki Yi, Ono H, Kato H, Shimada E, Shinohara T, Waki K, Suda K, Hayabuchi Y, Ohki H, Ishizaki R, Maeda J, Yamagishi H	4. 巻 84
2. 論文標題 Pregnancy and Delivery in Patients With Repaired Congenital Heart Disease A Retrospective Japanese Multicenter Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2270 ~ 2274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-1150	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 Suzuki Noriomi, Kanzaki Sho, Suzuki Takafumi, Ogawa Kaoru, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 140
2. 論文標題 Clinical features of 22q11.2 deletion syndrome related to hearing and communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 728 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2020.1769862	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 Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cardiac Neural Crest	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a036715 ~ a036715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a036715	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 Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Perspective for Part I	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 3~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1185-1_1	査読の有無 無
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

1. 著者名 Uchida Keiko, Yoshida Yu, Kodo Kazuki, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Roles of Tbx4 in the Lung Mesenchyme for Airway and Vascular Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 79~81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1185-1_8	査読の有無 無
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

1. 著者名 Shibata Akimichi, Uchida Keiko, Mikoshiba Katsuhiko, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Ca ²⁺ Signal Through Inositol Trisphosphate Receptors for Cardiovascular Development and Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 97~99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1185-1_13	査読の有無 無
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

1. 著者名 Yasuhara Jun, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Pulmonary Hypertension Associated with Postoperative Tetralogy of Fallot	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 209~211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1185-1_29	査読の有無 無
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

1. 著者名 Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Respiratory Syncytial Virus Infection in Infants with Heart and Lung Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 215 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1185-1_31	査読の有無 無
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

1. 著者名 Kodo Kazuki, Shibata Shinsuke, Miyagawa-Tomita Sachiko, Ong Sang-Ging, Takahashi Hiroshi, Kume Tsutomu, Okano Hideyuki, Matsuoka Rumiko, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A Temporo-Spatial Regulation of Sema3c Is Essential for Interaction of Progenitor Cells during Cardiac Outflow Tract Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 377 ~ 379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1185-1_58	査読の有無 無
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

1. 著者名 Shibata A, Mori H, Kodo K, Nakanishi T, Yamagishi H.	4. 巻 83
2. 論文標題 Polysplenia Syndrome as a Risk Factor for Early Progression of Pulmonary Hypertension.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 831-836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0933.	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 Shibata A, Uchida K, Kodo K, Miyauchi T, Mikoshiba K, Takahashi T, Yamagishi H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension via calcium signaling and apoptosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 711-715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1304-4.	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 Yamagishi H	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Cardiac Neural Crest	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a036715 ~ a036715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a036715	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 Sumitomo Naofumi F, Kodo Kazuki, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Synthetic electrocardiogram-gated cardiac computed tomography precisely depicted a coronary-to-pulmonary fistula in an early infant with pulmonary atresia, ventricular septal defect, and major aortopulmonary collateral arteries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Heart Journal - Cardiovascular Imaging	6. 最初と最後の頁 e236 ~ e236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ehjci/jeab261	査読の有無 無
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 Sumitomo Naofumi F., Kodo Kazuki, Maeda Jun, Miura Masaru, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Echocardiographic Left Ventricular Z-Score Utility in Predicting Pulmonary-Systemic Flow Ratio in Children With Ventricular Septal Defect or Patent Ductus Arteriosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 128 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-21-0559	査読の有無 無
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 Miyamoto Kenji, Inai Kei, Kobayashi Tohru, Maeda Jun, Takatsuki Shinichi, Nakayama Tomotaka, Furutani Yoshiyuki, Yamagishi Hiroyuki, Nakanishi Toshio	4. 巻 36
2. 論文標題 Outcomes of idiopathic pulmonary arterial hypertension in Japanese children: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 1392 ~ 1399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-021-01806-1	査読の有無 無
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 Oyanagi Takayuki、Tomita Kentaro、Furuichi Munehiro、Shinjoh Masayoshi、Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Successful resuscitation from SARS CoV 2 infection in a child after Rastelli operation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 730 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14479	査読の有無 無
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 Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical Developmental Cardiology for Understanding Etiology of Congenital Heart Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2381 ~ 2381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11092381	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 心臓神経堤細胞の世界
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 Cutting-edge researches implicated in clinical cardiovascular embryology
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 多彩な病態を示す先天性心疾患に伴う肺高血圧に対する治療戦略
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧肺循環学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 先天性心疾患のエコー診断のための臨床心臓発生学
3. 学会等名 第32回日本心エコー図学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 臨床心臓発生学から考える先天性心疾患の診断と治療
3. 学会等名 第46回東日本小児科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 発生学から考えるCHD-PH
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸敬幸
2. 発表標題 心臓発生学
3. 学会等名 第52回日本心臓血管外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山岸 敬幸、白石 公	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 336
3. 書名 新 先天性心疾患を理解するための臨床心臓発生学	

1. 著者名 Toshio Nakanishi, H. Scott Baldwin, Jeffrey R. Fineman, Hiroyuki Yamagishi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 405
3. 書名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	

〔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	土橋 隆俊 (TSUCHIHASHI Takatoshi) (10286528)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・客員講師 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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	古道 一樹 (KODO Kazuki) (10338105)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究 分 担 者	内田 敬子 (UCHIDA Keiko) (50286522)	慶應義塾大学・保健管理センター（日吉）・准教授 (32612)	
研究 分 担 者	湯浅 慎介 (YUASA Shinsuke) (90398628)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関