

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17309

研究課題名(和文)新規肺動脈平滑筋特異的マーカーIP3R2による心臓流出路・肺動脈発生機序の解明

研究課題名(英文) Inositol 1,4,5- triphosphate receptor 2 as a novel pulmonary artery smooth muscle marker to delineate the processes of cardiopulmonary development

研究代表者

石崎 怜奈 (ISHIZAKI, Reina)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70528299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症先天性心疾患には、しばしば肺動脈異常が合併し治療に難渋する。しかし、肺動脈異常の発症機序には不明な点が多く、肺動脈特異的分子マーカーを用いた解析が必要である。本研究では、イノシトール三リン酸受容体2型(IP3R2)が肺動脈平滑筋に発現することを解明し、IP3R2を肺動脈平滑筋特異的分子マーカーとして利用することにより、マウスの肺動脈の発生過程を可視化することに成功した。その結果、肺動脈平滑筋が心臓流出路から肺動脈の末梢へ向かって発生することを明らかにした。また、総動脈幹症モデルマウスの解析に応用し、肺動脈基部の無または低形成により総動脈幹症が発症する機序を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでに存在しなかった肺動脈の発生を可視化することができる有用なIP3R2-LacZマウスという実験動物を確立した。さらに、IP3R2-LacZマウスを用いて、総動脈幹症という重症先天性心疾患の発症機序とそれに伴う肺動脈の形態異常の解明に応用することができた。先天性心疾患の診療を向上させるために、病態解明と予防・再生医療に発展する基礎研究は重要であり、今回確立したIP3R2-LacZマウスは様々な先天性心疾患と合併する肺動脈異常の病態解明に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Severe congenital heart diseases are often complicated by pulmonary artery anomalies, which are difficult to treat. The pathogenesis of pulmonary artery anomalies remains unclear, and analysis using molecular markers specific for pulmonary artery development is required. In this study, we elucidated that inositol triphosphate receptor type 2 (IP3R2) is expressed in pulmonary artery smooth muscle, and by using IP3R2 as a pulmonary artery smooth muscle-specific molecular marker, we succeeded in visualizing the developmental process of pulmonary arteries in mice. As a result, it was clarified that pulmonary artery smooth muscle develops from the cardiac outflow tract toward the periphery of pulmonary arteries. We also applied this technique to the analysis of a mouse model of truncus arteriosus, and showed the mechanism by which truncus arteriosus develops due to the absence or hypoplasia of the base of the pulmonary arterial trunk.

研究分野：心臓発生

キーワード：IP3R2 肺動脈平滑筋 発生 総動脈幹症 Tbx1

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は出生約 100 人に 1 人の割合で認められる頻度の高い先天異常で、うち 20-30%は重篤な症状により新生児・乳児期死亡の原因となる。重症例にはしばしば肺高血圧、肺動脈低形成、主要大動脈肺動脈側副動脈などの肺動脈異常を合併する。先天性心疾患の約 30%を占める心臓流出路異常では、特に肺血流を適正に制御するための治療・管理が必要となり、肺動脈異常が予後を左右することも多い。心臓流出路異常の中でも特に重篤な総動脈幹症は、胎生期の動脈幹が遺残して大動脈と肺動脈が分割されない疾患で、染色体 22q11.2 欠失症候群に高率に合併する。本研究では、臨床に携わる研究者として、正常肺動脈の発生、心臓流出路異常および合併する肺動脈異常の発症機序を、肺動脈特異的分子マーカーを用いて解明したいと考えた。研究代表者の所属する研究室ではこれまでに、IP₃R2 の翻訳開始領域に LacZ 遺伝子を挿入したノックアウトマウス(IP₃R2-LacZ マウス) (Futatsugi, A. et al. Science. 2005) の解析を含めて、IP₃R の心血管発生における役割を解明してきた(Uchida, K, et al. PLoS One. 2010, Nakazawa, M, et al. J Mol Cell Cardiol. 2011, Uchida, K. Dev Biol. 2016)。そして、LacZ が心臓流出路近傍の中枢側から肺内の末梢側まで肺動脈の中膜に比較的強く発現すること、および肺内の気道平滑筋には発現がなく、肺動脈平滑筋に特異的に発現することを発見した。そこで今回、このマウスを用いて、正常肺動脈の発生を可視化することを試みた。次に、このマウスを先天性心臓流出路異常モデルマウスと交配することにより、肺動脈および心臓流出路の発生異常がどのような機序で起こるのかを検討した。本研究課題で用いた Tbx1 発現低下マウス(Tbx1^{neo/neo})は染色体 22q11.2 欠失症候群のモデルマウスで、総動脈幹症を発症する (Hu, T. et al. Development. 2004)。

2. 研究の目的

肺動脈特異的標識マウスである IP₃R2-LacZ マウスを用いて、胎生期の正常肺動脈の発生を可視化する。また、同マウスと心臓流出路疾患モデルマウスを交配することにより、疾患発症メカニズムおよび合併する肺動脈異常について解析する。本研究は、先天性心疾患の予後に大きく関与する肺動脈異常の病態を解析する基礎研究として重要である。

3. 研究の方法

- 1) IP₃R2-LacZ マウスを用いて各発生段階に応じた肺動脈形態の経時的変化を X-gal 染色及び、免疫組織化学染色によって観察した。
- 2) IP₃R2-LacZ マウスを用いて各発生段階に応じた心臓流出路形態の経時的変化を観察した。
- 3) Tbx1^{neo/neo}:IP₃R2-LacZ マウスで認められる総動脈幹症における LacZ 陽性部位の分布を観察した。
- 4) Tbx1^{neo/neo} : IP₃R2-LacZ マウスで得られた肺の異常所見について検討した。

4. 研究成果

1) 肺動脈形態の経時的変化：

肺が発生する胎生 9.5 日以降、胎生 18.5 日までの IP₃R2-LacZ マウス胎仔肺での IP₃R2-LacZ の標識パターンを解析した。その結果、肺動脈で平滑筋が発生する胎生 11.5 日に 2 本の肺動脈が同定され(図 1 A 矢頭)、胎生が進むにつれ、肺内の肺動脈が徐々に分岐しながら肺の末梢まで広がっていく様子を可視化することができた(図 1 A-C)。LacZ の発現は肺内の気道平滑筋にはなく、肺動脈平滑筋に特異的に認められた(図 1 D)。本研究により可視化された、肺動脈平滑筋の正常発生パターンは、既報告の distal angiogenesis 仮説の様式を証明するものだった。

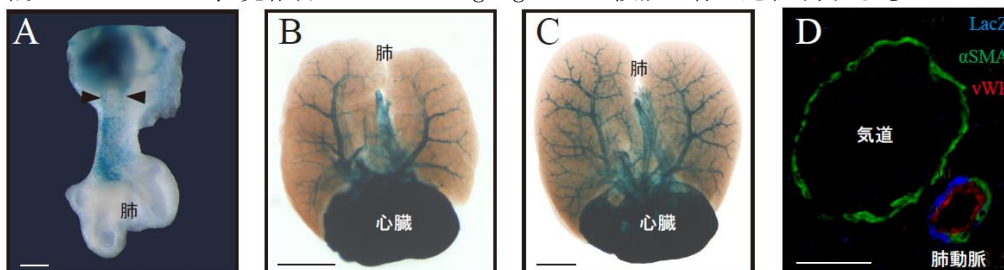


図 1. IP₃R2-LacZ マウス肺の whole-mount LacZ(β -gal)染色(A: 胎生 11.5 日、B: 胎生 15.5 日、C: 胎生 18.5 日)と C の肺組織切片(D) スケールバー=200 μ m(A), 1mm (B, C), 50 μ m(D)

2) IP₃R2-LacZ マウスを用いた各発生段階に応じた心臓流出路形態の経時的変化：

野生型の胎生 13.5 日における心臓流出路から大動脈および肺動脈平滑筋における LacZ 発現(図 2)は、大動脈基部に強く(図 2 B)、肺動脈基部で弱く(図 2 C)、肺動脈分岐部で強かった(図 2 A)。この発現パターンから、LacZ は大動脈・肺動脈基部においては、心臓前駆細胞のうち二次

心臓領域由来の細胞の一部に発現していると考えられた。

3) 総動脈幹症における肺動脈および心臓流出路異常の発症機序：

野生型においても $Tbx1^{neo/neo}$ においても、肺動脈分岐部では LacZ 発現は強く認めた(図 2 A・D)。一方、 $Tbx1^{neo/neo}$ の総動脈幹における LacZ の発現は、基部の平滑筋では肺動脈分岐部まで発現が強く(図 2 E・F 矢頭)、野生型で認められた肺動脈基部の LacZ 発現の弱い部位(図 2 C)は存在しなかった。したがって、 $Tbx1^{neo/neo}$ では肺動脈の基部が形成されない、低形成のために総動脈幹症の形態が形成される機序が示唆された。

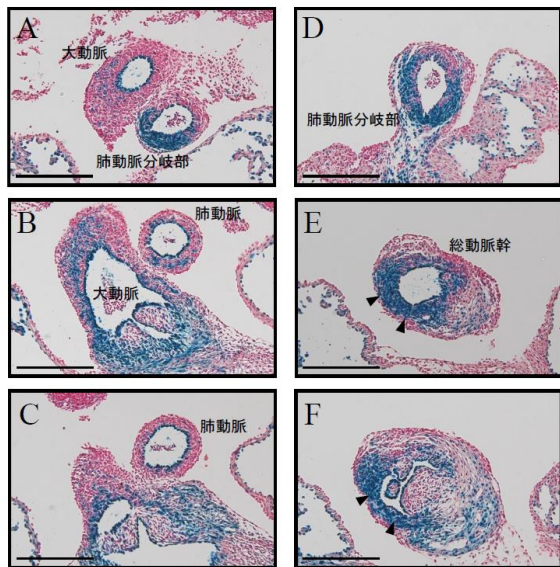


図 2. 胎生 13.5 日の野生型 $IP_3R2-LacZ$ マウス(A-C)と、 $Tbx1^{neo/neo} : IP_3R2-LacZ$ マウス(D-F)の流出路組織切片 スケールバー=200 μm

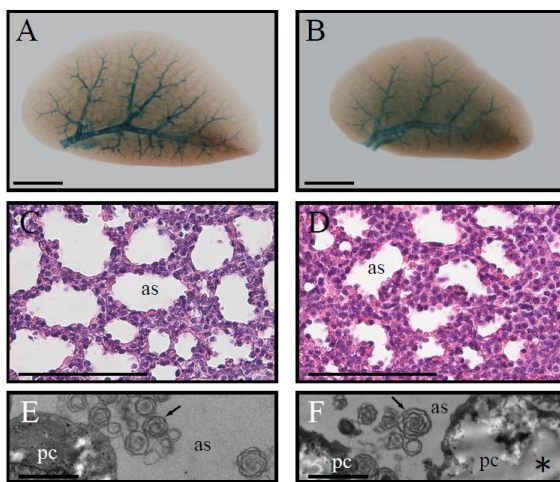


図 3. 胎生 18.5 日の野生型 $IP_3R2-LacZ$ マウス(A,C,E)と、 $Tbx1^{neo/neo} : IP_3R2-LacZ$ マウス(B,D,F)の肺組織。

A,B : 肺の一葉を取り出したもの。C, D : 肺組織像。E,F : 電子顕微鏡写真
スケールバー = 1mm(A,B)、100 μm (C,D)、2 μm (E,F)。as: 肺胞腔, pc: 肺胞上皮細胞, *: グリコーゲン, 矢印: サーファクタント

4) $Tbx1^{neo/neo} : IP_3R2-LacZ$ マウスの肺の異常所見

$Tbx1^{neo/neo} : IP_3R2-LacZ$ マウスの肺は、胎生 18.5 日に野生型 $IP_3R2-LacZ$ マウスの肺と比較して小さかった(図 3 A・B)。病理組織学的に解析すると肺胞が拡張せず、肺胞腔(as)が狭小だった(図 3 C・D)。また電子顕微鏡で観察すると、 $Tbx1^{neo/neo}$ の肺ではサーファクタントは認められたが、野生型と比較して肺胞上皮細胞にグリコーゲンが多く貯留しており、未熟性が示唆された(図 3 E・F)。この結果から、 $Tbx1^{neo/neo}$ が出生後すぐ致死する原因の一つとして、発生障害による肺の未熟性が考えられた。

本研究により、肺動脈平滑筋細胞に特異的な分子マーカーが確立し、その発生におけるパターンが解明されたことは意義深い。また、 $Tbx1^{neo/neo}$ において今まで報告されていなかった、総動脈幹症の発症機序や肺実質の発生障害に関する新たな知見が得られた。今後もこの分子マーカーを利用した先天性心疾患および肺動脈疾患の病態解明が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishizaki Reina, Uchida Keiko, Shibata Akimichi, Tsuchihashi Takatoshi, Maeda Jun, Mikoshiba Katsuhiko, Yamagishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A lacZ Reporter Transgenic Mouse Line Revealing the Development of Pulmonary Artery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Springer, Singapore	6. 最初と最後の頁 83 ~ 85
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_9	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Reina Ishizaki, Keiko Uchida, Akimichi Shibata, Kazuki Kodo, Takatoshi Tsuchihashi, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 The 1,4,5-trisphosphate receptor 2 as a novel marker of vasculature for delineating the cardiopulmonary development
3. 学会等名 2019 Weinstein Cardiovascular Development Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎怜奈、内田敬子、土橋隆俊、柴田映道、古道一樹、御子柴克彦、山岸敬幸
2. 発表標題 イノシトール三リン酸受容体（2型）の心臓流出路・肺動脈発生マーカーとしての有用性
3. 学会等名 第18回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------