

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590174

研究課題名(和文) 冠状動脈形成におけるテネイシンCの役割に関する研究

研究課題名(英文) The role of tenascin C in coronary formation

研究代表者

安藤 克己 (ANDO KATSUMI)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授

研究者番号：00248783

研究成果の概要(和文)：テネイシンCは組織形成や再生に関与していると考えられている細胞外基質糖タンパクである。ウズラ胚の心臓を用いて冠状動脈形成時のテネイシンCについて発現パターンを調べた。免疫組織化学的にテネイシンCは形成中の冠状動脈近位主幹部に発現し、その発現は血管平滑筋 α アクチンと共存していた。関連するカテニン、フィラミン、アクチニン、トロポミオシンなどもこれに同調しており、これらの結果からは、テネイシンCは近位冠状動脈と大動脈壁の中膜平滑筋細胞の分化に役割を果たしている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tenascin C (TNC) is an extracellular glycoprotein that is thought to be involved in tissue remodeling during organogenesis and regeneration. Using quail embryonic hearts, we investigated the spatiotemporal expression patterns of TNC during the formation of the proximal coronary artery. Immunohistochemistry showed that TNC was deposited around the developing coronary stem and that TNC colocalized with vascular smooth muscle α -actin. Actinin, catenin, filamin, tropomyosin etc. were expressed in similar pattern as SMA. These observations suggest that TNC plays a role in the mural smooth muscle development of the nascent proximal coronary artery and aortic wall.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：解剖学、病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含む組織学・発生学)

キーワード：冠状動脈、大動脈、テネイシンC、発生学

1. 研究開始当初の背景

冠状動脈は、組織幹細胞の集団である原始心外膜から発生する。すなわち、均一な原始心外膜上皮から血球、内皮細胞、平滑筋、線維芽細胞が分化し、形成された冠状動脈原基が大動脈に吻合し、そして冠状血管系が完成する。

申請者らはこれまで冠状動脈主幹部の発生について取り組み、完全連続切片を用いて多重蛍光免疫組織染色による詳細な検討を行ってきた。その研究で、冠状動脈は大動脈幹周囲を取り巻くように発達した毛細血管網から発生することを明らかにしており、本発生過程を大動脈壁に誘導するメカニズムについて引き続き探索している。近年は組織の構築改変時に現れるテネイシンCに着目し、これまでの予備実験で冠状血管の形成領域にテネイシンCが強く発現していることを確認している。

テネイシンCがマウスの冠状動脈形成部位に発現することは学会発表されているが、テネイシンCの冠状動脈形成における発現の詳細な解析や機能解析については行われておらず、テネイシンCと冠状動脈形成との関連性にはまだまだ明らかにされていないことが多い。

2. 研究の目的

本研究は、①大動脈と肺動脈の組織分化、②原始心外膜から発生分化する組織・細胞、といった背景の中で起こる冠状動脈の形成におけるテネイシンCの発現と作用を検討する。

目的は、冠状血管形成における細胞分化と組織形成におけるテネイシンCの役割を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) ウズラ胚心臓試料の作製方法の検討

5～9日齢のウズラ胚から大動脈、肺動脈を含む形で心臓を採取する。テネイシンCの検出は一般的なパラホルムアルデヒド固定-パラフィンブロックでも可能である事はすでに確認しているが、対象蛋白によっては、固定や試料作製法の違いにより検出できない事もあるので、凍結標本の作製法、未固定標本の作製法、水溶性包埋樹脂（テクノビット8100、テクノビット9100 (Kulzer)）についても検討を行い、いずれの方法によっても、大動脈・肺動脈横断面が確保できるように方法を整備した。

(2) 各種薄切試料による免疫染色の可否の検討

テネイシンC (4F10) の検出は一般的なパ

ラホルムアルデヒド固定-パラフィンブロックでも可能である事はすでに確認している。

(1)で検討した各試料作製法別に免疫染色（蛍光抗体間接法）の可否を検討した。平滑筋に関連する蛋白に対する抗体の中で、平滑筋αアクチン(1A4、A2547 (Sigma))、カルポニン(CP-93、C6047 (Sigma))、トロポミオシン(TM311、T2780 (Sigma))、平滑筋ミオシン(hSM-V、M7786 (Sigma))、フィラミン(FIL-2、F1888 (Sigma))、βカテニン(15B8、C7207 (Sigma))、αアクチニン(A2543 (Sigma))、デスミン(D8281 (Sigma))について染色の可否を検討した結果、形態画像として検出可能である事を確認した。

(3) 冠状血管形成部位におけるテネイシンCの発現に関する検討

これまでの研究で、冠状動脈は動脈幹周囲に発生した毛細血管網から発生することが判明している (Ando et al., 2004)。そこで内皮細胞の分化、ならびに大動脈平滑筋、冠状動脈平滑筋の発生とテネイシンCの関性に注目して検討を行った。

5～9日胚 (ED5-9) 心臓の冠状動脈形成部位における連続切片を作製し、ウズラ内皮細胞の特異的抗体であるQH1抗体と平滑筋アクチン、テネイシンC抗体の鏡像対象連続標本を作製する。高感度CCDカメラで撮影後、画像の積層再構築を行い、冠状動脈の発生とテネイシンC分布の位置関係について検討した。

(4) 冠状血管における平滑筋分化の検討

同様の連続標本を準備し、平滑筋アクチン、カルポニン、トロポミオシン、平滑筋ミオシン、フィラミン、カテニン、アクチニン、デスミン等の平滑筋関連蛋白に対する抗体とQH1抗体の二重染色標本あるいは鏡像対象標本を作製した。これを用いて冠状動脈の位置を確認しながら、そこにおける平滑筋分化の状況を検討した。

(5) 冠状動脈形成ステージにおける大動脈と肺動脈の組織分化の差に関する検討

冠状動脈は動脈幹（大動脈と肺動脈幹）周囲に発生した原始血管網（原始心外膜由来）から発生し、選択的に大動脈に侵入する (Ando et al., 2004)。この過程で、冠状血管が選択的に大動脈に侵入し、肺動脈を避けるメカニズムは全く知られていない。申請者は、この一因として大動脈壁と肺動脈壁の組織発生の分化段階の差に注目している。

上記の平滑筋関連蛋白より把握できる平滑筋細胞の筋原線維形成について、大動脈壁と肺動脈壁での比較検討を行い、冠状動脈がなぜ肺動脈に侵入しないかについて検討した。

4. 研究成果

平成 20 年度はホルマリン固定標本によるウズラ胚の大動脈—肺動脈横断連続標本を用意して、冠状動脈の主幹部が形成される部位の大動脈壁と冠状動脈壁におけるテネイシンCの発現状態、そして大動脈壁中膜細胞の分化状態を平滑筋アクチンで追跡した。

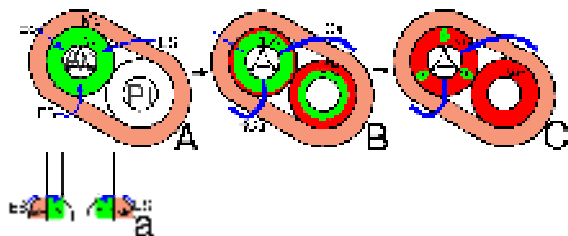
平成 21 年度は、冠状血管形成領域（大動脈および新生冠状動脈）における平滑筋特異蛋白、カルボニン、トロポミオシン、平滑筋ミオシンなど平滑筋細胞への分化段階で平滑筋アクチンに続いて発現するとされている蛋白について、冠状血管形成領域でのアクチンに追従する発現を確認した。

平成 22 年度は、平滑筋アクチン、平滑筋ミオシン、カルボニン等からフィラミン、トロポミオシン、カテニン、アクチニンなどに観察対象を拡げて、平滑筋分化の確証を得るとともに、固定標本では明らかにできなかった蛋白の発現状態について検討を行った。

併せて肺動脈壁におけるこれらの蛋白発現とも比較を行い、テネイシンCが、大動脈壁における平滑筋分化と新生冠状動脈中膜壁における平滑筋分化の両面から、冠状動脈の形成に寄与している事を明らかにした。

以上より得られた研究成果は下記の通り整理される。

冠状動脈形成時の大動脈と肺動脈の断面



A 内皮細胞索（初期の冠状動脈）形成時（ED6に相当）

a 大動脈縦断面

B 冠状動脈主幹部形成時（ED7）

C 血管中膜成熟時（ED8以降）

Ao, 大動脈幹; Pt, 肺動脈幹; ES, 内皮細胞索; Mc, 心筋; RCa, 右冠状動脈; LCa, 左冠状動脈。

※緑はテネイシンCの発現、赤は平滑筋アクチンの発現、青は新生冠状動脈、肌色は心筋を示す。

(1) 冠状動脈形成部位におけるテネイシンCの発現状況

蛍光抗体法による観察結果では、冠状動脈が形成される前（ED5（図には示されていない））からテネイシンCは大動脈と肺動脈の中膜壁に現れ、テネイシンCの発現する領域

（図Aの緑）に向けて冠状動脈の主幹部の形成される様がED5～ED9の観察を通じて明らかになった。形成された冠状動脈幹でも強いテネイシンCの発現が観察されており（図には示されていない）、大動脈壁と新生冠状動脈相互のテネイシンCを介した繋がりが明らかになった。

(2) 大動脈の冠状動脈形成部位における平滑筋分化の状況

平滑筋アクチンはすでに冠状動脈形成が始まる前の時期（ED5）には大動脈壁細胞に発現が認められたものの、内皮細胞索が形成される時期（図A（ED6））には一時的にほとんど認められなくなった。冠状動脈の主幹部が形成された後（図C（ED8以降））は特に発現が強まり、特徴的な線維状のパターンを示すようになった。

大動脈壁、新生冠状動脈、テネイシンCの三者を繋ぐものとして平滑筋分化が考えられるため、平滑筋アクチンに何らかの形で関連するカルボニン、平滑筋ミオシン、フィラミン、アクチニン、トロポミオシン、などについて発現の確認を行った結果、これらは少なからず平滑筋アクチンの変化に並行し、冠状動脈形成後に同様なパターンに成熟した。

（ただしカルボニンとデスミンは主幹部が完成した後に現れる点でさらに顕著な変化を示した。）

いずれにしても冠状動脈主幹部の形成を境にして大動脈中膜平滑筋細胞における平滑筋関連蛋白の発現が大きく変わっている事では共通しており、冠状動脈の形成と大動脈壁が平滑筋の成熟という点で協調している事が明らかになった。

(3) 冠状動脈の形成時期における大動脈と肺動脈の組織分化の差について

冠状動脈の形成期には、テネイシンCが大動脈（図AおよびaのAo）の動脈弁隆起—円錐部心室筋（Mc）間に環状に発現しており（図AおよびaのTNC+）、ここに冠状動脈の初期形態である内皮細胞索が、円錐部の心室筋（Mc）の上部を迂回して入り大動脈管腔に開口するが（図AおよびaのES）、この領域に隣接する肺動脈（Pt）壁では大動脈よりも早期に平滑筋への分化が進行していた（図B）。これら大動脈と肺動脈での分化の差は、平滑筋アクチンのみならず他の関連蛋白でも共通に観察され、冠状動脈の形成に付随する現象と考えられた。

ウズラの心外膜領域を移植したウズラ—ニワトリキメラを用いた実験結果では、ウズラ由来細胞が近位冠状動脈の内膜および中膜細胞の発生に寄与し、中膜細胞がテネイシンCを発現させている事が示されている。ま

た、テネイシンC存在下で前心外膜組織を培養した所、細胞は筋線維芽細胞や平滑筋細胞が示す表現型を示し、これに対するテネイシンC抗体の投与は平滑筋マーカーの発現を抑制している。

本研究で明らかにしたテネイシンCの発現と平滑筋分化の関わりからは、テネイシンCの一つの役割として、近位冠状動脈と大動脈壁の中膜平滑筋細胞の分化制御に関与して冠状動脈の形成に貢献している事が示唆された。

このようなテネイシンCについて、近年PDGFとの協調が、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンとPDGFR β のクロストークを通じて平滑筋細胞の遊走増殖を増強する事(Ishigaki et al. 2010)、内皮細胞由来のPDGF β と間葉由来のPDGFRが平滑筋細胞を血管中膜壁に誘導する事(Hellström et al., 1999; Van Den Akker et al., 2005)が報告されており、テネイシンCがインテグリンを介したPDGF/PDGFR β シグナルの調節によって平滑筋の分化発生を介助している可能性がある。

細胞外のテネイシンCはFN-IIIドメインでインテグリンと結合して細胞内シグナルを仲介する事が知られている(Jones and Jones 2000)。平滑筋の成熟時、FN-IIIドメインを有する細胞外基質はインテグリンを介して、インテグリン経由の細胞内シグナルの維持に役だっている可能性もあり、テネイシンCとインテグリン、PDGF/PDGFR β の三者間に存在すると思われる相互作用の解明が今後の課題となった。

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1件)

① Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. Differentiation 誌、査読有、81巻、2011、299-306

[学会発表] (計2件)

① K. Ando, T. Yamagishi, S. Miyagawa-Tomita, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, Y. Nakajima, Tenascin C Regulates Recruitment of Smooth Muscle Cells during Coronary Arterial Development. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, 2009年12月、San Diego

② 安藤克己、中島裕司、山岸敏之、中村裕昭、

ウズラ胚の大動脈中膜平滑筋細胞に関する免疫組織化学的研究、第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会、2011年3月、横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 克己 (ANDO KATSUMI)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授
研究者番号：00248783