

機関番号：32653

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591310

研究課題名 (和文) 冠動脈形成におけるテネイシン C の役割の検討

研究課題名 (英文) Research of the role of tenascin C in coronary development

研究代表者

富田 幸子 (TOMITA SACHIKO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40231451

研究成果の概要 (和文) : 心臓に酸素と栄養を供給する冠血管の形成には、心外膜前駆組織由来細胞が関与する。冠血管の大血管開口時と心外膜前駆組織由来細胞の上皮-間葉細胞転換時での細胞外基質糖タンパクテネイシン C の役割について検討した。テネイシン C は冠血管入口部と冠血管平滑筋、上皮-間葉細胞転換に特異的に発現し、筋線維芽細胞/平滑筋細胞の分化を促進することが示唆された。しかし、心外膜前駆組織由来細胞の遊走には寄与しなかった。

研究成果の概要 (英文) : Cells destined to form the coronary vasculature which supply oxygen and nutrients to the heart are thought to originate in the proepicardium. We examined an extracellular glycoprotein tenascin C in formation of the coronary stem and epithelial mesenchymal transformation of proepicardium-derived cells. Expression of tenascin C was seen in developing coronary stems and coronary smooth muscle cells. It is suggested that tenascin C facilitates the differentiation of proepicardium-derived cells into myofibroblast/ smooth muscle cells, however, not induce the invasion/migration of the cells in vitro system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：冠動脈 形態形成 テネイシン C 発生 血管形成

1. 研究開始当初の背景

心臓に酸素と栄養を供給する冠動脈は、発生初期の心外膜前駆組織由来細胞から形成されることが明らかとなって以来、様々な手法

で冠動脈形成に関与する分子が報告されている。我々はこれまでウズラニワトリ胚間で心外膜前駆組織と心臓神経堤をそれぞれ移植したキメラ胚、テネイシン C 遺伝子 LacZ

マウスを用いて、冠動脈形成とテネイシン C 発現の関連を検討してきた (業績: 日本小児循環器雑誌 2008; 24:20-28)。キメラ胚実験で、ウズラ心外膜前駆組織由来細胞が心筋に接着後、冠動脈を形成するまでの時間経過を明らかにした。心外膜前駆細胞は心筋接着後、上皮-間葉細胞転換を起こし心筋内に侵入して間質線維芽細胞、冠動脈内皮、冠動脈平滑筋を形成し、心内膜形成にまで関与していた。さらに、心臓神経堤移植キメラ胚で、心臓神経堤細胞の遊走を検討したところ、冠動脈開口部形成に心臓神経堤細胞が関与していることも見出した。テネイシン C は胚発生 (業績: Differentiation 2003; 71: 291-98)、創傷治癒 (業績: Am J Pathol; 67:71-80)、ガン転移などで一過性の特異的発現を示す細胞外マトリックスで、細胞遊走や上皮-間葉 / 間葉-上皮細胞転換時に関連して特異的に発現する糖タンパクである。テネイシン C は、特に冠動脈形成時の上皮-間葉細胞転換の時期と、冠動脈が大動脈基部に開口する時期にのみ特異的に発現していることを見出した。これはマウスでのテネイシン C 発現解析でも確認している。

2. 研究の目的

本研究では、テネイシン C 発現が認められた心外膜と心筋との間での上皮-間葉細胞転換の時期、及び冠動脈が大動脈基部に開口する時期の2つの時期に注目して、テネイシン C の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物に、ウズラニワトリ心外膜前駆組織移植キメラ胚、ウズラニワトリ心臓神経堤移植キメラ胚、テネイシン C 遺伝子欠損マウス、コンディショナルテネイシン C 遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを用いた。in vivo 及び in vitro で冠動脈形成の2つの時期、すなわち、心外膜前駆組織由来細胞の上皮-間葉細胞転換時と大動脈基部における冠動脈開口形成時に限定して、テネイシン C の役割を検討する。方法は組織切片および心臓全体の免疫染色、心外膜細胞培養、ウェスタンブロットまた、テネイシン C 遺伝子欠損マウス胚を用いた DNA array 解析を実施する。

4. 研究成果

組織および心臓全体の免疫染色の結果、テネイシン C は、冠動脈開口部周囲に発現が認められ、血管平滑筋 α -アクチンと共に局在化していた。テネイシン C は新生血管平滑筋細胞自体に発現し、その後、平滑筋周囲に発現が認められた。心外膜前駆組織を移植したウズラニワトリ心外膜前駆組織移植キメラ胚で、ウズラ心外膜前駆細胞由来細胞は近位冠

血管の内皮及び平滑筋を構成しており、平滑筋周囲にテネイシン C 発現が認められた。TNC を塗布した培養ディッシュで心外膜細胞を培養したところ、筋線維芽細胞または平滑筋細胞への分化が促進され、テネイシン C 濃度依存性であった。さらにテネイシン C 中和抗体添加により筋線維芽細胞/平滑筋細胞への分化が阻止された。また、心外膜前駆組織由来細胞の遊走能に対してテネイシン C は何の影響も与えなかった。テネイシン C 遺伝子欠損マウス胚を用いた DNA array 解析では、低下した遺伝子 (細胞接着関連; コラーゲン VI、インテグリン $\alpha 5$ など、転写因子関連; Toll-like receptor4、Jak3 など、細胞構築関連; Dystonin など)、及び増加した遺伝子 (細胞接着関連; Matrilin4、転写因子関連; Tbx3 など、細胞構築関連; Keratin14 など) を認めた。これらの因子とテネイシン C との関連性については今後検討する必要がある。

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 16 件)

- ① Okamoto H, Imanaka-Yoshida K. Matricellular proteins-New molecular targets to prevent heart failure. Cardiovasc. Ther. (in press). 査読有
- ② 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** (in press). 査読有
- ③ Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. Effects of transforming growth factor- $\beta 3$ and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. **Am J Vet Res** 72:194-202, 2011. 査読有
- ④ Nagaharu K, Zhang X, Yoshida T, Katoh, D, Hanamura, N, Kozuka Y, Ogawa T, Shiraishi T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells. **Am J Pathol** 178: 754-63, 2011. 査読有
- ⑤ Hanato T, Nakagawa M, Okamoto N, Nishijima S, Fujino H, Shimada M, Takeuchi Y, Imanaka-Yoshida K. Developmental defects of coronary

- vasculature in rat embryos administered bis-diamine. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol** 92: 10-6, 2011. 査読有
- ⑥ 今中恭子. 心筋炎. **病理と臨床** 29: 126-131, 2011. 査読無
- ⑦ Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Vincent SD, Kelly RG, Moon AM, Buckingham ME. Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. **Circ Res** 106:495-503, 2010. 査読有
- ⑧ Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin receptor Type A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field and later implicated in chamber myocardium formation. **Development** 137:3823- 3833, 2010. 査読有
- ⑨ Ishigaki T, Imanaka-Yoshida K., Shimojo N, Matsushima S, Taki W, Yoshida T. Tenascin-C enhances crosstalk signaling of integrin alphavbeta3/PDGFR-beta complex by SRC recruitment promoting PDGF-induced proliferation and migration in smooth muscle cells. **J Cell Physiol** 28, 2010 (Epub head of prints). 査読有
- ⑩ Taki J, Inaki A, Wakabayashi H, Imanaka-Yoshida K, Ogawa K, Hiroe M, Shiba K, Yoshida T, Kinuya S. Dynamic expression of tenascin-C after myocardial ischemia and reperfusion: assessment by 125I-anti-tenascin-C antibody imaging. **J Nucl Med** 51: 1116-22, 2010. 査読有
- ⑪ 今中恭子. テネイシン C の役割. **総合臨床** 59: 1725-1728, 2010. 査読無
- ⑫ Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Tsutsui H, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 298:H1072-1078, 2010. 査読有
- ⑬ 宮川-富田幸子、今中恭子. 冠血管の発生. **細胞** 14:6-9, 2009. 査読無
- ⑭ Shirai M, Imanaka-Yoshida K, Schneider MD, Schwartz RJ, Morisaki T. **Proc Natl Acad Sci USA** 106:18604-18609, 2009. 査読有
- ⑮ Eon Joo Park, Watanabe Y, Smyth G, Miyagawa-Tomita S, Meyers E, Klingensmith J, Camenisch T, Buckingham M, Moon AM. An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. **Development** 135:3599-3610, 2008. 査読有
- ⑯ 宮川-富田幸子、杉村洋子、中西敏雄、今中-吉田恭子. 心外膜原基由来細胞を制御するテネイシンCの検討. **日本小児循環器学会誌**, 24:20-28, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 35 件)
- ① 今中恭子. 心臓形態形成・変化における細胞外マトリックスの役割-心臓を創り直す手がかり. 心臓血管発生研究会、特別シンポジウム 2010年7月10日、千葉
- ② Imanaka-Yoshida K, Ando K, Yamagishi T, Yoshida T, Nakajima Y, Miyagawa-Tomita S. Tenascin-C may regulate recruitment of mural cells during coronary arterial development. Weinstein Cardiovascular Development Conference, May 20-22, 2010, Amsterdam, The Netherlands
- ③ Imanaka-Yoshida K. Tenascin C as a Target for Regulation of Cardiac Remodeling. Keystone Symposia: Cardiovascular Development and Repair. Feb 28-March 5, 2010, Keystone, Colorado, USA.
- ④ 浅井理恵子, 栗原由起子, 佐藤宗裕, 河村祐美子, 小久保博樹, 相賀裕美子, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the first heart field contributing to chamber myocardium. 第32回日本分子生物学会, 2009年12月9-12日, 神奈川
- ⑤ Ando K, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Toshida K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development. 49th Ann Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012, B391. 2009年12月5-9日, カリフォルニア、米国
- ⑥ 今中-吉田恭子, 原 万里, 浪方美幸, レオン バルディビニア サラ イサベル, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子. テネイシン C による心臓血管新生の制御. 第13回 Molecular Cardiovascular Conference. 2009年9月4-6日, 小樽
- ⑦ 渡辺 祐介, 宮川-富田幸子, Robert Kelly, Anne Moon, Margaret Buckingham 心臓円錐動脈幹と鰓弓動脈の発生における中胚葉性 fgf8 と fgf10 の機能解析. 第8回心臓血管発生研究会. 2009年7月24-25

- 日, 福島
- ⑧ 大林浩二, 宮川-富田幸子, 松本浩毅, 小山秀一, 廣瀬 昶. 僧帽弁閉鎖不全症発症における TGF β 3 および MMP3 の役割. 日本臨床獣医学会, 22. 2009 年 6 月 27-28 日, 埼玉
- ⑨ Asai R, Kurihara Y, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S. Endothelin typeA-receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium. 42nd Ann Meet Jpn Soc Dev Biol, May 28-31, 2009, Nigata
- ⑩ Vincent SD, Miyagawa-Tomita S, Buckingham M. The transcriptional repressor *prdm1/blimpl* is required within the second heart field for the morphogenesis of the distal outflow tract. Weinstein Cardiovascular Developmental Conference, May 7-9, 2009, California, USA
- ⑪ Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H (2009, May 7-9) TGF- β 3 and MMP3 contribute to pathogenesis of myxomatous mitral valve in canine. Weinstein Cardiovascular Developmental Conference, 148, May 7-9, 2009, California, USA
- ⑫ Asai R, Kurihara Y, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Uchijima Y, Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium. Weinstein Cardiovascular Developmental Conference. May 7-9, 2009, California, USA
- ⑬ Miyagawa-Tomita S, Sugimura H, Tomimatsu H, Yoshida T, Nakanishi T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C expression and neural crest are associated with formation of the coronary orifice. Weinstein Cardiovascular Developmental Conference. May 7-9, 2009, California, USA
- ⑭ 大林浩二, 宮川-富田幸子, 松本浩毅, 小山秀一, 廣瀬 昶. 僧帽弁閉鎖不全症発症における TGFbeta の役割. 第 147 回日本獣医学会, 2009 年 4 月 2-4 日, 栃木
- ⑮ Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Nakanishi T, Saga Y. *Hesr2* knockout mice show calcification in the aortic valve. 31st Mol Biol Soc Japan and 81st Jpn Biochem Soc Meeting, 2T22-1 (2P-1160) . Dec 9-12, 2008, Kobe, Japan
- ⑯ Asai R, Sato M, Kawamura Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara Y, Kurihara H. Relationship the cardiac conduction system and endthelinA receptor-LacZ/EGFP expression cells in early cardiac development. 31st Mol Biol Soc Japan and 81st Jpn Biochem Soc Meeting, 2P-0992. Dec 9-12, 2008, Kobe, Japan
- ⑰ Inagawa K, Kojima M, Nakajima K, Miyagawa-Tomita S, Tachibana M, Managai Y, Takeuchi T. Function of Histon H3-K9 methylase, G9 and GLP in cardiac development. 31st Mol Biol Soc Japan and 81st Jpn Biochem Soc Meeting, 4P-0841. Dec 9-12, 2008, Kobe, Japan
- ⑱ 原 万里, 浪方美幸, ポンセ デ レオン バルディビア サラ イサベル, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子, 今中-吉田恭子. 心臓形態形成におけるテネイシン C の役割. 第30回心筋生検研究会、p-30. 2008年11月28-29, 三重
- ⑲ 小久保博樹, 宮川-富田幸子, 中畷八隅, 中西敏雄, 相賀裕美子. *Hesr2*欠損マウスは石灰化大動脈弁を示す. 第30回心筋生検研究会、p-11. 2008年11月28-29, 三重
- ⑳ 宮川-富田幸子, 杉村洋子, 富松宏文, 中西敏雄. 鳥類モデルを用いた冠動脈血管新生の解析. 第30回心筋生検研究会、シンポジウム5、(2008年11月21-22日) 三重
- ㉑ Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Park EJ, Kelly R, Moon A, Buckingham M. Role of Fgf8 and Fgf10 during second heart field and pharyngeal arch artery development. *Frontiers in Developmental Biology*, Sep 13-17, 2008, Giens, France
- ㉒ Asai R, Sato M, Kawamura Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara Y, Kurihara H. Relationship the cardiac conduction sytem and endthelin A receptor-LacZ/EGFP expression cells in early cardiac development. *Frontiers in Developmental Biology*, Sep 13-17, 2008, Giens, France
- ㉓ 小久保博樹, 宮川-富田幸子, 中畷八隅, 中西敏雄, 相賀裕美子. *hesr2* ノックアウトマウスに認められる大動脈弁石灰化. 第7回心臓血管発生研究会、12. 2008年7月4-5日, 福島
- ㉔ 大林浩二, 宮川-富田幸子 (2008年7月4-5日) TGF-beta の僧帽弁編成における役割. 第7回心臓血管発生研究会、11. 2008年7月4-5日, 福島
- ㉕ 原 万里, 波方美幸, Ponce de Leon BSI, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子, 今中-吉田恭子. 心臓形態形成におけるテネイシン C の役割. 第7回心臓血管発生研究

- 会、10. 2008年7月4-5日、福島
- ②⑥浅井理恵子、佐藤崇裕、河村悠美子、宮川-富田幸子、栗原由紀子、栗原裕基. 心臓発生初期における endthelinA 受容体-LacZ/EGFP 発現細胞と刺激伝導系の関連. 第7回心臓血管発生研究会、5. 2008年7月4-5日福島
- ②⑦宮川-富田幸子 (2008年7月4-5日) ワークショップ、心臓刺激伝導系の発生 -最近のトピックス-. 第7回心臓血管発生研究会、福島
- ②⑧Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Saga Y. *Hesr2* disrupted mice develop dysfunction of the semilunar valve with age. 44th Ann Meeting Jpn Soc Ped, I-D-19. July 2-4, 2008, Fukushima, Japan
- ②⑨宮川-富田幸子. 冠動脈開口部形成には心臓神経堤細胞が関与する. シンポジウム“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、(2008年7月2-4日)福島
- ③⑩Park EJ, Watanabe Y, Smyth G, Miyagawa-Tomita S, Meyers EN, Klingensmith J, Camenisch T, Buckingham M, Moon AM. Fgf autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. Weinstein Cardiovascular Development Conference, 9, May 15-17, 2008. Houston, Texas, USA
- ③⑪Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Park EJ, Kelly R, Moon A, Buckingham M. Role of Fgf8 and Fgf10 during second heart field and pharyngeal arch artery development. Weinstein Cardiovascular Development Conference, 180, May 15-17, 2008. Houston, Texas, USA
- ③⑫Imanaka-Yoshida K, Hara M, Namikata M, Yoshida T, Schwartz RJ, Miyagawa-Tomita S. Tenascin-C may play a significant role in maturation of coronary arteries in mouse. Weinstein Cardiovascular Development Conference, 97, May 15-17, 2008. Houston, Texas, USA
- ③⑬Miyagawa-Tomita S, Sugimura H, Nakanishi Toshio, Imanaka-Yoshida K. Neural crest and proepicardial cells contribute to formation of the coronary orifice with Tenascin-C. Weinstein Cardiovascular Development Conference, 148, May 15-17, 2008. Houston, Texas, USA
- ③⑭Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Robert GK, Moon A, Buckingham M. Role of Fgf signaling during anterior heart field and pharyngeal arch artery development. HeartRepair 2nd Annual Meeting, April 16-18, 2008, Madrid, Spain

- ③⑮吉岡朋子、宮川-富田幸子 (2008年4月18日) 鶏胚の心臓流出路におけるアポトーシスの検討。第1回Tokyo Heart Development Club. 東京女子医科大学、東京

〔図書〕(計3件)

- ① 竹内 純、宮川-富田幸子、笹岡陽介、小柴和子. 心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子. pp.1-16、Annual Review 循環器 2011、山口 徹他編集、中外医学社(総ページ365)
- ② 今中恭子. 細胞外マトリックス調節因子. pp.36-43、Annual Review 循環器 2011、山口 徹他編集、中外医学社(総ページ365)
- ③ Clinical Veterinary Advisor -Dogs and Cats. Mosby (Elsevier) interzoo 発行. Etienne Cote 監修、長谷川篤彦監訳. 分担翻訳, 1851pages. 2010年. クリニカルベテリナリーアドバイザー -犬と猫の診療指針- (分担翻訳). 総監修 Etienne Cote(2007) Mosby Elsevier Inc., 監訳長谷川篤彦、2010年、interzoo, 1851pages

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 幸子 (TOMITA SACHIKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：40231451

(2) 研究分担者

吉田 恭子 (YOSHIDA KYOKO)
三重大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00242967