

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年～ 2011 年

課題番号：21590205

研究課題名（和文） 心臓房室弁形成における BMP と NOTCH シグナルの役割に関する研究

研究課題名（英文） Research of the role of BNP and NOTCH signals for cardiac atrioventricular valve formation

研究代表者

稲井 慶（INAI KEI）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80318063

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、上皮-間葉転換後の弁成熟の過程における BMP と Notch シグナルの役割をあきらかにすることである。我々は、BMP が骨形成の lineage にクッション組織を誘導するのに対して Notch が抑制的に働き、弁の骨化や石灰化を防いで、正常な房室弁形成に寄与しているとの仮説を立てて、研究を行った。その結果、以下の 3 点が明らかになった。1) BMP2 は心臓房室弁形成の過程で、Notch シグナルを増強させる。2) BMP2 はヒアルロン酸の発現を増加させることで、細胞遊走をコントロールしており、その機序には PI3K シグナルが関与する。3) 心臓房室弁形成において、BMP がもつ骨化作用を Notch シグナルが抑制することで、弁組織の成熟に関与している。

研究成果の概要（英文）：

Formation of the endocardial cushion mesenchyme in the atrioventricular (AV) canal is the essential morphogenetic step in cardiac valvuloseptal morphogenesis. Numerous studies demonstrated that BMP-2 signaling promotes mesenchymal cells differentiation into pre-valvular fibroblasts.

In this study, we showed that BMP-2 induces expression of Notch1 and Notch pathway intermediates in the endocardial cushion mesenchymal cells (ECMC) aggregate culture. We also demonstrated that BMP-2 induces the valvulogenic phenotype including hyaluronic acid expression and cellular migration and inhibits expression of alternative mesodermal lineage markers in chick ECMC cultures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学、心臓発生、房室弁、NOTCH シグナル

1. 研究開始当初の背景

心臓弁中隔形成は心臓発生の過程における 4 心室形成の極めて重要なステップである。

弁および中隔の異常は先天性心疾患の中で最も頻度が高く、臨床的にも重要である。房室部と流出路の心内皮細胞は上皮-間葉転

換を介して、弁と膜様中隔の原基となる。間葉細胞に転換した内皮細胞は細胞外基質（心ゼリーと呼ばれる）の中を移動し、心クッション組織という間葉化された突起を形成していくのである。上皮-間葉転換後、クッション組織は間葉細胞によって肥厚し、線維化が進行して弁として成熟していく。この過程は主に以下の3つのステップからなっている。1) 心ゼリー中への間葉細胞の移動 (migration) 2) 間葉細胞の増殖 (proliferation) 3) クッションの成熟に必要な細胞外基質タンパクなどの分子の発現。しかし、これらの過程の分子生物学的機構はいまだ十分に明らかにはされていない。BMP2 は TGF- β スーパーファミリーに属する蛋白質で、上皮-間葉転換に必須であることが知られている。我々は、チックにおける BMP2 の分布様式から、上皮-間葉転換後の弁形成にも重要な役割を担っていると考え、独自に開発した細胞培養アッセイと RCAS ウイルスを用いた BMP レセプターの発現調節による実験で、BMP2 が間葉細胞の心ゼリー内の migration を促進するとともに、弁成熟に重要とされる periostin, HAS, Versican といった細胞外基質タンパクの発現をも促進していることを明らかにした。これは、BMP2 が上皮-間葉転換後の弁形成にも autocrine 的に働いていることを示していた。

一方、Notch シグナルは房室弁形成に関与しており、その下流転写抑制因子 *hesr1* と *hesr2* を介してクッションにおける上皮-間葉転換にはたらいっていることが報告されている。さらに、NOTCH1 の変異がヒトの大動脈弁石灰化を引き起こすことが報告されており、このようなことから、Notch は上皮-間葉転換後の弁成熟にも何らかの役割を持つ可能性が考えられる。興味深い点は、指骨形成において、その骨形成部位に BMP が強く発現しているにもかかわらず Notch の発現がない一方、指間部には Notch の発現がみられることである。すなわち、Notch は BMP が本来持つ骨形成の働きに抑制的に働いている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓房室弁形成過程における、BMP と NOTCH シグナルの役割を解明することにある。特に上皮-間葉転換以後の弁成熟の過程での両者の役割を 1) In Situ hybridization による同レセプターの局在性の同定 2) 独自に開発した細胞培養アッセイ系で、BMP, NOTCH やその阻害薬を用いて、間葉細胞の増殖、遊走などの成熟現象の観察 3) NOTCH およびその阻害薬の BMP の骨形成促進作用に対する影響を明らかにするためのアルカリフォスファターゼ測定、を行って明らかにする。これらの解明によって、心臓弁

の形成過程の分子生物学的機構が明らかになり、心臓弁の再生医療の発展に寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

本研究は chick を用いて行った。胎仔のステージングは Hamburger and Hamilton (HH) のクライテリアを用いた。本研究では上皮-間葉転換後の弁成熟に注目するため HH 29 の胎仔を使用した。はじめにあたって、BMP と Notch のシグナルが弁成熟の過程において心クッションに存在しているかをあきらかにしなければならない。BMP2 についてはその詳細な発現の局所性と時系列があきらかになっているが、BMP receptor と Notch に関しては十分な情報がない。そこで、HH ステージ 29 の心臓における Type I BMP receptor と Notch の発現をあきらかにするため以下の実験を行った。HH 29 のクッション組織と心筋を切り出し、そのおのおのについて *BMPR-1A*, *BMPR-1B* and *ALK2* に対して RT-PCR を施行した。HH ステージ 29 のクッション組織および心筋から、RNA STAT-60 (Tel-Test Inc) を用いて total RNA を抽出し、iScript cDNA synthesis kit (BIO RAD) によって cDNA を作成した。PCR primer は以下の通りである。*BMPR-1A* (**L49204**, forward, 5' -CTGAGAGTTGAGCGATTG-3', reverse, 5' -CAGCCAGAAGCAAGTGTGG-3'), *BMPR-1B* (**D13432**, forward, 5' -GGAGAGCAGAAAAGAAGATAGTGAGG-3', reverse, 5' -TGGTGTGGAATAGGAGTGTC-3') and *ALK2* (**U38622**, forward, 5' -CTGTGTGGGGTCACTG-3', reverse, 5' -TGGAAGCAGCCTTTCTGG-3'). これらのプライマーと Taq polymerase を用いて、iCycler iQ Real-Time PCR machine (BIO-RAD) で PCR を行う。(30 cycles of 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 2 min.) コントロールとして 逆転写のステップを省略したサンプルを使用。

Whole-mount In Situ Hybridization は以下のように行った。HH stage-29 chick heart RNA を RNeasy Column (Qiagen) で抽出し cDNA を作製。作製した cDNA から以下のシーケンスを増幅させて Whole-mount In Situ Hybridization のプローブとして使用する。

BMPR-1A (**L49204**; nt 351-640), *BMPR-1B* (**D13432**; nt 387-720) and *ALK2* (**U38622**; nt 21-299)

Section ISH には、浸透と検出力を考えて、前者より長いシーケンスを使用する *BMPR-1A* (**L49204**; nt 366-996) and *BMPR-1B* (**D13432**, nt 387-838)。

次に、クッション組織から抽出した間葉細胞の培養アッセイを用いて、BMP2 と NOTCH シグ

ナルの相互関係について検討するために以下の実験を行った。まず、HH29のクッション組織を周辺の心筋を注意深く取り除きながら切り出し、トリプシンによって細胞を分離した後、20 μ lのhanging dropをwith ITS (5 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin and 5 ng/ml selenium, BD Sciences) と抗生剤 (100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Invitrogen) を加えたserum-freeのmedium 199で作製し、培養用シャーレのふたを使用して一晩培養した。細胞数はあらかじめカウントし、20 μ lのHanging drop一個に細胞40,000とした。翌日、一塊となった間葉細胞をコラーゲンジェル (1mg/ml, rat tail tendon, BD Sciences) 上に置き、1% chick serum (Sigma), ITSと抗生剤を加えたmedium 199とともに2時間培養。ジェル上に細胞がしっかりアタッチしたのを確認して、recombinant human BMP-2 (Genetics Institute, Cambridge) を濃度 200 ng/mlで、recombinant human noggin (BMP-2の antagonist、Regeneron Pharmaceuticals) を濃度500 ng/mlで、培養medium内に加え、72時間培養する。この方法で、Notch1、その下流転写因子であるhey1の発現を定量的RT-PCR法および蛍光抗体染色法で観察することで、BMP2がNotchシグナルに及ぼす影響を検討する。

同様の培養系で、BMP-2 およびその阻害薬Nogginを加えて培養し、ヒアルロン酸の発現を免疫染色法と RT-PCR を用いて検討した。ヒアルロン酸を阻害する oligomer およびPI3K シグナルを抑制する Wortmannin を加えて培養し、それぞれの細胞遊走に対する効果を評価した。この培養アッセイは3Dアッセイであり、共焦点顕微鏡を用いて観察することで、クッション間葉細胞の proliferation と migration を定量評価できる。すなわち、実際の細胞数をカウントするとともに、ゲル内のどの深さまで細胞が移動しているかを定量評価した。弁成熟の過程において、この細胞の migration は重要な現象であり、われわれはすでに BMP2 が migration を促進することを報告している。

最後に、NotchのantagonistであるDAPTを用いて、BMPと関連して骨化や石灰化を誘導する転写因子であるRunx2の発現を定量的RT-PCRで測定し、骨化の指標としてアルカリフォスファターゼを比色法で測定した。

4. 研究成果

Whole-mount In Situ Hybridization では、HH29の心臓クッション原基に BMPR およびNotchの発現が確認された。HHstage29の心臓房室弁の間葉細胞の培養では、BNPを加えた細胞においてNotchの発現がコントロールの約4倍に増加し、Nogginを加えた細胞ではNotchの発現が0.3倍まで

減少していた。さらに、BNPを加えた細胞ではHey1の発現は約10倍に増加し、Nogginを加えた細胞ではHey1が0.2倍まで減少していた。また、Hey1はNotchアンタゴニストであるDAPTによってその発現が抑制されることも確認した。

これらの検討から、BMPは心臓房室弁形成の過程で、Notchシグナルを増強させる働きをしていることが示唆された。

BMP-2は房室弁において、間葉細胞の遊走に深く関与して、その形態形成を担っている。その効果はNOTCHシグナルを介している可能性が高いと考え、間葉細胞の遊走を促進するメカニズムを明らかにするために、心内膜床の間葉細胞をコラーゲンジェル上で培養し、細胞遊走の定量的観察を行った。同様の培養系で、BMP-2およびその阻害薬Nogginを加えて培養し、ヒアルロン酸の発現を免疫染色法とRT-PCRを用いて検討した。最後にヒアルロン酸を阻害する oligomer およびPI3Kシグナルを抑制するWortmanninを加えて培養し、それぞれの細胞遊走に対する効果を評価した。その結果、BMP-2は容量依存性にヒアルロン酸の発現を増強させた。ヒアルロン酸は心臓房室弁における細胞遊走を促進するが、その効果は阻害薬である oligomer で減弱した。BMP-2によって促進された細胞遊走はWortmanninによって阻害された。

以上より、BMP-2はヒアルロン酸の発現を増加させることで、細胞遊走をコントロールしており、その機序にはPI3Kシグナルが関与することが示唆された。

最後に、BMP2によって本来もたらされる骨化の過程が、Notchシグナルによって抑制されているのではないかという仮説を立てて以下の実験を行った。鶏胎仔の心内膜床間葉細胞を72時間培養し、その細胞集団内のアルカリフォスファターゼを測定することで、細胞内のmineralizationの程度を判定した。M199のみでこの培養を行った場合と、BMP200 μ g/ml加えた場合、BMP200 μ g/mlとDAPTを加えた場合、さらにDAPTのみで培養した場合で、mineralizationの評価を行った。その結果、BMPのみの場合でもM199のみの場合に比べてALP値は軽度上昇していたが、DAPTを加えることで、さらに高値となることが判明した。さらにRunX2の発現をRT-PCRで定量評価した結果も同様な傾向が認められた。

これらの結果は、心臓房室弁形成において、BMPがもつ骨化作用をNotchシグナルが抑制し、弁組織の形態形成やmaturationに重要な働きをしていることを示唆すると考えられた。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 稲井 慶、ヒアルロン酸はPI3Kシグナルを介して心房室弁形成における細胞遊走を促進する、第9回心臓血管発生研究会、2010.7.10、東京

[図書] (計1件)

- ① Kei Inai, Springer, Florian Lang editor: Encyclopedia of molecular mechanisms of disease 2009. P. 222-p. 223

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲井 慶 (INAI KEI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80318063