

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25年06月20日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22590816

研究課題名（和文） 多能性幹細胞を用いた心筋組織の人工的構築と再生治療法の開発

研究課題名（英文） The role of Crossveinless-2 in regulation of cardiac development

研究代表者 原田 光一郎 (HARADA KOIHCIRO)
独立行政法人 国立循環器病研究センター 病院・医長

研究者番号：30402902

研究成果の概要（和文）：

心筋細胞の発生は、発生初期の胚に存在する心臓発生領域において多段階的で複雑な遺伝子発現に基づいて分化が進行することが知られている。周囲の内/外胚葉から分泌される細胞増殖因子の刺激により間葉系細胞において転写因子活性を生じる。しかし幹細胞が心臓中胚葉発生プロセスに入る分子機構は不明である。

我々は心臓中胚葉分化を選択的に誘導し決定する機構を「心臓中胚葉発生の初期プライミング因子」と名づけて探索を開始し、現在までに合計6個の初期プライミング因子の単離同定に成功した。現在 Crossveinless-2 (Cv2) に注目し解析を進めている。

マウス胚を用いて whole mount in situ hybridization 法により Cv2 と他の分化関連因子の発現パターンとの比較を行っている。Cv2 と同様の生物学的特徴をもつタンパク質に Noggin があげられる。Cv2 と Noggin の in vivo での発生時期における発現局在様式に関して検討したが、Cv2 のみが発生初期過程の心臓発生領域に発現していた。mRNA レベルでの検討も行ったが、先の結果と同様に、Noggin の発現は心臓発生領域には発現を得られなかった。Cv2 は発生初期過程の心臓発生領域に発現し、幹細胞の心臓中胚葉誘導と心筋分化を促進するメインプレイヤーである可能性が示された。一方、Cv2 遺伝子変異マウスでは仔の成長遅延が示されている。Cv2-Blue mice の初期胚モデルを確立、変異形式による胚発生早期への影響（心血管系への影響）を観察。このモデルを用いて初期心臓に CV2 が発現する事を発見した（投稿準備中）。詳細な発現経過の解析、発現細胞種類の同定進めると共に、心臓形成時期での他の因子との相互関係を引き続き探索している。

研究成果の概要（英文）：

Heart development during embryogenesis is a multistep process that involves cardiac induction of mesodermal progenitor cells into the cardiac lineage. Development produces transcription factor activity in a mesenchymal cells by the stimulation of secreted cell growth factors from endoderm and/or ectoderm in the neighborhoods. Although the genetic blueprint for cardiac differentiation and development is rapidly being elucidated, there

is still uncertainty about cardiac-inducing factors which might be involved in cardiogenic induction and specification.

What is the molecular mechanism that a stem cell is in the heart mesoderm process? We named mechanism to induce heart mesoderm differentiation selectively, and to be decided "an initial priming factor in the heart mesoderm development" and started a search and succeeded in the identification of six initial priming factors. We focus and pay attention to Crossveinless-2 (Cv2), and push forward analysis now.

We performed the comparison expression patterns between Cv2 and Noggin (a differentiation-related factor) by using the whole mount in situ hybridization method of a mouse embryo. Noggin is a factor with a biological characteristic like Cv2. Only Cv2 developed in the heart outbreak domain of the process in early period of embryos. Cv2 would be the main player which promotes heart mesoderm induction and the myocardium differentiation of stem cells.

On the other hand, it is shown that a growth delay of mouse with the Cv2 gene variation. We established an initial embryo model of Cv2-Blue mice and observed the influence on early heart stage of embryos (we focused the influence on cardiovascular system). CV2 expressions found to be in the developing initial heart using this model. We push forward analysis of detailed expression progress, the identification of specific lineages and search for the mutual relations with other factors at the heart development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分化、発生、幹細胞、再生医学

1. 研究開始当初の背景

我が国における循環器疾患、特に慢性心不全の有病率は、生活習慣の欧米化に伴う虚血性心疾患の増加というベースに加え、未曾有の人口高齢化の加速により確実に増加している。最近の重症心不全治療法の進歩は著しいが、最終的かつ究極の治療方法である心臓

移植は国内ドナー数の絶対的不足という難問題を抱え、しかもこれに替わる治療方法が無いのが現状である。それが故に近年重症心不全に対する有効な治療方法の開発が囑望されてきたが、臓器器官発生学の臨床応用はそれを具現化する方法の1つである。心筋細胞発生の分子機構、特にその中心である特

異的転写因子（マスター遺伝子）や細胞増殖因子（シグナル分子）に関しては未だ不明な点が多い。心筋細胞の発生は、発生初期の胚に存在する心臓発生領域において多段階的で複雑な遺伝子発現に基づいて分化が進行することが知られている。周囲の内/外胚葉から分泌される細胞増殖因子の刺激により間葉系細胞において転写因子活性を生じる。しかし幹細胞が心臓中胚葉発生プロセスに入る分子機構は不明である。

2. 研究の目的

我々は発生過程の極めて初期に形成される心臓中胚葉の運命決定機構のターゲットとして既に「初期プライミング因子」を6個同定し、現在その一部因子の発生初期～心筋分化過程における役割を明らかにした（JBC 2008 原田業績）。「初期プライミング因子」の初期中胚葉誘導における時間的空間的役割と他因子との相互作用を明らかにする。人工的な心臓構成と再生治療法の開発の糸口を探る。

3. 研究の方法

発生初期における発現局在様式について、マウス胚を用いて whole mount in situ hybridization 法を用いて発現を確認した。受精より0.5日齢～15.5日齢のマウス胚を採集。各週齢胚における予定心臓領域を中心にその発現を確認した。マウス成体での局在については、全身より抽出したメッセンジャーRNAを用いたRT-PCRにて実験を行う。Cv2遺伝子変異マウスではヘテロ体を用いて初期胚における発現と共に、発生初期および発育遅延について検証した。

4. 研究成果

マウス胚を用いて whole mount in situ hybridization 法によりCv2と他の分化関連因子の発現パターンとの比較を行っている。Cv2と同様の生物学的特徴をもつタンパク質にNogginがあげられる。Cv2とNogginのin vivoでの発生時期における発現局在様式に関して検討したが、Cv2のみが発生初期過程の心臓発生領域に発現していた。mRNAレベルでの検討も行ったが、先の結果と同様に、Nogginの発現は心臓発生領域には発現を得られなかった。Cv2は発生初期過程の心臓発生領域に発現し、幹細胞の心臓中胚葉誘導と心筋分化を促進するメインプレイヤーである可能性が示された。

一方、Cv2遺伝子変異マウスでは仔の成長遅延が示されている。Cv2-Blue miceの初期胚モデルを確立、変異形式による胚発生早期への影響（心血管系への影響）を観察。このモデルを用いて初期心臓にCv2が発現する事を発見した（図1、投稿準備中）。

これらより得られた知見を基にして、詳細な発現経過の解析、発現細胞種類の同定進めると共に、心臓形成時期での他の因子との相互関係を引き続き探索している。

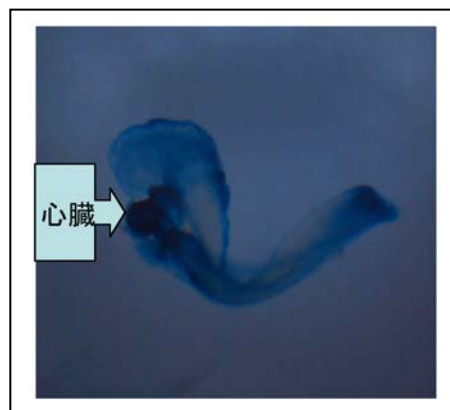


図1：Cv2-Blue miceの初期胚モデルにおけるCv2の発現

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 0件）

〔学会発表〕（計 0件）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 光一郎
(HARADA KOICHIRO)

独立行政法人 国立循環器病研究センター

病院・医長
研究者番号：30402902

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

望月 直樹
(MOCHIZUKI NAOKI)

独立行政法人 国立循環器病研究センター

研究所・部長
研究者番号：30311426