

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 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591181

研究課題名（和文） 先天性心疾患の責任遺伝子の同定と心臓幹細胞を用いた機能解析

研究課題名（英文） Exploring mutated genes and its function in congenital heart disease

研究代表者

檜垣 高史 (Higaki Takashi)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60253308

研究成果の概要（和文）：

先天性心疾患について、その発症に関与する遺伝子異常を同定し、疾患の病態を明らかにすることを目的として研究を行った。心臓手術時に得られた先天性心疾患の患者の心臓組織を用いて心臓形成に関わる遺伝子の変異の有無を直接シーケンス法で解析したが有意な遺伝子変異は同定できなかった。心臓組織を採取できない患者では、FLK1 陽性を指標として末梢血中の血管内皮前駆細胞を採取して解析を行った。FLK1 陽性細胞を用いた解析は先天性心疾患の原因となる獲得性の遺伝子変異の同定・機能解析に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To identify the gene mutations responsible for the cardiac malformations in congenital heart diseases, pieces of cardiac tissue excised from patients during cardiac surgery were analyzed for the presence of mutations in genes involved in cardiac development. Direct sequencing analysis of several candidate genes such as TBX1 and ISL1 failed to discover any disease-causing mutations in all the genes examined so far. Circulating FLK1-positive cells in peripheral blood, which are mobilized from the bone marrow after endothelial cell injury, such as catheter intervention, could be a substitute for cardiac cells because both cells originate from the mesodermal FLK1-positive cells during fetal development. Mutational analyses with peripheral FLK1-positive cells of patients whose cardiac tissue are not obtainable are now ongoing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器学

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は出生約100人に1人の頻度

で発症する。一部の先天奇形や染色体異常症候群で心奇形を高頻度に合併することから、

先天性心疾患の発症には遺伝子異常の関与が強く疑われる。しかし多くの症例は家族歴を有しない孤発例であることから、胎児が有する遺伝子異常の他、胎内での環境要因(母体の化学物質への暴露等)が発症に関与すると考えられる。

先天性心奇形を有する胎児の遺伝子異常に関しては、一部の症例で心臓形成に必要な転写因子である GATA4 や NKX2-5、TBX5 などの遺伝子の変異が報告されているが、その頻度は 10%程度にしか過ぎない。またこれらの遺伝子変異は末梢血を用いた解析により見いだされたものであり、胚細胞変異であると考えられる。

一方、妊娠前から妊娠初期の葉酸欠乏が先天性心疾患のリスクを増加させること、葉酸代謝酵素である MTHFR 遺伝子の母体の活性低下型多型が先天性心疾患の発症と関連することが報告されている。したがって、葉酸欠乏とそれに基づく核酸合成障害により、胎生早期に胎児の一部の細胞に生じた獲得性の遺伝子変異(体細胞変異)が先天性心疾患の原因となる可能性も考えられる。

最近、心組織に存在する幹細胞(cardiac stem cell)が再生医療の観点から注目されている。マウスおよびヒトの心組織より同定された幹細胞は c-kit 陽性、ないしは side population(SP)分画に属する細胞であり、心筋細胞、心血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への分化能を有する。一方 ES 細胞などの未分化胚細胞を用いた検討では、FLK1(KDR)陽性細胞が上記 3 系統の細胞に分化しうる心幹細胞としての機能を有していることが証明されている。胎生早期にこの心幹細胞に遺伝子異常が生じると先天性心疾患の病因になりうると考えられる。

FLK1 陽性細胞は心血管系のみではなく、造血系を構築する幹細胞でもある。実際、出生後は FLK1 陽性細胞は骨髄に存在し、血管損傷などの侵襲時に骨髄から動員されて末梢血中に出現、血管損傷部の血管内皮細胞の再生に寄与することが報告されている。心臓形成に重要な GATA4 や NKX2-5 などの転写因子の異常が造血系の発生分化にも何らかの影響を及ぼす場合、末梢血中の成熟した血液細胞は正常な FLK1 陽性細胞に起源を持つ造血幹細胞から発生したものであり、遺伝子異常を持たない可能性が高い。この場合でも、心幹細胞を含む FLK1 陽性細胞に胎生早期に生じた遺伝子変異は、その細胞と同じ起源を有する骨髄中の FLK1 陽性細胞の一部に保持されている可能性があり、この細胞群を分離して解析することができれば、未同定の先天性心疾患の(獲得性)遺伝子変異を明らかにできる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、先天性心疾患において、胚細胞変異ではない獲得性の変異の存在を証明することを目的とし、これにより先天性心疾患の発症メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 先天性心疾患症例の病的な心臓組織の採取と収集

根治手術が必要な先天性心疾患の手術時に、必要な同意を得た上で切除された心臓組織の一部を本研究用に利用し、DNA や RNA を抽出するとともに一部を凍結保存した。

(2) 末梢血よりの FLK1 陽性細胞の分離

心臓組織の採取が困難な症例では、末梢血を採取し単核球分画を分離した後に、FLK1 とその他の血管内皮細胞特異的な細胞表面マーカーを用いて FLK1 陽性細胞(あるいは血管内皮前駆細胞)を FACS で分離し、回収した。通常の非侵襲時には末梢血中を循環する FLK1 陽性細胞はごく少数であり、十分な細胞数が回収できない可能性が考えられたので、主に心臓カテーテル検査後や手術後などの血管侵襲が加えられた後の採取検体で FLK1 陽性細胞の分離を試みた。

(3) 病的な心臓組織、分離した FLK1 陽性細胞を用いた遺伝子解析

得られた心臓組織、末梢血より分離・回収された FLK1 陽性細胞から DNA、RNA を抽出し、心臓形成に関与する各遺伝子の遺伝子変異の有無を PCR、シーケンス解析により検討した。現在までに末梢血を用いた解析で変異が報告されている遺伝子(GATA4、NKX2-5、TBX5 等)に加えて、心血管形成に関与する遺伝子(ETV6 等)や、遺伝子を欠失したマウスモデル等で心奇形を表現型として有する遺伝子(PTPN11、TBX1 等)の遺伝子などを対象とし、その発現を確認するとともに、全遺伝子領域を PCR で増幅し、塩基配列を確認した。

また遺伝子領域の欠失、転座などの異常の有無を検討するために、TBX1 等の各候補遺伝子の全領域をカバーする FISH プローブを作製(BAC クローン)し、間期核 FISH 法にて検討した。また FISH 法では検出できない微小欠失(一部のエクソン欠失など)の有無に関しては、抽出した DNA を用いて、各遺伝子に関して MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)法を行い遺伝子内の微小領域欠失の有無に関して検討した。

4. 研究成果

(1) 先天性心疾患症例の病的な心臓組織の採取と収集

研究期間内に 26 例の心臓組織を集積し得た。

(2) 末梢血よりの FLK1 陽性細胞の分離

心臓組織の採取が困難な症例では、心臓カ

テーテル検査後に末梢血を採取し、FLK1 陽性の血管内皮前駆細胞の分離を試みた(図1)。分離した末梢血単核球分画を受容体型チロシンキナーゼである FLK1 のリガンドである VEGF の存在下で短期間培養することにより、FLK1 陽性細胞の維持・増幅が可能となり、単核球分画から直接 FLK1 陽性細胞を分離する場合と比較して、FLK1 陽性細胞の回収率は改善した(図2)。

図1 末梢血よりのFLK1陽性細胞の増幅・分離

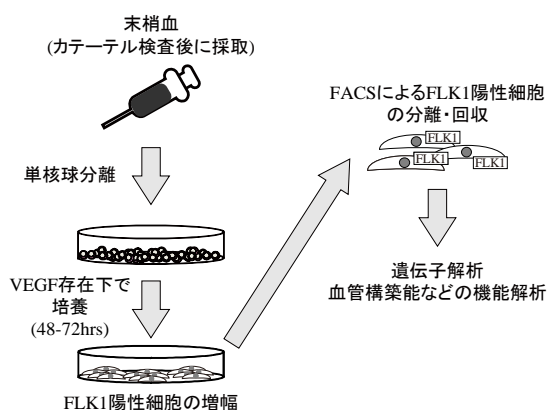
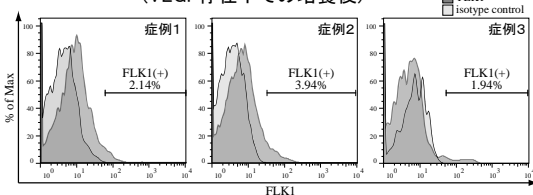


図2 末梢血FLK1陽性細胞のFACS解析 (VEGF存在下での培養後)



(3) 病的な心臓組織、分離した FLK1 陽性細胞を用いた遺伝子解析

採集した心臓組織から DNA を抽出し、まず直接シーケンス法で候補遺伝子の全エクソンを解析した。解析し得た範囲では、心臓組織に有意な遺伝子変異は認められなかった。また候補遺伝子領域の欠失などのコピー数の異常に関して、心奇形を高頻度に合併する先天異常である 22q11.2 欠失症候群の責任遺伝子 *TBX1* と、心臓幹細胞の形成に関与する転写因子である *ISL1* に着目して解析を行った。解析はまだ継続中であるが、*TBX1* 遺伝子に関しては、数例の心臓組織で一部のエクソンのコピー数の異常が認められており、今後の検討課題である。

FLK1 陽性細胞を用いた解析はまだ継続中であるが、直接シーケンス法を用いた解析では現時点で有意な遺伝子変異は同定できていない。今後継続していく予定である。

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 Nagai, K., Y. Murakami, K. Nagatani, N. Nakahashi, M. Hayashi, T. Higaki and E. Ishii. "Life-threatening acute renal failure due to imperforate hymen in an infant." *Pediatr Int*, 査読あり、54 巻 2 号、280-282 頁、2012 年
- ② Nagashima, M., T. Okamura, F. Shikata, T. Chisaka, H. Takata, M. Ohta, E. Yamamoto and T. Higaki. "Pulmonary artery banding for neonates and early infants with low body weight." *Tohoku J Exp Med*, 査読あり、225 巻 4 号、255-262 頁、2011 年
- ③ Takata, H., T. Higaki, H. Sugiyama, M. Kitano, E. Yamamoto, T. Nakano, M. Nagashima, F. Shikata, H. Tomita, S. Yazaki, I. Shiraishi and E. Ishii. "Long-term outcome of coil occlusion in patients with patent ductus arteriosus." *Circ J*, 査読あり、75 巻 2 号、407-412 頁、2011 年
- ④ Ohta, M., M. Eguchi-Ishimae, M. Ohshima, H. Iwabuki, K. Takemoto, K. Murao, T. Chisaka, E. Yamamoto, T. Higaki, K. Isoyama, M. Eguchi and E. Ishii. "Novel dominant-negative mutant of GATA3 in HDR syndrome." *J Mol Med (Berl)*, 査読あり、89 巻 1 号、43-50 頁、2011 年
- ⑤ Okamura, T., M. Nagashima, F. Shikata, T. Higaki, E. Yamamoto, M. Ohta and H. Takata. "Total anomalous pulmonary venous drainage complicated by tracheoesophageal fistula." *Pediatr Cardiol*, 査読あり、32 巻 7 号、983-985 頁、2011 年
- ⑥ Fujii, A., J. Funada, N. Morioka, H. Hashida, T. Iwata and T. Higaki. "A case of pulmonary stenosis after a repair for tetralogy of Fallot treated with percutaneous pulmonary valvuloplasty using a triple-balloon technique." *J Cardiol*, 査読あり、55 巻 1 号、130-134 頁、2010 年
- ⑦ Higaki, T., E. Yamamoto, M. Ryugo, H. Imagawa, F. Shikata, M. Nagashima, M. Ohta, H. Takata, K. Murao, T. Chisaka, T. Moritani, R. Watanabe, H. Tomita, K. Kawachi and E. Ishii. "Use of a hand-made balloon-expandable covered stent for native coarctation of the aorta in an adult patient: a report of a first case in Japan." *J Cardiol*, 査読あり、56 巻 3 号、287-290 頁、2010 年
- ⑧ Inaba, S., T. Higaki, M. Nagashima, K. Nishimura, A. Ogimoto, J. Higaki and H. Okayama. "Successful revascularization by pulse infusion thrombolysis in a patient with Kawasaki disease combined with acute myocardial infarction." *JACC Cardiovasc Interv*, 査読あり、3 巻 10 号、1091-1092 頁、2010 年
- ⑨ Nagashima, M., N. Hibino, Y. Seike, M. Ohta, E. Yamamoto and T. Higaki. "Two-stage surgical repair for truncus arteriosus with unilateral absence of the left proximal pulmonary artery:

translocation of the left pulmonary artery to the right pulmonary artery." J Card Surg、査読あり、25 巻 1 号、90-92 頁、2010 年

⑩ Nagashima, M., T. Higaki, H. Satoh and T. Nakano. "Cardiac thrombus associated with Mycoplasma pneumoniae infection." Interact Cardiovasc Thorac Surg、査読あり、11 巻 6 号 849-851 頁、2010 年

⑪ Nagashima, M., T. Higaki, Y. Seike and Y. Yokoyama. "Cardiac surgery for a patient with Andersen-Tawil syndrome." Ann Thorac Surg、査読あり、90 巻 1 号、285-287 頁、2010 年

⑫ Nagashima, M., F. Shikata, T. Higaki and K. Kawachi. "Cervical aortic arch and Kommerell's diverticulum associated with the anomalous subaortic left brachiocephalic vein in a patient with chromosome 22q11.2 deletion." Interact Cardiovasc Thorac Surg、査読あり、11 巻 2 号、202-203 頁、2010 年

⑬ Nagashima, M., F. Shikata, T. Okamura, E. Yamamoto, T. Higaki, M. Kawamura, M. Ryugo, H. Izutani, H. Imagawa, S. Uchita, Y. Okamura, H. Suzuki, Y. Nakamura, O. Tagusari and K. Kawachi. "Anomalous subaortic left brachiocephalic vein in surgical cases and literature review." Clin Anat、査読あり、23 巻 8 号、950-955 頁、2010 年

⑭ Nagashima, M., S. Takano, E. Yamamoto and T. Higaki. "Anatomically corrected malposition of the great arteries with tubular hypoplasia of the aortic arch: a case report of surgical correction." J Card Surg、査読あり、25 巻 4 号、412-415 頁、2010 年

⑮ Shikata, F., M. Nagashima and T. Higaki. "Biventricular pacing in children with complete atrioventricular block." Cardiol Young、査読あり、20 巻 5 号、571-573 頁、2010 年

⑯ Shikata, F., M. Nagashima, T. Higaki and K. Kawachi. "Occlusion of the right coronary artery ostium by an aortic cusp attachment." Interact Cardiovasc Thorac Surg、査読あり、10 巻 4 号、639-641 頁、2010 年

[学会発表] (計 13 件)

① Mitani Y, Tsuda E, Kato H, Ogawa S, Fujiwara M, Nakamura Y, Takahashi K, Ayusawa M, Kobayashi T, Ichida F, Satoh F, Matsushima M, Kamata M, Kamata M, Higaki T, Suda K, Ohashi H, Yokoi H, Hamaoka K, "Pre-event Course of Culprit Lesions in Acute Coronary Syndrome in Adults with a

History of Kawasaki Disease: A Japanese Nationwide Survey"

AHA, 2012 年 Los Angeles, USA, 2012. 11. 3-7

② Higaki T, Yamamoto E, Takata H, Ohta M, Chisaka T, Moritani T, Miyata T, Konishi K, Horikawa S, Ishii E "Long-term Monitoring of Clinical Outcomes in Kawasaki Disease Patients with Giant Coronary Aneurysms" IKDS 2012/9/28-30, KYOTO

③ Mitani Y, Tsuda E, Kato H, Ogawa S, Fujiwara Y, Nakamura Y, Takahashi K, Ayusawa M, Kobayashi T, Ichida F, Matsushima M, Kamata M, Higaki T, Suda K, Ohashi H, Yokoi H, Hamaoka K, "Acute Coronary Syndrome in Adults with a History of Kawasaki Disease

: A Japanese Nationwide Survey" IKDS 2012/9/28-30, KYOTO

④ Takata H, Higaki T, Yamamoto E, Ohta M, Chisaka T, Tashiro R, Ishii E. "Aortography with Balloon Occlusion of Tricuspid Valve in a Patient with Pulmonary Atresia and Sinusoidal Communication." Congenital & Structural Interventions, 2012 年 , Frankfurt, 2012/6/28-30, Germany

⑤ Tomita H, Haneda N, Higaki T, Kataoka K "Role of therapeutic catheterization to support pediatric cardiology in developing country" PICS 2012 年 CHICAGO, USA, 2012/4/15-18

⑥ Higaki T, Mori Y, Yamamoto E, Nakano T, Ohta M, Takata H, Chisaka T, Moritani T, Miyata T, Yamauchi T, Nakashima Y, Takeda Syo, Kitazawa H, Nagashima M, Okamura T, Shikata F, Ishii E. "Successful stent implantation for pulmonary venous drainage route in the patients with single ventricle complicated by total anomalous pulmonary venous connection" APPCS 2012 年 TAIPEI, TAIWAN, April 4 to April 7, 2012

⑦ Yamamoto E, Higaki T, Takata H, Ohta M, Chisaka T, Moritani T, Tanaka H, Ishii E. "Coil embolization of congenital portosystemic shunt(a left gastric vein-left renal vein shunt)" APPCS 2012

年 TAIPEI, TAIWAN, April 4 to April 7, 2012

⑧ Takata H, Higaki T, Yamamoto E, Konishi K, Ohta M, Chisaka T, Nagashima M, Okamura T, Shikata F, Ishii E. "Noncompaction of Myocardium in Neonate." The 4th Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society, APPCS 2012 年 TAIPEI, TAIWAN, April 4 to April 7, 2012

⑨ Mitani Y, Ohta K, Ichida F, Nii M, Sawada H, Ohashi H, Yodoya N, Otsuki S, Arakaki Y, Ushinohama H, Tateno S, Sato S, Suzuki T, Higaki T, Iwamoto M, Yoshinaga M, Sumitomo N

"Out-Of-Hospital Cardiac Arrest in Elementary and Middle School Students in the Era of Public-Access Defibrillation: A Retrospective, Nationwide, Hospital-Based Survey in Japan" AHA, 2011 年, Orlando, USA, November 12 - 16, 2011

⑩ Mitani Y, Tsuda E, Kato H, Ogawa S, Nakamura Y, Takahashi K, Ayusawa M, Kobayashi T, Ichida F, Matsushima M, Kamata M, Higaki T, Suda K, Ohashi H, Yokoi H, Hamaoka K, "Acute Coronary Syndrome in Adults with a History of Kawasaki Disease: A Japanese Nationwide Survey" AHA, 2011 年, Orlando, USA, November 12 - 16, 2011

⑪ Higaki T, Kurata A, Yamamoto E, Matsuda O, Nakano T, Konishi K, Ohta M, Takata H, Nagatani K, Murao K, Takahashi Y, Chisaka T, Moritani T, Watanabe R, Nagashima M, Shikata F, Okamura T, Hosokawa K, Kido T, Higashino H, Mochizuki T, Ishii E "Evaluation of the Modified Blalock-Taussig Shunt in Children with Congenital Heart Disease Using 64-slice and 256-slice Computed Tomography" AP PCS 2010 年, CHIBA, 2010/7/6-9

⑫ Yoshinaga M, Kato Y, Nomura Y, Hazeki D, Yasuda T, Takahashi K, Higaki T, Tanaka Y, Suruki N, Wada A, Horigome H, Ueno K, Suzuki H, Nagashima M. "Change In The Qt Intervals During Infantile Periods" AHA 2010 年, 千葉, 2010/7/6-9

⑬ Mitani Y, Ohta K, Ichida F, Nii M, Arakaki Y, Ushinohama H, Ohashi H, Tateno S, Sato S, Suzuki T, Higaki T, Iwamoto M, Yoshinaga M, Sumitomo N "Impact Of Public-Access Defibrillation At School On The Outcome After Out-Of-Hospital Cardiac Arrest Of Cardiac Origin In Elementary And Middle School Students: A Japanese Nationwide Survey" AHA 2010 年, 千葉, 2010/7/6-9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜垣 高史 (Higaki Takashi)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60253308

(2) 研究分担者

江口 真理子 (Eguchi Mariko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40420781

江口 峰斉 (Eguchi Minenari)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50420782

(3) 連携研究者

鹿田 文昭 (Shikata Fumiaki)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90457359