

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390274

研究課題名(和文) 転写調節因子による心血管系の発生・機能制御機構

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of cardiovascular development

研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA, Osamu)

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：40283593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：心血管系の発生・形態形成のメカニズムを解明するためには、様々な分子が発現する時期・場所・レベルを調節する仕組みを明らかにすることが必要であるが、そこで中心的な役割を有するのが「転写調節因子」である。私たちは以前、Hrt/Hey転写調節因子ファミリーを同定し、Hrt/Heyが心血管系の細胞分化(細胞の性質の適切な変化)・形態形成(心臓や血管の形づくり)に必須の役割を有することを報告してきた。今回の研究では、Hrt/Heyの欠損モデルマウスと分子生物学的手法を組み合わせ、Hrt/Heyの内皮細胞における機能が血管形態形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Proper formation of the heart and blood vessels is achieved by the combinatory functions of various cellular molecules. Among those, transcription factors play central roles in regulating when, where and how much those functional molecules are produced. We previously identified the Hrt/Hey family of transcription factors and reported their significance during cardiovascular differentiation (acquisition of proper cell characteristics) and morphogenesis (construction of functional architecture). By using Hrt/Hey deficient model mice and molecular biological techniques in this study, we further demonstrated that the functions of Hrt/Hey in endothelial cells were essential for embryonic vascular formation.

研究分野：心血管発生医学

キーワード：心血管発生 形態形成 転写調節因子 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

転写調節因子は、遺伝子発現調節領域のDNA配列に結合すると同時に、多様なパートナー分子(コファクター)、クロマチン修飾酵素と「転写複合体」を作って働く。発生シグナル・環境要因・病的刺激などの「上流制御系」が、転写複合体を構成する多様な分子の機能を修飾することにより、時間・空間特異的な遺伝子発現調節が行われる。一方、ひとつの転写複合体が制御する「下流遺伝子」は多数にわたり、それらの遺伝子群の発現制御により細胞全体の機能・形質の劇的な変化をもたらす。このように、転写複合体による遺伝子発現調節は多様な細胞分化・臓器機能調節の根幹として働く。

この見地より、私達は心血管系の発生・成熟機能の制御に働く転写調節因子について研究を進めてきた。私たちは心血管系に特異的に発現する転写調節因子であるHrt/Heyファミリーを同定し、Hrt/Heyファミリーの発現が発生期の細胞分化に重要なNotch情報伝達系によって活性化されることを報告した。また、Hrt2/Hey2 ノックアウト(KO)マウスが心室中隔欠損などの心奇形を示して死亡すること、心筋特異的Hrt2/Hey2 conditional KOマウスが心室筋における心房型遺伝子の異常発現により心不全を呈することを発見し、Hrt2/Hey2 が心臓の形態形成、心房・心室特異的遺伝子発現、心機能調節に重要な役割を有することを明らかにした。

これらの結果は、Hrt/Heyファミリーが心血管系の発生・成熟機能の制御において必須の役割を有することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

上記のように、これまでの私たちの研究および他施設からの報告により、心血管系の発生・形態形成を制御する転写調節機構において、Hrt/Heyファミリーの機能が不可欠であることが示されている。今後、この転写調節因子ファミリーの発現制御機構、分子機能様式、下流ターゲット遺伝子群を明らかにして行くことが重要である。そこで今回の研究では、Hrt/Hey転写調節因子の時期・部位・細胞特異的な機能を明らかにすること、Hrt/Hey転写調節因子の心血管特異的発現を制御する上流シグナル伝達系を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

Hrt/Hey転写調節因子の欠損モデルマウスシステムとして、Hrt1/Hey1 KOマウス、Hrt2/Hey2 KOマウス、Hrt2/Hey2 conditional KOマウスのシステムを用いた(Morioka et al., 2004)。また、bone morphogenetic protein (BMP)-ALK1 受容体シグナル伝達系の欠損モデルマウスとして、ALK1/Acvr11 KOマウス、

Tmem100 KOマウスを用いた(Somekawa et al., 2012, Mizuta et al., 2015)。これらのマウスシステムを用いた実験は、実験実施時に研究代表者が在籍していた奈良県立医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

マウス胎仔の解剖学的および組織学解析、培養細胞を用いた細胞生物学的解析、および分子生物学的・生化学的解析は論文に記載した方法を用いた(Somekawa et al., 2012, Morioka et al., 2014, Mizuta et al., 2015)。

## 4. 研究成果

Hrt2/Hey2 KOマウスが重篤な心奇形を生ずるのと同様にHrt1/Hey1 KOマウスには心血管系に有意な異常が認められないとされているが、Hrt1/Hey1 とHrt2/Hey2 のdouble KOマウスは血管形成不全によって胎生10日頃に死亡する。この結果より、血管発生においてHrt1/Hey1 とHrt2/Hey2 が必須かつ相補的な役割を果たすことが確認されたが、これらの二つの転写調節因子が発現する血管内皮細胞と平滑筋細胞のいずれにおいてHrt/Hey機能が重要かということは長い間不明のままであった。

そこで、血管内皮特異的Hrt/Hey機能欠損モデルマウスを作成し、血管発生異常の有無を検討した。Hrt1/Hey1 を全身で欠損するが、Hrt2/Hey2 を血管内皮細胞でのみ欠損するマウス胎仔(Hrt1<sup>ko/ko</sup>; Hrt2<sup>fl/ko</sup>; Tek-cre+)は、Hrt1/Hey1 とHrt2/Hey2 を全身で欠損するマウス(Hrt1<sup>ko/ko</sup>; Hrt2<sup>ko/ko</sup>)と同様に、胎生10-12日頃に生ずる全身の血管形態形成に著しい障害を示し、全例胎生致死となった。一方、今回の検討の範囲内では、血管平滑筋や心筋でHrt/Hey機能を欠失したマウスには重篤な血管形成異常は認められなかった。この結果より、胎生期の血管形態形成において、血管内皮細胞におけるHrt/Hey機能が重要であることが明らかになった。今後、Hrt/Heyが内皮細胞において制御する下流ターゲット遺伝子群の解明、それらのターゲット遺伝子群によって調節される血管細胞分化・形態形成現象を明らかにする必要がある。

一方、以前私たちはHrt/Heyファミリー遺伝子の発現がNotchシグナル伝達系によって活性化されることを示したが、今回Hrt/Heyの発現はBMP9/BMP10-ALK1 受容体シグナル伝達系によっても制御されることが明らかになった。ヒト培養内皮細胞におけるHrt1/Hey1 およびHrt2/Hey2 のmRNA発現はBMP9もしくはBMP10刺激により著しく増加した。同様の結果は、他の研究室空も報告された(Morikawa et al., 2011, Larrivee et al., 2012)。さらに今回私たちは、マウス胎仔において血管組織に富むYolk SacのMicroarray mRNA発現解析を行い、ALK1/Acvr11 の欠損マウスにおいてHrt1/Hey1 およびHrt2/Hey2 のmRNA発現が顕著に減少していることを明らかにした。Hrt2/Hey2 の蛋白質レベルでの発

現はALK1/Acvr1 欠損マウス胎仔の大動脈においても認められた(Somekawa et al., 2012)。

Tmem100 は私たちが最近同定したBMP-ALK1受容体シグナル伝達系下流遺伝子であるが、このTmem100 の欠損マウス胎仔においてもHrt1/Hey1 およびHrt2/Hey2 のmRNA発現低下が認められた。Tmem100 欠損マウスは心臓形態形成において重要な心臓房室管 Endothelial-Mesenchymal Transformation (EndMT)の障害を示すことが明らかになったが、この表現型はHrt/Hey欠損によっても生ずることが報告されており、Notch系、BMP-ALK1 系、Hrt/Hey、Tmem100 が制御する発生期生命現象の連関が注目される。今後、心血管系におけるHrt/Heyファミリー遺伝子の発現がどのような上流シグナル伝達系によって制御されているか全貌を明らかにし、さらに、その制御機構が様々な病態によってどのような変化を示すかを検討することが重要である。

#### 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 5 件)

Mizuta K, Sakabe M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. TMEM100, a novel intracellular transmembrane protein essential for cardiovascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2015 (in press). 査読無

Sakabe M, Morioka T, Kimura H, Nakagawa O. Roles of endothelial Hrt genes for vascular development. In: Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Eds: Srivastava D, Keller BB, Markwald R, Yamagishi H, Nakanishi T. Springer 2015 (in press). 査読無

Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos. Dev Dyn 244: 31-42, 2015. 査読有

Morioka T, Sakabe M, Ioka T, Iguchi T, Mizuta K, Hattamaru M, Sakai C, Itoh M, Sato GE, Hashimoto A, Fujita M, Okumura K, Araki M, Xin M, Pedersen RA,

Utset MF, Kimura H, Nakagawa O. An important role of endothelial Hairy-related transcription factors in mouse vascular development. Genesis 52: 897-906, 2014. 査読有

Somekawa S, Imagawa K, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato GE, Inada K, Iwamoto T, Mori T, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y. Tmem100, an ALK1 signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis. Proc Nat Acad Sci USA 109:12064-9, 2012. 査読有

[学会発表](計 14 件)

Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Ioka T, Sakai C, Okumura K, Hattamaru M, Fujita M, Araki M, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014. 「Impairment of endothelial-mesenchymal transformation during atrioventricular cushion formation in Tmem100 null embryos.」 2014年9月10日 京都市

Nakagawa O, Sakabe M. 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting シンポジウム 「Significance of endothelial Hairy-related transcription factors in embryonic vascular development.」 2014年4月14日 京都市

Sakabe M, Mizuta K, Sakai C, Ioka T, Morioka T, Hattamaru M, Hashimoto A, Fujita M, Kuraoka D, Okumura K, Hayashi H, Nakagawa O. 日本分子生物学会年会 「Roles of Hrt family of Notch downstream transcription factors during endocardial cushion development.」 2013年12月3日 神戸市

坂部正英、森岡崇、井岡朋子、水田賢、酒井千浩、八反丸美和、林寿来、橋本彩、木下友希、藤田匡秀、奥村和生、倉岡大希、Utset MF、Olson EN、木村弘、中川修 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 「NotchおよびBMP-ALK1系の下流転写調節因子Hrtファミリーの内皮分化・血管形成における意義」 2013年11月23日 吹田市

Sakabe M, Morioka T, Iguchi T, Ioka T, Mizuta K, Hattamaru M, Sato GE, Ito

M, Hayashi H, Utset MF, Olson EN, Kimura H, Nakagawa O. 日本血管生物医学学会学術集会YIA competition 「Roles of the Hrt family of Notch downstream transcription factors in endothelium during cardiovascular morphogenesis」 2013年9月28日 吹田市

坂部正英, 森岡崇, 井岡朋子, 稲田賢, 佐藤玄基, 伊藤宗洋, 八反丸美和, 橋本彩, 酒井千浩, 林寿来, Utset MF, Olson EN, 木村弘, 中川修 日本先天異常学会学術集会「Hrt転写調節因子の内皮分化と血管形成における意義」 2013年7月23日 吹田市

坂部正英, 稲田賢, 橋本彩, 藤田朋子, 井岡朋子, 佐藤玄基, 森岡崇, 伊藤宗洋, 八反丸美和, 酒井千浩, 林寿来, 染川智, 齋藤能彦, 中川修 日本先天異常学会学術集会「心内膜床形成における新規膜タンパクTmem100の意義」 2013年7月23日 吹田市

Sakabe M, Morioka T, Iguchi T, Ioka T, Mizuta M, Hattamaru M, Sato GE, Ito M, Hayashi H, Utset MF, Olson EN, Kimura H, Nakagawa O. The 7th TAKAO International Symposium 「Roles of the Hrt family of Notch downstream transcription factors in endothelium during vascular development」 2013年7月14日 東京都

Mizuta K, Sakabe M, Hashimoto A, Iwata N, Ioka T, Morioka T, Hattamaru M, Fujita M, Kinoshita Y, Sakai C, Hayashi H, Somekawa S, Saito Y, Nakagawa O. The 7th TAKAO International Symposium 「Tmem100, a novel intracellular transmembrane protein, regulates endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion development.」 2013年7月14日 東京都

Inada K, Sakabe M, Somekawa S, Fujita T, Ioka T, Hashimoto A, Sato G, Morioka T, Ito M, Hattamaru M, Hayashi H, Saito Y, Nakagawa O. 日本循環器学会学術集会 「Tmem100, a Novel Intracellular Transmembrane Protein, Regulates Endothelial-mesenchymal Transformation during Cardiac Cushion Development.」 2013年3月16日 横浜市

中川修 第42回日本心脈管作動物質学会シンポジウム 「NotchおよびALK1受

容体シグナル伝達系の下流因子による心血管系の分化・形態形成制御機構」 2013年2月9日 奈良市

林寿来, 坂部正英, 井岡朋子, 井口朋子, 森岡崇, 佐藤玄基, 稲田賢, 伊藤宗洋, 八反丸美和, Utset MF, Olson EN, 中川修 日本分子生物学会年会 「Significance of Hairy-related transcription factors in endothelial differentiation and vascular morphogenesis」 2012年12月11日 福岡市

坂部正英, 森岡崇, 藤田朋子, 井岡朋子, 稲田賢, 佐藤玄基, 伊藤宗洋, 八反丸美和, 林寿来, Utset MF, Olson EN, 木村弘, 中川修 日本分子生物学会年会 「Expression profiles and importance of Hairy-related transcription factor (Hrt) in ischemia-induced angiogenesis」 2012年12月11日 福岡市

坂部正英, 森岡崇, 藤田朋子, 井岡朋子, 稲田賢, 佐藤玄基, 伊藤宗洋, 八反丸美和, 林寿来, Utset MF, Olson EN, 木村弘, 中川修 日本血管生物医学学会総会 「Roles of Hairy-related transcription factors in developing endothelium during vascular formation」 2012年12月5日 徳島市

〔図書〕(計 2 件)

中川修 「心臓の発生・先天性心疾患と分泌性シグナル因子」最新内分泌代謝学(中尾一和編 970頁)第5章 心臓と腎臓の内分泌代謝 p271-273 2013年 診断と治療社

中川修, 林寿来, 坂部正英 「心臓発生に働く転写調節因子の心肥大・心機能調節における意義」別冊医学のあゆみ エネルギー代謝転写因子ネットワークと生活習慣病 (島野仁編 128頁) p71-75 2012年 診断と治療社

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular\\_physiology/index.html](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/index.html)

<http://www.narmed-u.ac.jp/university/kenkyu-sangakukan/sentanigaku/junkanki/csr.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 修 (NAKAGAWA Osamu)  
国立循環器病研究センター・研究所・  
部長  
研究者番号：40283593

### (2) 研究分担者

坂部 正英 (SAKABE Masahide)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00525983

林 寿来 (HAYASHI Hisaki)  
愛知医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30533715

小西 登 (KONISHI Noboru)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20145832

林 環 (HAYASHI Tamaki)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50351648

山岸 敬幸 (YAMAGISHI Hiroyuki)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：40255500

### (3) 連携研究者

無し