

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 23～24 年度

課題番号：23790232

研究課題名（和文）心臓形態形成における選択的細胞分化誘導とそれに関わる不均一シグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Roles of ununiform cellular signaling during cardiac morphogenesis

研究代表者

坂部 正英（SAKABE MASAHIDE）

奈良県立医科大学 循環器システム医科学 助教

研究者番号：00525983

研究成果の概要（和文）：

心臓発生過程で形成される『心内膜床』は成熟心臓の中隔や弁の原基であり、心臓形態形成に必須の組織である。我々は、心内膜床形成には心臓内皮細胞における選択的かつ不均一な細胞分化誘導メカニズムが必要で、そのメカニズムに Notch 情報伝達系が関与することを見出している。本研究では、Notch 活性モニターマウスを用いたライブイメージング解析、および Notch 受容体の下流ターゲット因子の遺伝子解析により、心内膜床形成における Notch シグナル伝達のダイナミクスとその意義の解明を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Generation of endocardial cushion in the atrioventricular canal (AVC) and outflow tract (OFT) of developing heart is essential for subsequent chamber septation and valvulogenesis. During endocardial cushion formation, only a fraction of endothelial cells lining AVC and OFT are activated and undergo endothelial-mesenchymal transformation (EMT). In this study, we demonstrated that Notch signaling might play important roles in such differential cell-fate decision through its selective and ununiform activation in endothelial cells during EMT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

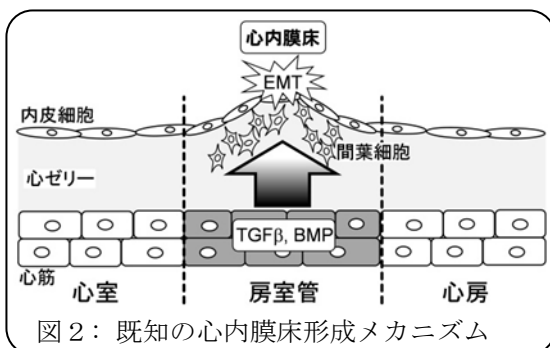
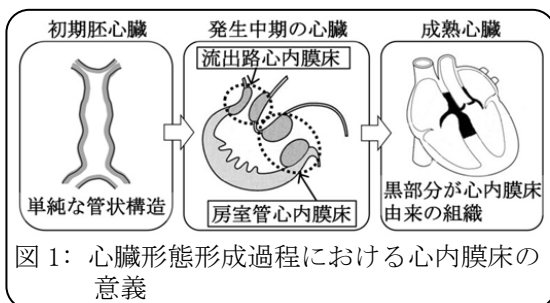
研究分野：医歯薬学

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：細胞分化・組織形成、心臓発生学、発生遺伝学

1. 研究開始当初の背景

心臓は循環系を担う臓器として最初に機能し、胚発生の段階に合わせてその形態が変化する【図1】。初期胚の心臓は、原始心筒と呼ばれる一本の筒状構造をしており、発生が進むにつれてこれが右方に屈曲すると、「心房」、「心室」、「房室管」、「流出路」の区画が明らかになってくる。ヒト先天性心疾患において最も奇形が生じやすい組織である房室中隔、流出路中隔、弁の形成は、この区画化された心臓の流出路と房室管領域にのみ形成される「心内膜床」と呼ばれる一対の隆起に由来する【図1, 2】。これまでの研究により心内膜床は、房室管および流出路の心臓内皮細胞が間葉細胞へと形質転換(Endothelial-Mesenchymal Transformation; EMT)することにより形成されることが明らかとなっているが、その詳細なメカニズムは未だに不明な点が多い。我々は心内膜床形成領域の内皮細胞に認められた不均一な Notch シグナル活性に注目し、この不均一な活性化が内皮細胞での過不足のない EMT を誘導し、正常な中隔・弁形成を制御すると考えている。



2. 研究の目的

これまでの研究により、心内膜床形成領域の内皮細胞には Notch 情報伝達系の活性が認められ、その欠損マウスは心内膜床形成不全を示すことが報告されている。Notch 受容

体は、リガンド結合により活性化されると細胞内領域 (NICD) が切断され核内に移行し、RBP-J と複合体を形成して DNA に結合することによりターゲット遺伝子の発現調節を行っている。我々は NICD/RBP-J 複合体の制御下に GFP レポーターを結合した遺伝子をもつトランスジェニックマウスを開発し、「Notch 活性」のモニタリングを可能とした。このモニターマウスを用いて、我々は心内膜床形成領域の内皮細胞における Notch シグナルの不均一で選択的な活性化をモニタリングし、過不足のない EMT を誘導するメカニズムの解明を試みている。そこで本研究では、①レポーターマウスと房室管器官培養モデルを用いて、心内膜床形成における Notch シグナルのダイナミクスをライブイメージングにより検討する、②Notch シグナルにより発現制御をうける遺伝子群を解析し、心内膜床形成における Notch シグナルの意義を解明する。

3. 研究の方法

1) 心内膜床形成における Notch シグナルのイメージング解析

予備実験により、心内膜床形成領域の内皮細胞では Notch シグナル『ON』『OFF』細胞が混在することが示唆されている。そこで、このモザイク状の発現パターンをライブイメージング解析し、Notch シグナル陽性/陰性細胞がどのような細胞系譜をたどるのか(内皮細胞のままなのか間葉細胞に形質転換するのか)を解析する。

本研究を効果的に行うための工夫として、前述の Notch 活性レポーターマウス胚から得られた房室管領域をコラーゲンゲル上に培養する3次元器官培養モデルを用いる。この方法により *in vivo* に非常に近い状態での Notch シグナル活性化パターンを観察することができる。また、隣接する内皮細胞を一画像に捉えることが可能となり、Notch シグナル活性によって変化する細胞系譜解析が容易となる

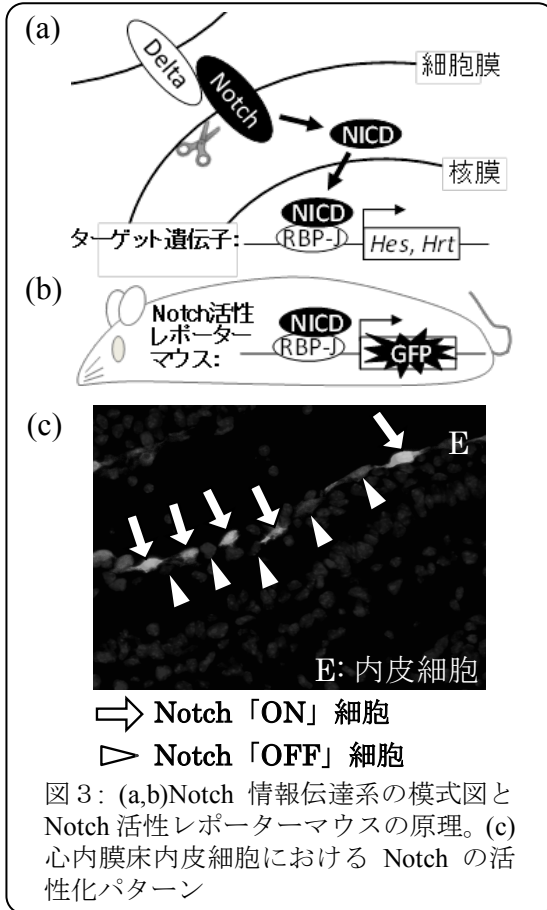
2) Notch 下流遺伝子の発現解析およびその機能解析

我々の研究室では、Notch シグナルの下流ターゲット因子として、Hairy-related transcription factor (Hrt)を同定している。そこで、心内膜床形成領域の内皮細胞における Hrt 転写因子の発現を免疫染色および *in situ* hybridization を用いて検討する。また、Hrt 欠損マウスを解析し、EMT への影響を検討する。

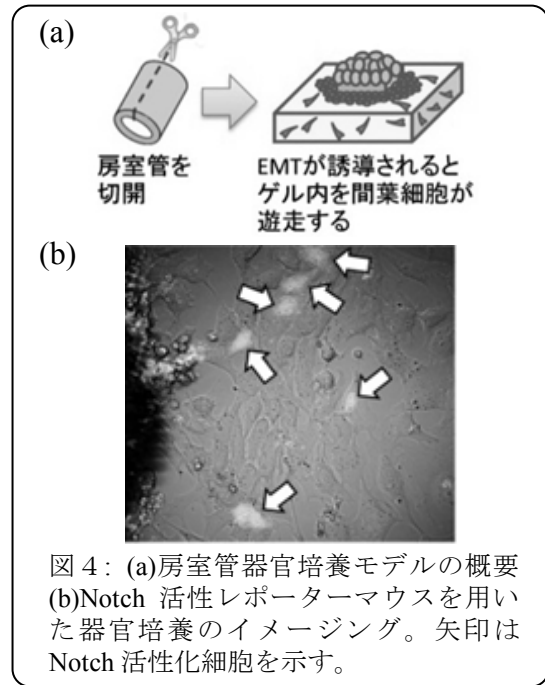
4. 研究成果

1) Notch 活性レポーターマウスを用いた心内膜床形成領域における Notch signal のダイナミクス

心内膜床形成過程における Notch signal の活性化パターンを検討するために、Notch 活性レポーターマウス胚を用いて GFP レポーターの発現解析を行った。その結果、心内膜床形成領域の内皮細胞では、Notch シグナル『ON』と『OFF』の細胞が混在していたことから (図 3)、心内膜 EMT は不均一なシグナル伝達に制御される細胞集団から生じていることが示唆された。

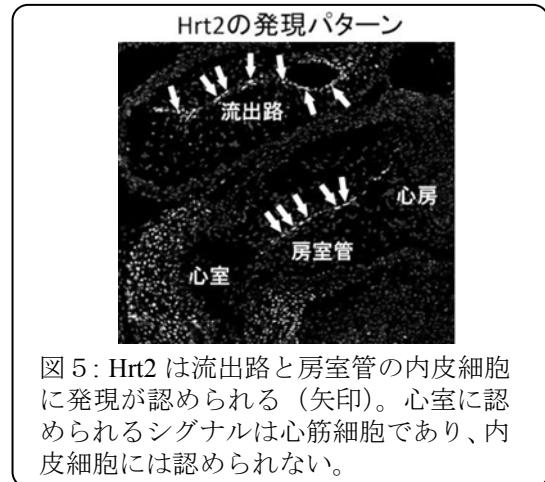


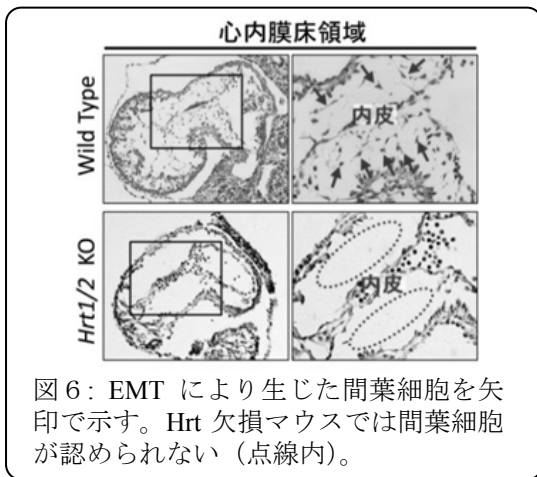
次に、心内膜床形成過程における Notch 活性をライブイメージングするためにレポーターマウス胚から得られた房室管領域をコラーゲンゲル上に外植し、器官培養を行った。その結果、この方法では、コラーゲンゲル上に増殖した内皮細胞における Notch 活性をモニタリングすることができなかった。そこで、房室管をプラスチックディッシュ上で培養する方法に変更したところ、いくつかの内皮細胞に GFP 陽性細胞が観察された (図 4)。しかしながら、この培養方法では GFP 陰性の細胞が圧倒的に多いため、*in vivo* の状況をミミックしているとは考え難い。したがって、今後もライブイメージングが可能となる培養系を検討する予定である。



2) 心内膜床形成領域における Hrt 転写調節因子の発現とその意義について

心内膜床形成における Notch signal の意義を検討するために、Notch signal の下流ターゲット因子である Hrt 転写因子の発現パターンを免疫染色により検討した。Hrt 転写因子には Hrt1, Hrt2, Hrt3 の 3 つのアイソフォームが存在し、そのうち Hrt2 が心内膜床形成領域の内皮細胞に発現していることを見出した (図 5)。しかし、これまでの解析により、Hrt2 ノックアウトマウス (KO) では、顕著な心内膜床形成不全が認められていない。そこで我々は、Hrt1 および Hrt2 の 2 遺伝子を欠損させたダブルノックアウトマウス (DKO) の解析を試みた。その結果、DKO マウスでは、心内膜床形成が異常となり、遊走する間葉細胞がほとんど認められなかった (図 6)。以上の結果から、Notch-Hrt シグナルは心内膜床形成に非常に重要であることが示唆された。





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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 坂部正英. Roles of Hrt family of Notch downstream transcription factors in developing endothelium during vascular formation. 日本Notch研究会, 2013年2月14日~15日.

2. 坂部正英. Roles of Hairy-Related Transcription factors in developing endothelium during vascular formation. 日本血管生物医学学会, 2012年12月5日~7日.

〔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

<http://www.naramed-u.ac.jp/research/amrc/csr/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂部 正英 (SAKABE MASAHIDE)

奈良県立医科大学 循環器システム医科学 助教

研究者番号: 00525983

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: