

第2回心臓血管発生研究会

日 時：2003年7月18日(金)

場 所：神戸国際会議場 学会E会場(502号室)

運営委員長：濱岡 建城 京都府立医科大学大学院医学研究科発達循環病態学)

1. 肺血管床の発生・新生における各種増殖因子の働き

大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科学

小野 正道, 澤 芳樹, 宮本 裕治

福嶋 教偉, 榊田 悟, 市川 肇

松田 暉

生後の血管新生・再生のメカニズムは胎生期の血管発生と一部同様であり, 成熟な血管床形成には各種増殖因子の相互作用が重要と考えられている。われわれはHGFによる肺血管新生・再生のメカニズムを検討してきた。肺動脈からのHGF遺伝子導入は, 正常ラット肺に対して血管新生作用を有し浮腫や肺動脈狭窄は認めなかった。肺高血圧ラット肺に対しては血管密度を増やし, 中膜肥厚を抑制し, 肺高血圧を改善するとともにTGF- β , endothelin-1, total collagen濃度を低下させた。in vitroでHGFは培養肺動脈平滑筋細胞のPDGF依存性増殖を抑制したがVEGFは抑制しなかった。HGFは血管内皮細胞に対する増殖作用のみならず, 障害肺血管の平滑筋細胞の増殖を直接抑制する作用を有すると考えられた。HGFは肺血管新生・再生の過程でその多彩な生理活性をもって肺血管床形成に関与していると考えられた。

2. 大血管形態形成と*Tbx1*の転写調節機構慶應義塾大学医学部小児科¹⁾山岸 敬幸¹⁾, 前田 潤^{1,2)}テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター²⁾Deepak Srivastava²⁾

22q11.2欠失症候群(22q11症候群)は, 円錐動脈幹および大動脈弓異常を高率に合併する。本症候群の原因として注目される*Tbx1* 遺伝子をジーンターゲットングしたマウスでは, ヘテロ変異体で大動脈弓異常が認められる。私たちは, マウス*Tbx1* 遺伝子の上流転写調節領域をクローニングし, *Tbx1* の発現部位に*lacZ*マーカーを発現するトランスジェニックマウス(*Tbx1-lacZ*マウス)を樹立した。*Tbx1-lacZ*マウスと, 胚発生に必須の分沁因子, sonic hedgehog(*Shh*)ターゲットングマウスの交配により, *Shh*が*Tbx1* の発現維持に必要であることが判明した。また, フォークヘッド型(*Fox*)転写因子, *Foxa2*, *Foxc1* および*Foxc2* が直接*Tbx1* の転写調節領域に結合し, 発現を調節することが示された。さらに, *Shh*, *Foxc1*, *Foxc2* ホモ変異マウスでは, *Tbx1* ヘテロ変異マウスと同様の動脈弓異常が認められ, *Shh*ホモ変異マウスで*Foxa2* および*Foxc2* の発現が, *Foxc1* および*Foxc2* ホモ変異マウスで*Tbx1* の発現が, それぞれ低下していた。

以上のことから, *Shh*シグナルを*Fox*転写因子がメディエイトし, *Tbx1* の転写を調節する分子機構が, 大血管の形態形成に重要な役割を果たすと考えられた。

3. 動脈管におけるadenylyl cyclase isoformの発現

横浜市立大学医学部第一生理学

横山 詩子

同 循環制御医学

南沢 享

目的: PGE₂の受容体であるEP4は動脈管に深く関与している。EP4はG蛋白と結合し, adenylyl cyclase(AC)を介してcAMPを上昇させる。動脈管におけるACの発現は調べられていないため, 今回われわれはACの各isoformについて発現を調べた。

方法: 胎生19日, 21日, 生直後のwister rat, 60, 60, 50匹より動脈管, 大動脈, 肺動脈を採取し, semi-quantitative RT-PCRを行った。

結果: AC I, VIIIを除くすべてのisoformが動脈管, 大動脈, 肺動脈で発現していた。AC II, IV, VIでは発達とともに動脈管で発現が増加し, 特にAC IIでは発達のすべての段階で大動脈, 肺動脈より動脈管に発現が多く, 成仔にくらべて胎生21日, 生直後では30%の発現の増加がみられた。AC III, VIIでは発達による変化が認められず, AC V, IXでは発達とともに動脈管での発現は増加したが, 成仔よりは発現が低かった。

考察: ラットの動脈管ではAC I, VIIIを除くすべてのisoformが発現していた。AC II, IV, VIIは発達とともに動脈管で増加し, 大動脈や肺動脈での発達と異なる結果を示した。

4. Coronary angio/vasculogenesisにおけるTNCの役割

滋賀医科大学小児科

渡邊 格子, 花戸 貴司, 藤野 英俊

中川 雅生

三重大学医学部第一病理学講座

今中-吉田恭子

Tnascin(α TN-C)は, 細胞外マトリクス蛋白の1つで, 一般に形態形成, 組織再生・修復, 血管新生を伴って一過性に発現する。今回われわれは心臓発生の段階のうち特に冠動脈発生段階でのTN-Cの役割を明らかにするために, TN-Cの発現を形態学および免疫組織学的に検討した。血管内皮の存在を示すPECAMの発現にて冠動脈の形成段階が判明

し、またそれに伴いITN-Cが強く関与していることが分かった。また、冠動脈の末梢血管の形成に関与していると考えられているproepicardial organ(PEO)を採取し*in vitro*にて血管形成の様子を追った。

5. 心臓形成における*hesr*遺伝子群の機能解析

国立遺伝学研究所発生工学研究室

小久保博樹, 相賀裕美子

東京女子医科大学日本心臓血圧研究所循環器小児科

富田-宮川幸子, 富松 宏文, 中嶋 八隅

中澤 誠

University of Texas MDACC

Randy L. Johnson

Notchシグナル伝達系は細胞間相互作用の重要な構成要素の一つで、多くの組織や器官形成に重要な役割を果たすことが示され、心臓血管形成においてもNotch1, 2, 4, Delta4やJag1などの関与が示唆されてきた。われわれは、Notchシグナル伝達系の標的遺伝子であり転写因子である*Hairy and Enhancer of split*に注目して新たな遺伝子群をクローニングし、*hairy and E(spl)-related(hesr)1, 2, 3*と命名した。この遺伝子群の機能を解析するため、すべてのノックアウトマウスを作成したが、*hesr1*および3のノックアウトホモマウスは生存、生殖可能で、発生過程における異常は認められなかった。これに対して*hesr2*ノックアウトホモマウスは、その多くが生後2~10日の間に、体重の増加をほとんど伴わずに死亡した。生体内での心機能を判定するため超音波診断装置(HITACHI社製PMS HDI-5000 Sono CT XRES・PMS CL15-7 high frequency linear probe)を用いて解析した。Mモードでは、fractional shorteningの著しい低下が認められた。カラーおよびパルスドプラで観察すると、三尖弁および僧帽弁の逆流と、VSDを経由した右心室から左心室への血流が確認された。解剖の結果、その心臓が著しく拡大し、三尖弁および僧帽弁の形成が不全で、心室中隔欠損および心房中隔二次孔欠損がみられた。これらの結果より*hesr2*遺伝子が、心臓形成に重要な役割を果たすことが示された。

6. これからの心血管発生学 病因研究から治療研究に向けて

京都府立医科大学大学院医学研究科発達循環病態学

白石 公, 山元 康敏, 佐藤 恒

濱岡 建城

心血管発生学は分子医学の発達により正常心臓形態形成のメカニズムや病因となる遺伝子の同定など著しい発達を遂げてきた。しかしながらこれまでに明らかとなった病因は臨床でみられる多岐にわたる先天性心疾患の一部でしかすぎず、発生医学に基づいた病因研究のさらなる発達が必要である。同時に先天性心疾患の多くの子供たちが患う重度心不全や肺血管床の異常などの難知性疾患を治療する研究も重要である。それには先天性心疾患の発生病理や病態を十分に把握し、既存の概念とは異なった新しい治療戦略が不可欠であ

る。私たちはこれまで心臓発生の研究により得られた知識を基として、小児期の循環器疾患に対して最近の遺伝子治療や再生医療などの概念を取り入れた新しい治療法を目指していくつかの基礎研究を行っているので紹介する。

教育講演

「遺伝的変異体の作成と心臓大血管形成機構解明におけるその利用」

京都府立医科大学大学院医学研究科生体機能形態科学部門

横山 尚彦

心臓の発生は、心臓形成領域の形成、心筒形成、心ループ形成、心臓各領域の区画化、心筋への分化といった多くの過程を必要とする。これらの過程はもちろん遺伝的制御下にあるが、実際にどのような遺伝子が関与するかは近年少しずつ明らかとなってきた。心ループの方向性もやはり遺伝的に制御されるが、これは身体全体の左右決定機構と密接に関連する。今回口演においては、左右非対称性決定機構研究の過去10年を振り返って紹介する。また、これまでの左右非対称性決定機構の研究を通して、現在の心臓発生研究に何が必要なかを論じる。

身体の左右非対称性が遺伝的に制御されている証拠としては、身体の左右非対称性が逆転する遺伝的変異体がヒト・マウスにおいて存在することが挙げられる。しかし、どのような遺伝子が実際に関与しているかが明らかとなったのは、今から8年前のLevinらの論文による。彼らはchick embryoにおいて*activin RII, shh, cNR-1*が左右非対称に発現していることを報告した。続く問題は、なぜ対称な胚子に左右非対称的な遺伝子発現が生じるかということであった。この問題は1988年に野中らにより提唱されたnodal flow modelにより説明されると考えられる。マウスの原始結節を構成する細胞にはmonociliaが存在する。このmonociliaが回転運動をすることで細胞外液に左向きの流れが生じる。この左向きの流れによって遺伝子の左右非対称的な発現が生じるというのがnodal flow modelである。なぜ、回転運動が左向きの流れを生じるのか、また、左向きの流れがどのように左右非対称的遺伝子発現を生じるかは現在のトピックである。

心臓発生に関与する遺伝子がかかるにつれ、candidate gene approachによるヒトの先天性心疾患の原因遺伝子探索が開始されるようになった。本邦におけるヒトの先天性心疾患原因遺伝子探索の第1の問題は、先天性心疾患患者に関する公開情報の不足だと思われる。研究領域において心臓発生に関与する遺伝子が同定できたとしても、簡単にヒトの患者に関する情報を収集できるシステムが存在しないため、海外の研究グループに追い越されていく。本邦における心臓発生研究を進展させるには、臨床医による先天性心疾患患者のデータ収集・整理とその公開が必須である。本研究会の会員諸氏のご理解とご協力が今後の心臓発生研究の鍵を握ると言って過言ではないと思う。