

## 第7回心臓血管発生研究会

会 期：2008年7月4日(金)～5日(土)  
 会 場：磐梯熱海温泉 ホテル華の湯  
 会 長：中澤 誠(脳神経疾患研究所附属総合南東北病院小児・生涯心臓疾患研究所)  
 運営委員長：山岸 敬幸(慶應義塾大学医学部小児科)

## 1. 発生過程における心筋細胞内Ca動態の変化

防衛医科大学校小児科

石渡 隆寛, 滝沢 真理

心不全において、心筋でのイオンチャネルの発現が胎児期と同様のパターンを示すことが知られている。しかし、心発生過程での心筋において、心筋細胞質内のCa<sup>2+</sup>シグナルがsarcoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2A (SERCA2A), sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> pump, Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX)などの発現が変化することで、どのように機能的変化を見せるか、いまだ詳細は明らかにされていない。われわれは、従来の培養心筋ではなく、whole heartを用いて胎児期の経時的なCa<sup>2+</sup> transientの変化を検討し、発生過程での心筋細胞イオンチャネルの役割を解析した。今回は、SERCA2A阻害剤、L-type Ca<sup>2+</sup> channel阻害剤を加えた際の効果を検討したので報告する。

## 2. メカニカルストレスは心臓発生に必要か—小型魚類からのアプローチ

東北大学加齢医学研究所

木田 泰之, 番匠 俊博, 宮坂 恒太

尾身 実, 小椋 利彦

血流による「ずり応力」は、内皮細胞の増殖・分化・リモデリングに影響していることが知られており、また心筋細胞には心拍による伸展刺激が負荷されている。心臓発生において、興味深いことに、原始心筒の段階から心拍が開始され、血流が認められる。では、これらのずり応力や伸展刺激によるメカニカルストレスは、心臓の形態形成にどのような影響を及ぼしているのだろうか。われわれは、生存を維持しながら心拍を停止させることが可能なゼブラフィッシュを用いて、メカニカルストレスの必要性を研究している。

以前の研究から、拍動を感知するMRTF-BがTbx5と結合することを明らかにしている。核内におけるこの複合体はANF/Napaa等の発現を誘導し、心筋増殖を制御してい

た。最近、発現解析と遺伝子の機能阻害実験から、いくつかのmicroRNAが心臓発生に必要であることを見いだした。また、これらのmicroRNAは薬剤による血流停止によって発現が消失した。今回、これらの機能解析の結果を報告したい。

## 3. Jumonjiによる心筋細胞の増殖と分化の同時制御機構

三菱化学生命科学研究所

竹内 隆, 中島久仁子, 小島 瑞代

稲川 匡代

発生過程では、増殖および分化が時間的・空間的に精緻に制御される。この制御は、組織が正常な形態、サイズ、機能を獲得するために必要不可欠であるが、いつ、いかなるシグナルが細胞周期をどのように調節するのか、また、そのシグナルと分化との関係など、多くが謎である。特に増殖と分化が拮抗的に制御される機構に興味を持たれる。私たちは、Jumonji (Jmj) 遺伝子の発見とその心臓における機能研究を通じて、これらの問題に取り組んできた。そして、JmjがG1期の細胞周期調節蛋白質であるサイクリンD1の転写を抑制することによりCDK4の活性を低下させ、その結果、心筋細胞の増殖にブレーキをかけること、さらにこのCDK4の活性の低下によりGATA4の発現が亢進され、分化が進行することを明らかにした。この結果は、心筋細胞の増殖と分化を拮抗的に制御する分子メカニズムを示すとともにCDK4が細胞周期の調節以外に新たな機能を持つことをも示した。

## 4. IGFBP-4によるWnt阻害が心筋発生に必要である

千葉大学大学院医学研究科循環病態医科学

塩島 一朗, 朱 偉東, 小室 一成

ICORP器官再生プロジェクト[科学技術振興機構 (JST)]

伊藤 弓弦

心筋分化誘導活性を持つ新たな液性因子を単離同定することを目的として、P19CL6をさまざまな細胞のconditioned mediaで処置したところ、骨髄間葉系細胞株OP9のconditioned mediaがP19CL6を心筋へ分化誘導し、さらに、IGFBP-4がOP9由来の心筋分化誘導因子であることが明らかになった。IGFBP-4の心筋分化誘導活性はIGF結合能とは無関係で、IGFBP-4のWnt抑制作用によるものであった。また、IGFBP-4をP19CL6, ES細胞, アフリカツメガ

別刷請求先:

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部小児科

心臓血管発生研究会事務局

山岸 敬幸

エルでノックダウンしたところ、心筋分化が著明に障害され、その表現型はWnt抑制によりrescueされた。以上の結果は、IGFBP-4はWnt阻害作用をもち、IGFBP-4によるWnt阻害が心筋発生に必須であることを示すものと考えられた。

#### 特別講演

##### 「Cardiomyocyte differentiation *in vitro* and *in vivo*」

慶應義塾大学循環器内科・再生医学教室

湯浅 慎介

心臓、心筋細胞の発生は、さまざまな因子により時間・空間的に精密に制御されている。その分化制御は、複雑心奇形や心筋症などの病因解明の鍵となり、さらに幹細胞を用いた再生医療に応用されうる。われわれは、embryonic stem (ES)細胞を用いた研究から、心筋発生初期にBMP signalを一過性に抑制することが必要であり、BMP signalを一過性に抑制することにより心筋細胞分化を促進し得ることを見いだした。この系を用いた遺伝子発現解析を行うことにより、種々の心筋細胞分化誘導因子を探索した。心臓発生において、遺伝子の発現調節をしている転写因子の重要性はさまざまな研究により証明されている。そこで、この遺伝子発現解析を用いて、新規心臓転写因子を探索することとした。BMP antagonistを用いてES細胞から心筋細胞を分化誘導し、gene chipを用いて解析した。転写因子のmotifを持った遺伝子を抽出。Whole mount *in situ* hybridizationにて心臓での発現を確認。ANF promoterを用いたluciferase assayにより転写活性を確認。この結果、心臓で発現する強い転写因子Zac1を同定したので、その機能解析を報告する。

##### 5. 心発生初期におけるエンドセリンA受容体-LacZ/EGFP発現細胞と刺激伝導系の関連

東京大学医学系研究科分子細胞生物学専攻代謝生理化学教室

浅井理恵子, 佐藤 崇裕, 河村悠美子

栗原由紀子, 栗原 裕基

東京女子医科大学循環器小児科

宮川-富田幸子

エンドセリン(ET)シグナルは心血管系・心室中隔の形成に重要な役割を果たしている。われわれは、Cre-変異lox系を用いてEdnrA遺伝子座にLacZとEGFPをノックインし、心発生におけるエンドセリンA受容体(EdnrA)発現細胞の分布と動態を解析した。LacZの発現は、心臓神経堤細胞のほかに、体節形成以前から心臓半月腹側の限局した領域に認められ、その後、静脈洞から心流入路の左側壁に特徴的な左右非対称性分布を示した。この発現は二次心臓領域マーカーと一致せず、Nkx2.5・ミオシン重鎖の発現と一致した。よって、EdnrA発現細胞群は一次心臓領域の静脈洞に隣接する部分に出現する特徴的な細胞集団である可能性が示された。蛍光色素標識実験から、

LacZ/EGFP陽性細胞群は静脈洞領域から心房左側壁に沿って左心室方向に移動することが明らかになった。さらに、LacZと発生初期に刺激伝導系マーカーHCN4発現領域はほぼ一致し、その後両者の発現は次第に分かれ、洞房結節の形成過程では隣接した位置関係が保たれていた。以上より、心流入部でのEdnrA-LacZ/EGFPの発現は、心臓発生において一次心臓領域に生じる特定の細胞群を示し、非対称な心房形成と刺激伝導系の発達になんらかの役割を担っている可能性が示唆された。

##### 6. Spalt-like 4, transcriptional repressor regulates conduction system and cardiomyopathy

Cardiovascular Research, Global Edge Institute, Tokyo Tech.

Jun K. Takeuchi

Sall4 is a Spalt like zinc finger type transcription factor and human mutations of SALL4 cause Okhiro syndrome, which causes severe heart defects with myocardial layers and comprises radial ray upper limb defects that predominantly include thumb anomalies such as absent thumb or a triphalangeal digit, and anterior defects in carpals and radius, similar to human TBX5 mutations that cause Holt-Oram syndrome.

To define Sall4 function in heart defects, we generated gene-trap mice with inserted lacZ gene in Sall4 locus (Sall4GT/+). Sall4GT/GT mice were die at very early stages. The phenotypes of Sall4GT/+ heart have variety. The major phenotype in Sall4GT/+ looked single ventricle, no ventricle groove and overgrowth-trabeculae in myocardial wall, leads to hypertrophic like cardiac defects. These mutant mice display a hypoplastic atrio-ventricular (AV) node with elongated the PQ interval and decreased conduction cells there. Interestingly, Sall4 regulates cardiac transcription factor Nkx2-5 expression and maintains trabecular growth with repressor chromatin remodeling complexes in cardiomyocytes.

In this meeting we would like to focus on Sall4 pathway for cardiac hypertrophy and conduction defects in congenital heart diseases.

##### 7. 心筋における交感神経支配—神経突起伸長とシナプス形成に対する神経栄養因子の役割

名古屋大学環境医学研究所心・血管分野

三輪 佳子, 李 鍾国, 児玉 逸雄

同 発生・遺伝分野

高岸 芳子

心筋における交感神経支配に対する神経栄養因子の効果を調べた。ラット新生仔由来心室筋細胞と上頸神経節交感神経細胞を近接培養し、神経突起伸長、神経-筋接合部形成に対するnerve growth factor (NGF)およびglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の効果を、免疫染色法、電子顕微鏡写真および多電極付培養皿を用いた細胞

外電位記録法により調べ、神経栄養因子非添加のcontrol群と比較した。その結果、心筋細胞への交感神経突起(neurofilament-M)の伸長は、NGF、GDNF添加いずれの群においても、control群より促進していた。心筋細胞におけるsynapsin-1と $\beta$ 1-adrenergic receptor発現は、NGF添加群よりもGDNF添加群で亢進していた。電顕では、シナプス小胞を有する神経終末が心筋細胞に分布していた。ニコチン添加により交感神経を刺激すると、共培養した心筋細胞の自己拍動レートがGDNF群でのみ有意に増加した。以上の結果より、GDNFは心筋における交感神経支配を促進するchemoattractantとして機能することが示唆された。

#### 8. bHLH転写因子Hand2の二次心臓領域発生・分化における役割

慶應義塾大学医学部小児科

土橋 隆俊, 前田 潤, 山岸 敬幸

Gladstone Institute of Cardiovascular Disease

Deepak Srivastava

心臓は側板中胚葉の一次心臓領域(first heart field: FHF)、臓側中胚葉の二次心臓領域(second heart field: SHF)など、いくつかの由来の異なる前駆細胞により形成されることが明らかになってきた。bHLH転写因子をコードするHand2は、マウス心臓発生過程で右心室原基優位に発現する。Hand2ノックアウトマウス(Hand2KO)では、重症右室低形成が認められ、胎生10.5日に致死である。Hand2のSHFにおける役割を検討するために、コンディショナルノックアウトマウス(Hand2CKO)を作製・解析した。SHFの特定の領域にCre組換え酵素を発現する3種類のトランスジェニックマウス(① Tbx1Cre; 流出路形成細胞に発現, ② Mef2cCre; 流出路~右室形成細胞に発現, ③ Nkx2.5Cre; FHFとSHFの一部に発現, ④ Isl1Cre; SHF全体に発現)と交配し、それぞれのCre発現領域で特異的にHand2をノックアウトした結果、Tbx1Cre: Hand2CKO胚、Mef2cCre: Hand2CKO胚、およびNkx2.5Cre: Hand2CKO胚は、Hand2KO胚よりも長く生存し、それぞれ重症度の異なる肺動脈弁下漏斗部および右室の低形成を呈した。一方、Isl1Cre: Hand2CKO胚ではHand2KO胚と同一の心臓表現型が認められ、胎生10.5日に死亡した。Isl1Cre: Hand2CKO胚のSHFには、TUNNEL法で過剰な細胞死が検出され、右室前駆細胞数の減少により重症右室低形成が起こる機序が示唆された。

#### 9. microRNAが制御する心臓のchamber formation —ゼブラフィッシュを用いた解析から—

東北大学加齢医学研究所

宮坂 恒太, 木田 泰之, 小椋 利彦

microRNAは標的となるmRNAに特異的に結合し、その翻訳を阻害するnon-coding RNAである。近年、心臓発生におけるmicroRNAの重要性が数多くのデータから示されている。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、心室

と流出路の心筋層に強く発現するmiR-143に着目し、その機能解析の結果を報告する。

まず、morpholino oligoによってmiR-143の機能阻害実験を行ったところ、心室と流出路特異的に低形成を示した。この表現型は、ゼブラフィッシュを過剰なレチノイン酸(RA)で処理したものと類似していた。また、低形成となった心室の一部に、心房特異的な心筋分化マーカーの異所的な発現が確認された。この心室の心房化ともいえる表現型は、RA受容体KOマウスにおいて報告されている。そこで、miR-143の標的の探索のため、luciferase assayを行ったところ、RA合成酵素であるRaldh2に対してmiR-143が強い抑制効果を示した。

これらの結果から、miR-143によるRAシグナルの制御が、心臓のchamber formationに寄与する機構を考察したい。

#### 10. 心臓形態形成におけるテネイシンCの役割

三重大学大学院修復再生病理学

原 万里, 浪方 美幸,

イサベル ポンセデレオンバルディビリアサラ

塚本 晃代, 吉田 利通, 今中 恭子

東京女子医科大学循環器小児科

宮川-富田 幸子

テネイシンCは細胞外マトリックス蛋白の一つで、発生、癌浸潤、創傷治癒などで一過性に限られた部位に発現するという特徴を持ち、細胞動態を制御すると考えられている。心臓発生ではその特異的発現様式から心筋細胞の初期分化、クッション形成、冠動脈形成への関与が示唆される。テネイシンCの分子機能を明らかにするために、ノックアウトマウスおよびNKx2.5プロモーターを用いたテネイシンC過剰発現マウスを作製したが、いずれも心臓は大きな異常なく形成された。しかし、冠動脈が大動脈に開口する胎生13.5日に、経胎盤的にテネイシンC抗体を投与すると、新生児マウスの冠動脈起始部の開口数が有意に増加し、テネイシンCが冠動脈起始部の成熟制御に関わると考えられた。

#### 11. TGF $\beta$ の僧帽弁変性における役割

日本獣医生命科学大学獣医内科

大林 浩二

東京女子医科大学循環器小児科

宮川-富田 幸子

TGF $\beta$ は細胞の増殖や分化、細胞外基質産生を制御し、個体発生や癌転移などに関与している。哺乳類ではTGF $\beta$ 1, 2, 3の3つのアイソフォームがあり、心臓弁発生におけるEMTにTGF $\beta$ 2および3が関係している。Marfan症候群はfibrillin1遺伝子変異による全身の結合組織疾患であり、弁の粘液腫様変性による僧帽弁逸脱などの心疾患を合併する。Marfan症候群モデルマウスの僧帽弁でTGF $\beta$ 発現が増大しているという報告がなされ、僧帽弁変性にTGF $\beta$ が重要である可能性が示唆された。しかし、TGF $\beta$

が弁変性にどういった機序で関与するののかはいまだ明らかではない。

われわれは粘液腫様変性を起こしたイス僧帽弁を用いて、TGFβ発現や弁間質細胞の解析を行った。その結果、TGFβ3によって弁間質細胞の形質変化やMMP3発現増大、proteoglycans産生亢進が誘導され、僧帽弁の粘液腫様変性を起こすことが示唆された。

## 12. Hesr2ノックアウトマウスに認められる大動脈弁石灰化

国立遺伝学研究所・発生工学

小久保博樹, 相賀裕美子

東京女子医科大学循環器小児科

宮川-富田 幸子, 中嶋 八隅, 中西 敏雄

先天性大動脈二尖弁を含む大動脈弁膜症は、石灰化沈着を伴った硬化変性が一つの要因とされ、平均寿命の延長による高齢化社会において憂慮すべき重要な疾患になってきている。最近、ヒトにおいて石灰化大動脈弁膜症(二尖弁および狭窄)の原因遺伝子としてNOTCH1が同定された。しかしながらマウスにおいては、Notchシグナルに関連する因子の遺伝子改変マウスの解析では、そのほとんどが胎生致死になることにより、その分子メカニズムはいまだ明らかとなっていない。

われわれはこれまで、Notchシグナルの標的因子であるHesr2遺伝子欠損(KO)ホモマウスを作製し、房室弁低形成による閉鎖不全でそのほとんどが生後10日目までに死亡することを報告した(Circ Res 2004)。しかし、Hesr2KOホモであっても成体まで生存・生殖可能なマウスが存在したため、心エコーを用いて心機能の異常があるかどうか検討した。その結果、大動脈弁の狭窄および逆流を認め、その症例数が月齢に伴って増加することが明らかとなった。組織学的解析で、大動脈弁の肥厚および石灰化を認めた。さらに、骨形成に関連する遺伝子発現の変化が認められた。これらの結果から、Hesr2が大動脈弁における石灰化を抑制する働きがあると考えられる。

### 教育講演

#### 「構造変化からみた動脈管閉鎖機構」

早稲田大学先進理工学部・生命医科学科

南沢 享

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学

赤池 徹, 横山 詩子

動脈管は、血液中酸素分圧の上昇とプロスタグランジン濃度の低下が主因となる血管収縮(機能的閉鎖)と血管組織の構築の変化(解剖学的閉鎖)が相まって閉鎖する。主な構造変化の一つが血管内膜肥厚であり、内腔の狭小化が生じる。未熟児動脈管や先天性動脈管開存症患者・動物モデルでは、内膜肥厚の形成が未熟ないし欠損していることがしばしば認められる。われわれは、動脈管内膜肥厚形成の分子機序について、動脈管開存モデルマウ

スやラット動脈管培養平滑筋細胞を用いた実験系を用いて検討した。その結果、従来、機能的閉鎖(血管収縮拡張)を制御する因子と考えられていたプロスタグランジンやカルシウムイオンチャネルが、実は解剖学的閉鎖にも多大なる影響を及ぼしていることを見いだした。研究会では、われわれの研究も含め、解剖学的閉鎖の分子機序について明らかになってきたことを概説するとともに、解剖学的閉鎖を制御することで、動脈管の開存や閉鎖を促す治療法の開発にも言及したい。