

第4回心臓血管発生研究会

日 時：2005年7月8日(金)16:00~18:00

場 所：京王プラザホテル「扇」

運営委員長：東京女子医科大学小児循環器内科 中澤 誠

1. 心室形成におけるHand遺伝子の役割

慶應義塾大学医学部小児科

前田 潤, 土橋 隆俊, 山岸 千尋

山岸 敬幸

テキサス大学サウスウエスタン医療センター小児科

Deepak Srivastava

Hand1およびHand2は、心臓大血管発生に必須の転写因子である。鳥類胚では、両遺伝子は同様に心臓に発現し、遺伝的相補性を有する。一方、哺乳類(マウス)胚ではHand1は左心室領域に、Hand2は右心室領域に優位に発現する。Hand2ノックアウト(*Hand2*^{-/-})マウスは、右室形成不全により胎生10.5日に致死する。今回私たちは、Hand遺伝子がどのように左右心室形成に機能するかを、*Hand2*遺伝子転写領域をHand1 cDNAで置換したアレルのホモ接合(*Hand2*^{Hand1/Hand1})マウス、発生中の心臓全体に*Hand1*、または*Hand2*が過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて解析した。

結果：*Hand2*^{Hand1/Hand1}マウスは、胎生15.5日前後に胎生致死だった。このマウスの右室は低形成であったが、*Hand2*^{-/-}マウスの表現型より軽症だった。さらに、*Hand2*^{Hand1/+}マウスと*Hand2*^{+/-}マウスを交配し、*Hand2*^{Hand1/+}マウスを作製したところ、*Hand2*^{-/-}マウスと同様の右室低形成が認められ、表現型の軽症化はなかった。および；*Hand1*および*Hand2*過剰発現マウスの表現型は同様で、どちらも左右心室の区別のない単心室の形態が認められた。

結論：*Hand1*は発現量依存性に*Hand2*の機能を補うことが可能だが、この遺伝的相補性は哺乳類では部分的である。正常心発生では、*Hand1/2*の発現領域の違いにより、左右心室の区分が確立すると考えられる。

2. 肺発生における細胞間相互作用 先天性心疾患における肺血管新生の制御を目的として

京都府立医科大学大学院医学研究科発達循環病態学

山元 康敏*, 浅妻 右子, 白石 公

同 細胞分子機能病理学*

戴 平, 高松 哲郎, 浜岡 建城

先天性心疾患に対する治療法の発達によりその予後は著しく改善されてきたが、一部の重症チアノーゼ性心疾患の予後はいまだ不良であり、根治術の適応・予後は肺血管床の発達に大きく依存する。未熟な肺血管床を有する先天性心疾患に対し、その制御を目的とした新しい治療戦略を確

立するうえで科学的根拠に基づいた肺血管新生の理解が必須と考えられる。われわれの施設では肺組織を構成する細胞間相互作用について、特に血管内皮増殖因子(VEGF)およびその受容体Flk-1, Flt-1に着目し、これらの発現バランスが正常な組織化された肺毛細血管形成に重要であることを分子細胞生物学的に検討し報告してきた。本研究ではFlk-1, Flt-1の相補的制御、および動脈性血管内皮細胞への分化制御メカニズムについて報告し、さらにレチノイン酸によるright isomerismモデルマウスを用いた異常肺血管新生のメカニズム解析の可能性について言及する。

3. ビタミンAがラット動脈管遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学

南沢 享, 横山 詩子, 石川 義弘

同 小児科

岩本 眞理, 横田 俊平

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

佐藤 陽治

目的：ビタミンAの代謝物であるレチノイン酸はおもに遺伝子発現を制御することで心血管系の発達に重要な役割を果たしている。母体にビタミンAを投与すると、胎児動脈管が機能的に成熟することが過去の報告によって示唆されている。したがって、ビタミンA療法は新たな未熟動脈管閉存症の治療法となる可能性がある。ゆえにビタミンA/レチノイン酸シグナルがラット動脈管の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を調べることは、血管の分化の分子機序を理解するばかりでなく、臨床上也大変重要である。

方法：Wistarラットの動脈管を胎生19日、21日、生直後に取り出し、RNAを抽出した。Affymetrix社製ラットGeneChips(U34A)を使用し、母体ビタミンA投与の有無によるラット動脈管の遺伝子発現プロファイルの相違を調べた。

結果：母体ビタミンA投与によって、63遺伝子に2.5倍以上の発現変化を認めた。50以上の遺伝子では、今まで動脈管での働きを指摘されていなかった。ビタミンAが発現プロファイルに及ぼす影響は、各発達段階で異なっており、63遺伝子のうち、本来胎生21日目に増加すべき11遺伝子がビタミンAによって、胎生19日目にすでに発現増加していた。phosphodiesterase 5A, fibronectin, sulfonylurea receptor 2といった今まで動脈管の閉鎖機転に重要と考えられていた遺伝子もこの11遺伝子に含まれており、これらはビタミン

Aによる動脈管の成熟に関与している可能性が高いと考えられた。一方、母体ビタミンA投与によって、心臓型収縮蛋白が有意に増加したが、SM22, SM1, やSM2などの分化型平滑筋収縮蛋白は変化がなかった。この結果はレチノイン酸には平滑筋細胞の分化を促進する作用があるばかりではないことを示唆していると考えられた。

結語：マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの活用によって、レチノイン酸による動脈管分化・成熟機転をより詳細に検討することが可能である。

4. 動脈管におけるPGE₁のヒアルロン酸産生効果

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学

横山 詩子, 南沢 享, 石川 義弘

同 小児科

岩本 眞理, 横田 俊平

目的：プロスタグランジンE(PGE)は血管拡張作用を持ち、動脈管にはPGE受容体であるEP4が多く発現している。胎生期にはPGE刺激によって動脈管は開存し、生後はPGEの急激な減少と酸素への曝露により閉塞に向かうと考えられている。近年EP4欠損マウスは生後に動脈管開存症となり、これらの動脈管組織では胎生後期に起こる内膜肥厚が形成されないことが報告された。われわれはEP4受容体刺激が血管拡張作用だけでなく、血管の内膜肥厚の形成を通して生後の動脈管の閉鎖を促進するという仮説を立てた。内膜肥厚は血管内皮下のヒアルロン酸貯留と平滑筋細胞の内腔への遊走が主体と考えられていることより、動脈管でEP4 agonist(ONO-AE1-329)によるヒアルロン酸産生、平滑筋細胞の遊走能亢進効果を調べ、さらに内膜肥厚形成への効果を検討した。

方法：ラット動脈管、大動脈の平滑筋初代培養細胞にONO-AE1-329添加し、ヒアルロン酸の測定、ヒアルロン酸合成酵素変化、細胞遊走能の測定を行った。さらにラット動脈管の三次元組織培養でONO-AE1-329による内膜肥厚とヒアルロン酸産生への効果を検証した。

結果：動脈管の細胞でPGE₁、ONO-AE1-329で濃度、時間依存的にヒアルロン酸が増加し、大動脈の細胞ではこの効果はみられなかった。PGE₁でのヒアルロン酸産生効果はEP4 antagonistで完全に抑制され、ONO-AE1-329のヒアルロン酸産生効果はPKA inhibitorで完全に抑制された。ONO-AE1-329により2型ヒアルロン酸合成酵素のmRNAの発現が40倍に増加した。ONO-AE1-329で動脈管細胞における遊

走能は時間依存的に亢進した。このEP4 agonistの遊走能亢進効果は、連日の培地交換や、ヒアルロン酸分解酵素によって完全に抑制された。胎生19日の未熟児のラットをONO-AE1-329で2日間培養するとコントロールに比べて約2倍内膜肥厚が増加し、ヒアルロン酸結合蛋白(HABP)を用いた免疫染色で血管平滑筋層のヒアルロン酸産生も増加を確認した。

結語：PGE₁のヒアルロン酸産生効果は、EP4受容体を刺激し、PKAを介し2型ヒアルロン酸合成酵素の増加を介する反応である。EP4 signalはヒアルロン酸産生を通して動脈管平滑筋細胞を遊走させることで、内膜肥厚の形成に関与し、これは動脈管閉鎖の過程に必須である。

教育講演

「鰓弓・大血管形成を制御するシグナル機構」

東京大学大学院医学系研究科代謝生理化学

栗原 裕基

脊椎動物の鰓弓と大血管の形成において、神経堤細胞をはじめとするいくつかの異なる細胞間の相互作用によって前後軸、背腹軸に沿った領域特性が決定され、細胞分化・形態形成が進行する。われわれはこれまでエンドセリン-1(ET-1)遺伝子欠損マウスにおいて顎顔面および心大血管に致命的異常が生ずることを報告してきたが、最近ET-1がETA受容体を介して頭部神経堤細胞に作用し、ホメオティック遺伝子Dlx5/6の誘導を介して背腹軸に沿った神経堤細胞の運命決定に寄与していることが明らかになった。一方、鰓弓領域の前後軸に沿った領域決定はHox遺伝子群が制御していることが知られている。特に第一鰓弓は中脳後脳境界領域から産生されるFGF8によりHoxa2遺伝子発現が抑制されることにより領域特性が生じることが報告されており、鰓弓内の領域決定にはFGF8 Hox遺伝子、ET-1 Dlx遺伝子のシグナルリレーが重要と考えられた。さらに、領域決定後の鰓弓、大血管の形態形成には、染色体22q11.2欠失症候群の候補遺伝子であるTbx1と、一部領域でその下流としての第二のFGF8の関与が報告されているが、ET-1による領域決定は、鰓弓外胚葉性間葉のFGF8に対する反応性を準備するうえで不可欠であることが明らかとなった。今後、ET-1とFGF8をはじめとするシグナルの連携機構を明らかにすることにより、鰓弓と大血管形成の分子メカニズム解明が進むと期待される。