

第5回心臓血管発生研究会

日 時：2006年7月15日
 会 場：名古屋国際会議場会議室431-432
 会 長：中澤 誠(東京女子医科大学循環器小児科)
 運営委員長：三浦 直行(浜松医科大学大学生化学第二講座)

1. *Tbx2*は心内膜床形成において、*BMP2/4*のシグナルのmediatorとして重要な働きをする

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

白井 学, 森崎 隆幸

三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学

今中-吉田 恭子

Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University

Robert J. Schwartz

心臓が正常な機能を示すためには、弁などの構造により、心房・心室が正確な位置で仕切られることが最も重要であることが明らかにされている。分子生物学の発展により、現在までにさまざまな遺伝子が発見され、それらのいくつかは、心臓の形態形成に重要であることが示されつつあるが、いまだに心臓の各領域決定を制御する分子機構の詳細は解明されていない。

われわれは、T-box遺伝子群の一つである*Tbx2*に注目し、現在まで、この遺伝子が心臓形態形成時に流出部、房室管で特異的に発現し、*BMP2/4*の制御化にあることを解明してきた。今回、心臓形態形成における*Tbx2*の役割を分子生物学的に解明するために、本来発現していない心房、心室領域において、*Tbx2*を異所的に発現するトランスジェニックマウスを作成したのでその解析結果を発表する。変異マウス胎仔は、胎齢9.0日までは正常に発生するものの、その後、心房・心室の形成異常を示し、胎齢10.5日付近で死亡していた。分子生物学的手法を用いた詳細な解析の結果、心内膜床形成に重要な働きを示す*hyaluronan synthase 2 (Has2)*の異常発現を原因とするヒアルロン酸の過剰蓄積が心臓全体で生じていた。同様に心内膜床形成に重要な、*TGFβ2*の異常発現も観察された。クロマチン免疫沈降法を用いた解析から、*Has2*、*TGFβ2*両遺伝子は、*Tbx2*に直接制御されている可能性が示唆された。以上の結果から、*Tbx2*は*BMP2/4*シグナルのmediatorとして*Has2*、*TGFβ2*の発現を直接制御すること

で、心内膜床の形成に重要な役割を果たしていると推察される。

2. イノシトール三リン酸受容体は心室および心内膜床形成に必須のCaシグナリングを制御する

慶應義塾大学医学部小児科

荒巻 恵, 内田 敬子, 山岸 千尋

伊藤絵里子, 山岸 敬幸

東京大学医科学研究所脳神経発生分化・理研脳科学総合研究センター

御子柴克彦

Ca^{2+} シグナルは、心筋の収縮や心筋肥大に重要な働きをすることが知られている。私たちは、 Ca^{2+} シグナルを担う分子であるイノシトール三リン酸受容体(以下IP₃R)に着目し、ノックアウトマウスを用いて、心臓発生におけるIP₃Rの機能について検討した。

方法：(1)マウス心臓発生におけるIP₃R(1, 2型)の発現様式を、whole mount *in situ* hybridization法を用いて解析した。(2)IP₃R 1, 2型ダブルノックアウトマウス(以下DKO)の心臓発生の異常について、形態学的・組織化学的に解析した。

結果：(1)1型は胎生8.5日の静脈洞に、以降10.5日にかけて心臓全体に発現した。2型は胎生9.0日に流出路から発現し、10.5日には心臓全体に発現が広がった。胎生9.5日以降1, 2型の心臓における発現領域は、一部重複していた。(2)1, 2型おのおの単独ノックアウトマウスでは、いずれも心臓発生は正常であったが、1型、2型を同時に欠損したDKOは心室筋の菲薄化を呈し、心不全により胎生11日ころ死亡した。また、DKOの房室管部では、心内膜床形成に関与する間葉細胞が減少していた。マウス房室管部を組織培養系において、上皮-間葉細胞転換(epithelial-mesenchymal transformation: 以下EMT)がIP₃R阻害剤によって抑制された。さらにDKOでは、房室管部の心内膜細胞のマーカーであるNFATc1の核内への移行が抑制されていた。

考察：(1)IP₃R 1, 2型は、遺伝的相補性を有し、心臓の初期発生において、心内膜床の形成および心室筋の発達に必須の分子であると考えられる。(2)IP₃R 1, 2型は、心内膜床形成において、カルシニューリン/NFATc系の上流で Ca^{2+} シグナル調節因子として機能している可能性が示唆

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

山岸 敬幸

される。

3. Hesr1/Hey1 および Hesr2/Hey2 は心臓形成過程で心房と心室の境界決定に関与する

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

心臓は、心筋による拍動と心臓弁の調和のとれた動きによって血流の方向性を生み出し、血液の循環を司る。初期発生において心臓は、心内皮と心筋からなる1本の心筒から各領域が区画化され、ルーピングしながら4つの部屋と4つの弁をもつ複雑な心臓を形成していく。その過程で心房、心室はそれぞれ心房筋、心室筋と呼ばれる心筋へ分化するのに対し、心房と心室の境目は房室管と呼ばれ、将来三尖弁や僧帽弁となる心内膜床クッション組織が形成される。しかしながら、心内膜床組織がどうして房室境界領域だけに限局して形成されるのか、房室境界を形成する分子機構はいまだ不明な点が多い。

マウスのbHLH型転写抑制因子であるHesr1およびHesr2は、それぞれ心房・心室特異的に発現するが、両因子とも房室境界領域には発現しない。そこで、Hesr1とHesr2の心房と心室側からの房室領域特異化における役割を明らかにするために、それぞれの遺伝子欠損マウスの解析を行ったところ、房室境界領域がわずかに伸張することが観察された。そして、心臓全体にHesr1とHesr2を強制的に発現させた場合、房室境界領域が減少もしくは消失することを見いだした。さらに房室境界領域特異的に発現する因子との関係を調べたところ、Hesr1およびHesr2がTbx2の発現を抑制することが明らかになった。これらの結果から、Hesr1およびHesr2が房室管形成に対して抑制的に働き、心房や心室でのTbx2発現を抑制することによって房室境界を保持していることが示唆された。

4. 動脈管におけるT型カルシウムチャンネルの役割

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, 全 紅

岩本 真理, 石川 義弘, 南沢 享

背景：平滑筋の収縮は電位依存性カルシウムチャンネル(voltage-dependent Ca^{2+} channel: VDCC)を介した細胞内カルシウムの上昇により生じるため、VDCCは動脈管の閉鎖にも重要な役割を担っていると考えられる。われわれは先行研究で胎生末期のラット動脈管においてT型VDCCのサブタイプである α_1G サブユニットが内膜肥厚部に強く発現していることを明らかにした。また α_1GmRNA の発現が動脈管において出生後に上昇するが、一方大動脈では低下することを見いだした。このことから、T型VDCC、特に α_1G サブユニットが出生直後の動脈管の閉鎖に重要なかわりをもつと考えた。

目的：動脈管収縮におけるT型VDCCの役割を解明する

こと。

方法：すべての実験で胎生21日目のWistar ratの動脈管を用いた。(1)酸素分圧が α_1GmRNA の発現に及ぼす影響をRT-PCR法で検討した。(2)選択的T型VDCC阻害薬[R(-)-efonidipine]を用い、酸素による動脈管収縮へのT型VDCCの関与を検討した。

結果：(1)低酸素分圧から正常酸素分圧に培養条件を変えると、 α_1GmRNA の発現は1.5倍に増加した。(2)酸素反応性の動脈管収縮に対し、R(-)-efonidipineは濃度依存性に拡張させた。R(-)efonidipine10-6Mで74%まで拡張した($p < 0.01$)。

結論：T型VDCCを介する Ca^{2+} 流入は、出生後の動脈管の酸素反応性血管収縮機序の一端を担うと考えられた。

教育講演

“Heart and hand syndrome: Combinatorial regulation of T-box, spalt transcription factors, and the chromatin-remodeling complexes”

Cardiovascular Research, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Cardiovascular Disease of Gladstone Institute and UCSF, CA, USA

Jun K. Takeuchi

Recent remarkable advances in mouse genetic manipulation have resulted in a wealth of information about organ development, specification, and the identification of gene mutation that cause congenital diseases. However it is difficult to determine regional intricacies of the development of each organ, because there are complicated gene-combinations, gene-redundancy, or target genes lie most upstream of developmental cascade, resulting embryonic death at the very early stage. To understand these questions, I first focus on transcription factors (*Tbx20* and *Sall4*). Transcription factors regulate many aspects of heart development and they function to determine regional specification, especially T-box genes. *Tbx20* expression starts from very early cardiac crescent stage, function right ventricle formation cooperately with *Islet1* and *Nkx2-5*, by using *in vivo* RNA interference (RNAi) strategy (Takeuchi, et al: Development 2005). *Sall4*, which is zinc-finger type *Spalt-like* transcription factor, cooperately functions for heart chamber formation with *Tbx5* (Koshiba-Takeuchi, et al: Nature Genet 2006). These results indicate that each transcription factor specifies intricate organ cooperately with other transcription factors. Thus combinational knockdown of transcription factors is important to understand regional intricacies of the development in each organ. From another view to understand these question, I studied chromatin-remodeling factors. Chromatin structure is one of the most important regulatory mechanisms that control access of transcription factors to

their DNA binding elements and to regulate their target gene expression (Lickert, et al: Nature 2004; Takeuchi, et al: Proc Nat Acad Sci USA 2007). I have shown one of SWI/SNF type chromatin remodeling factors, Baf60c, which cooperates with specific transcription factors, is essential for cardiac development. Thus chromatin-remodeling complexes not only modulate chromatin assembly, but also have specific function with tissue specific factors to establish heart formation.