慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	細胞内カルシウムシグナル伝達による心臓発生の領域別制御とその分子機構の解明
Sub Title	Molecular regulation of intracellular calcium signaling in the region-specific cardiac development
Author	山岸, 敬幸(Yamagishi, Hiroyuki) 内田, 敬子(Uchida, Keiko) 山岸, 千尋(Yamagishi, Chihiro) 牧野, 伸司(Makino, Shinji)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	細胞内Ca2+動態を担う分子群の一つであるイノシトール三リン酸受容体(IP3R)には3つのサブタイプ(1、2、3型)があり、いずれも心臓に発現している。これまで心臓発生におけるIP3Rの生理的意義は不明だったが、私たちは、1型2型IP3R ダブルノックアウト(DKO)マウスでは心内膜床と心筋の発生異常が、また1 型3 型IP3R DKOマウスでは右心室と心臓流出路の発生異常が起こることを明らかにした。1型2型IP3RはNFATc系に、1型3型IP3Rは二次心臓領域に関与する分子を制御することが示唆された。以上より、IP3-IP3R系が受容体サブタイプ特異的に細胞内Ca2+シグナルを調節し、遺伝的相補性をもって心臓発生を領域別に制御することが解明された。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2007～2009 課題番号：19390288 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19390288seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C -19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：１９３９０２８８
研究課題名（和文） 細胞内カルシウムシグナル伝達による心臓発生の領域別制御とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular regulation of intracellular calcium signaling in the region-specific cardiac development

研究代表者
山岸　敬幸（YAMAGISHI HIROYUKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：４０２５５５００

研究成果の概要（和文）：細胞内 Ca^{2+}動態を担う分子群の一つであるイノシトール三リン酸受容体（IP_3R）には 3 つのサブタイプ（1、2、3 型）があり、いずれも心臓に発現している。これまで心臓発生における IP_3R の生理的意義は不明だったが、私たちは、1 型 2 型 IP_3R ダブルノックアウト（DKO）マウスでは心内膜床と心筋の発生異常が、また 1 型 3 型 IP_3R DKO マウスでは右心室と心臓流出路の発生異常が起こることを明らかにした。1 型 2 型 IP_3R は NFATc 系に、1 型 3 型 IP3R は二次心臓領域に関与する分子を制御することが示唆された。以上より、IP_3-IP_3R 系が受容体サブタイプ特異的に細胞内 Ca^{2+}シグナルを調節し、遺伝的相補性をもって心臓発生を領域別に制御することが解明された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular calcium signaling is known to play essential roles in cardiac physiology and hypertrophy, however, its function in cardiac development remains to be elucidated. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3R type1, 2 and 3) are intracellular calcium release channels on the endo/sarcoplasmic reticulum. IP_3R1, 2 double knockout mouse (DKO) embryos and IP_3R1, 3 DKO embryos died around E10.5 with signs of heart failure while each single knockout mouse showed normal cardiogenesis. In the IP_3R1, 2 DKO embryos, the atrioventricular cushion development was impaired involving the NFATc signal, whereas the outflow tract development, implicated in the second heart field, was affected in the IP_3R1, 3 DKO embryos. This research project revealed that intracellular calcium signaling redundantly mediated by three subtypes of IP_3R may play a role in development of each specific module of cardiovascular development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総　計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：細目：内科系臨床医学・小児科学
キーワード：小児循環器学

１．研究開始当初の背景

先天性心疾患は、出生 1000 人につき 5〜10 人におこる最も頻度の高い先天異常の一つであり、心臓発生の異常に起因する。高等動物の心臓発生は、時間的、空間的に秩序だった多く複雑な過程、すなわち由来の異なる細胞集団の移動、増殖、分化、プログラム細胞死、相互作用によって成立する。複雑な心臓発生の過程は、次の重要な領域および段階別に分けて考えると理解しやすい：1) 左右心室の発生、2) 心内膜床の発生と房室弁の形成、3) 心筋層の発達と心室中隔の形成、4) 左右心房と心房中隔の形成、5) 心臓流出路の発生。日常診療で遭遇する多くの先天性心疾患は、これらいずれかの領域の特異的な発生異常であり、全般的な発生異常は胎生致死と考えられる。したがって、心臓発生を領域別に制御する遺伝子の解析は、先天性心疾患の発症分子機構を解明する上でも重要である。

最近の研究により、心臓の各領域の発生にはいくつかの由来の異なる前駆細胞が協調的に働き、転写因子、増殖因子などをコードする多くの遺伝子が関与することが判明してきた。例えば心臓流出路の発生には、側板中胚葉細胞と神経堤細胞以外に、二次心臓領域（咽頭弓中胚葉領域）に由来する心筋前駆細胞が関与することが判明した（Waldo et al. Development 2001; Kelly et al. Dev Cell 2001）。研究代表者らはこれまでに、転写因子 Tbx1 が二次心臓領域に発現し、Fox 転写因子の制御を受け、線維芽細胞増殖因子 Fgf8/10 を介して、心臓流出路の発生に機能することなどを解明し（Yamagishi et al. Genes Dev 2003; Hu et al. Development 2004）、心臓発生の分子機構に関する研究の進歩に貢献してきた。この分野のさらなる発展には、転写因子を活性化する上流のシグナル経路や下流の標的遺伝子、増殖因子の刺激によって活性化される細胞内シグナル伝達系について研究することが不可欠である。

Ca^{2+}は、細胞内シグナル伝達系において重要な役割を果たす分子である。最近、calcineurin（CN）、calreticulin などの細胞内 Ca^{2+}シグナルに関わる分子が、心臓発生において機能する可能性が示唆された（Chang et al. Cell 2004; Mery et al. Mol Biol Cell 2005）。CN は Ca^{2+}依存性の脱リン酸化酵素であり、基質である転写因子 NFATc を活性化し、心筋細胞の増殖・肥大および心臓の弁形成に関与するシグナル伝達分子として注目される。しかし、心臓発生において細胞内 Ca^{2+}濃度がいかにして上昇し、CN/NFATc シグナル系を活性化するのかは不明である。

細胞内 Ca^{2+}動態を担う分子群の一つであるイノシトール三リン酸受容体（IP_3R）は、ほぼ全ての細胞内の（筋）小胞体上に存在し、卵の受精時の Ca^{2+}波や神経系のシナプス可塑的現象など、多くの生体機能を司る。細胞外刺激によって形質膜から遊離した IP_3 が IP_3R に結合すると、細胞内の Ca^{2+}貯蔵庫である筋小胞体から Ca^{2+}が放出される。IP_3R には 1、2、3 型のサブタイプがあり心臓でも発現が認められるが、心臓発生における IP_3R の生理的意義は未だ不明である。

２．研究の目的

心臓発生における IP_3-IP_3R-Ca^{2+}シグナル系の役割と分子機構を解析することにより、細胞内 Ca^{2+}シグナル伝達による心臓発生の領域別制御の分子機構を解明することを目的とした。

具体的には、「IP_3-IP_3R 系は、受容体サブタイプ特異的に細胞内 Ca^{2+}シグナルを調節し、遺伝的相補性をもって心臓発生を領域別に制御する」という仮説を、1 型 2 型 IP_3R ダブルノックアウト（DKO）マウス、および 1 型 3 型 IP_3RDKO マウスの表現型を詳細に解析することにより検証する。

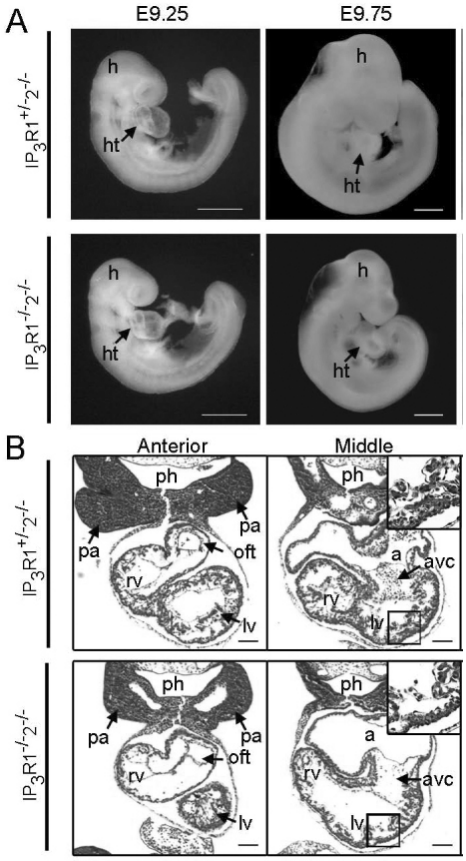
３．研究の方法

1 型 2 型 IP_3RDKO マウスにおける心内膜床の発生異常について、心内膜細胞の分化、心筋細胞の分化、心ゼリーの形成、心内膜細胞の間葉細胞への形質転換のどのステップに異常があるかを明らかにし、心筋細胞の増殖能とアポトーシスの解析を行い、心筋層の形成不全の原因を解明する。また、1 型 3 型 IP_3RDKO マウスにおける心臓流出路および右心室発生異常について、側板中胚葉由来細胞、二次心臓領域由来細胞、神経堤由来間葉系細胞のうち、どの細胞の発生分化に異常があるかを検討し、流出路および右心室形成異常の原因を明らかにする。そして、これら DKO マウスを用いて、その遺伝子発現を野生型マウスと比較検討することにより、細胞内 Ca^{2+}シグナルに制御され、心臓の各領域の発生に機能する新たな分子機構を解明する。さらに、IP_3-IP_3R 系が心臓の領域別発生に果たす役割が、種を越えて保存された普遍的なものであることを、ゼブラフィッシュおよび組織培養を用いて確認する。

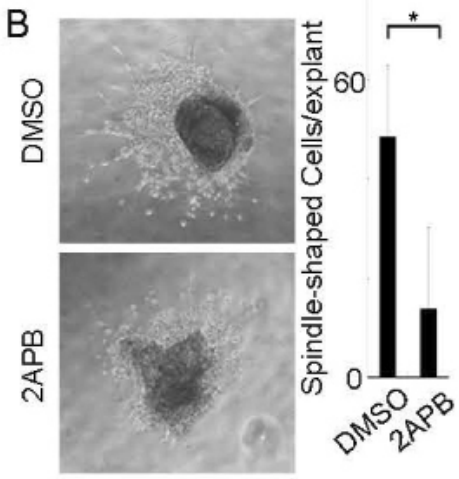
４．研究成果

1 型、2 型 IP_3R DKO マウスでは、胎生 9.5 日頃より心内膜床の形成異常、胎生 10.5 日頃より心室壁の菲薄化が認められ、胎生致死と

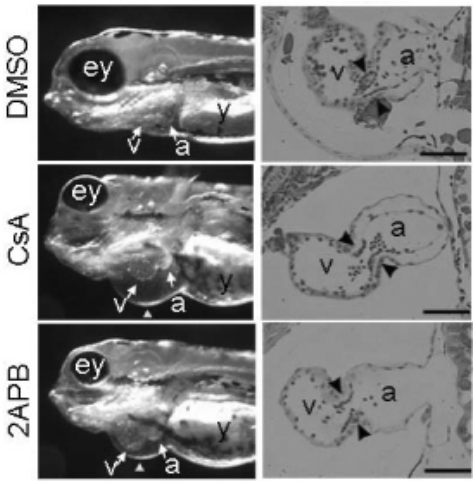
なる。胎生 9.5 日頃の房室管部の解析では、心ゼリーを形成する細胞外基質は正常だったが、心内膜床形成に関与する間葉細胞の減少が認められた（図１）。



マウス房室管部を組織培養し、上皮–間葉細胞転換（以下、EMT）について観察したところ、EMT が IP_3R 阻害剤（2APB）によって抑制されることが判明した（図２）。

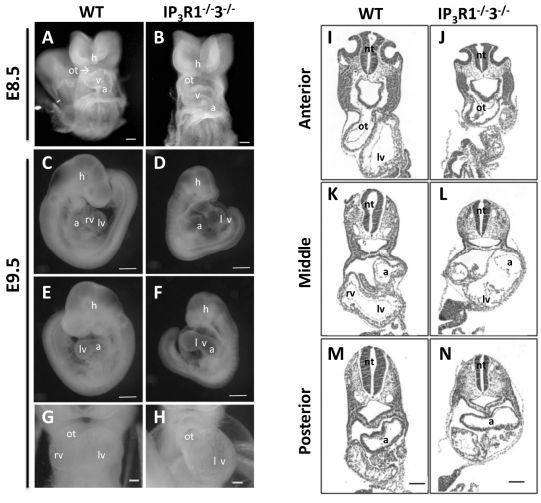


分子マーカーを用いた検討では、心内膜細胞に発現する NFATc1 の核内への移行が、1 型、2 型 IP_3R DKO マウスの房室管部において、野生型に比して抑制されていた。ゼブラフィッシュを用いた検討では、心臓発生期の胚に IP_3R 抑制剤を投与すると、カルシニューリン抑制剤（サイクロスポリン A：CsA）を投与した胚および 1 型、2 型 IP_3RDKO マウスと同様に、心内膜床形成における EMT が障害され、房室弁異常が発症した（図３）。

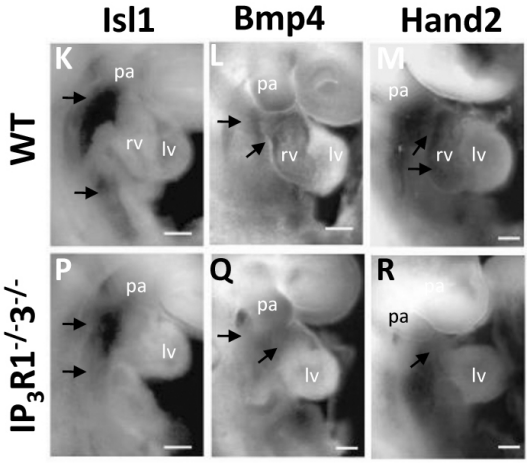


一方、胎生 9.5 日の 1 型、2 型 IP_3RDKO マウスの心室では TUNEL 陽性細胞の増加はみられなかったが、BrdU および phospho-histone H3 陽性細胞は有意に減少しており、DKO の心室壁菲薄化は細胞増殖の低下に起因すると考えられた。以上より、1、2 型 IP_3R は心内膜床形成領域において、カルシニューリン/NFATc 系の上流の Ca^{2+}シグナル調節因子として、また、心室領域において細胞増殖を制御する Ca^{2+}シグナル伝達系として、相補的に機能することが示唆された。さらに、IP_3R 機能喪失による上記表現型について、サイトメガロウイルス（CMV）ベクターを用いて NFATc を過剰発現することによりレスキューする in vitro の実験系を確立し、この結果を検証した（PLoSONE 査読済改訂中）。

1 型、3 型 IP_3RDKO マウスでは、胎生 9.5 日頃より心臓流出路の低形成が認められ、胎生致死となった（図４）。



分子マーカーを用いた検討では、二次心臓領域に発現する特異的マーカー遺伝子 Isl1 の発現領域が減少し、同時に Bmp2 の二次心臓領域における発現が低下していた（図５）。1 型、3 型 IP_3R DKO マウスの同領域では、野生型に比して、phospho-histone H3 陽性細胞の数には変化がなかったが、TUNEL 陽性細胞の増加が認められ、細胞死の亢進による細胞数の減少が示唆された。二次心臓領域由来の細胞は心臓流出路前駆細胞として発生し、胎生期の流出路である円錐動脈幹の筋層を形成する。本研究の結果より、1 型、3 型 IP_3R は二次心臓領域の発生において相補的に機能し、心臓流出路を形成する前駆細胞の生存に必須であることが示唆された（投稿中）。



さらに、1,3DKO では、卵黄嚢上の原始血管叢の形態異常、胎仔体節間血管の分枝不整、背側大動脈の狭小化、迷路胎盤における胎仔血管の母体側への伸長障害など、胎仔全体および卵黄嚢、胎盤に至る広い範囲で血管発生異常が認められ、血管新生マーカーの発現が低下していた。HUVEC を用いた in vitro の実験系で、IP_3R を抑制すると血管管腔形成能および血管内皮細胞遊走能が有意に低下した。以上の結果より、1 型、3 型 IP_3R が血管内皮細胞において血管新生に機能することが新たに示された（投稿準備中）。

本研究成果の意義は、心臓発生、特に心内膜床形成と流出路形成において必須の細胞内 Ca^{2+} シグナルの分子機構が解明されたことにある。心内膜床および流出路の形成におけるシグナル伝達機構の解明は、将来的に先天性心疾患に対する新しい治療法として、房室弁機能不全の再生医療、流出路再建の再生医療に必要な再生医学の発展の基礎となることが期待される。

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　5　件）

①Yamagishi H, Maeda J, Uchida K, Tsuchihashi T, Nakazawa M, Aramaki M, Kodo K, Yamagishi C. Molecular embryology for an understanding of congenital heart diseases. Anatomical Science International 2009; 84: 88-94（査読有）

②Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Yamamura E, Joo K, Takahashi T, Rumiko Matsuoka R, Yamagishi H. GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphoring-plexin signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009; 106: 13933-13938（査読有）

③山岸敬幸、古道一樹、仲澤麻紀、土橋隆俊、山岸千尋. 先天性心疾患発生における外的・環境因子と予防の可能性. Heart View 2008: 12; 1213-1219（査読無）

④ Yamagishi H, Uchika K, Aramaki M, Mikoshiba K, Ito E, Kodo K, Yamagishi C. Essential role of intracellular calcium signaling in the cardiac development. Future aspect of medical sciences and education 2007; 1: 26-28（査読無）

⑤山岸敬幸、先天性心疾患の理解を深める Molecular Embryology 日本小児循環器学会雑誌 2007; 23: 364-372（査読有）

〔学会発表〕（計　６　件）

① 山岸敬幸、ワークショップ：心臓大血管形成における器官形成メカニズムの普遍性と独自性「心臓流出路の発生と先天性心疾患の発症分子機構」第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日神奈川県横浜（パシフィコ横浜）

② 山岸敬幸、教育講演：Overview「心臓流出路・大血管の発生」第 8 回心臓血管発生研究会 2009 年 7 月 25 日福島県郡山

③ 山岸敬幸「多因子遺伝と先天性心疾患」第 44 回日本小児循環器学会学術集会シンポジウム 2008 年 7 月 4 日福島県郡山

④ 山岸敬幸「心臓血管発生：先天性心疾患予防は可能か？」第 44 回日本小児循環器学会学術集会シンポジウム 2008 年 7 月 2 日福島県郡山

⑤ Yamagishi H. Congenital Heart Defects From Generation to Regeneration: Development of Normal and Abnormal Heart. Workshop at the Pediatric Academic Society 2008.5.4. Hawaii

⑥ 山岸敬幸「心臓発生の領域別制御と先天性心疾患の発症分子機構」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会 2007 年 12 月 11-15 日パシフィコ横浜

〔図書〕（計　１件）
① 山岸敬幸、白石公編、メジカルビュー社、先天性心疾患を理解するための臨床心臓発生学 2007 年総ページ数 228 ページ

〔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
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
山岸　敬幸（YAMAGISHI HIROYUKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：４０２５５５００

(2)研究分担者
内田　敬子（UCHIDA KEIKO）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：５０２８６５２２

山岸　千尋（YAMAGISHI CHIHIRO）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：１０２９６６１８

牧野　伸司（MAKINO SHINJI）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：２０３０６７０７

(3)連携研究者　なし