

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

先天性心奇形発生機序の解明：
心内膜床形成にかかわる因子の網羅的な解析

受賞者 山岸 敏之（埼玉医科大学解剖学教室）

共同研究者 奥田 晶彦*

心内膜床は初期胚心臓に生じる弁や中隔の原基で、房室管と流出路の心内皮細胞が間葉細胞に転換して形成される。心内膜床の形成異常は先天性心疾患の原因の一つになる。この心内膜床形成で起こる内皮-間葉形質転換は、心筋から分泌される未知のシグナル因子と心内皮細胞から分泌されるTGF- β (Transforming growth factor- β : 形質転換成長因子- β)によって制御されていることが示されている。私たちは心筋細胞からのシグナルの一つがTGF- β ファミリーに属するBMP2 (Bone morphogenetic protein 2: 骨形成因子2)であり、心内皮細胞の形質転換のときにTGF- β 3と協調的に作用することをはじめて明らかにした。またこの実験から、BMP2とTGF- β 3の作用経路とは異なる経路が存在する可能性が明らかになった。そこで房室管領域に発現する遺伝子を調べることにより、この経路を明らかにすることを計画した。本研究の目的は、胚心臓の各領域に発現する遺伝子を網羅的に解析することで房室管領域特異的な遺伝子群を同定し、これらの情報をもとに心内膜床形成にかかわる因子を生物検定により明らかにすることである。

9.5~10.5dpc (days of post-coitus)のマウス胚750匹の心臓を微小外科手術により、心室、房室管、心房の各領域に切り分けた。これらの領域からDNAマイクロアレイに必要なmRNAを精製し、プローブを合成した。そしてDNAチップ(Affymetrix社)を用いて心臓の各領域に発現する遺伝子の網羅的な解析を行った。心室、房室管、心房の各領域での遺伝子発現量を比較したところ、房室管領域に多く発現する遺伝子約400個が明らかになった。これらの遺伝子のなかには、私たちがこれまでに機能を明らかにしてきたTGF- β やBMP、転写因子であるtbx遺伝子群も含まれていた。上皮細胞の形質転換には、様々な成長因子や転写因子

がかかわっていることが明らかにされつつある。このことから房室管に発現する遺伝子の中でも、まず最初に成長因子と転写因子に注目し解析することにした。成長因子については、心内膜床形成への関与が明らかでないSCF (stem cell factor, c-kit ligand), PDGF-C (platelet derived growth factor-C), IGF-1 (insulin like growth factor-1)についてその機能を調べることにした。機能解析は、マウス胚では微小外科手術が困難であり生物検定が難しいこと、これまでの技術や知識の蓄積が豊富であることからニワトリ胚心臓をつかった器官培養系でおこなった。この検定は次のように行なう。ニワトリ胚心臓の心内膜床形成領域を切り出し、コラーゲンゲル上で培養する。このとき心筋細胞とともに心内皮細胞を培養すると、心内皮細胞は形質転換しコラーゲンゲル内に侵入する(図A, B)。一方、心内皮細胞だけを培養した場合には心内皮細胞の形質転換はおこらない(図C)。このようにコラーゲンゲル内への心内皮細胞の侵入の有無により、形質転換能が判定できる。そこで心内皮細胞だけを培養し、培養液中にSCF, PDGF-C, IGF-1をそれぞれ投与した。しかしながら、心内皮細胞の遊走や形質転換はみられなかった。次にこれらの成長因子が心筋細胞からの液性因子として作用しているBMP2と協調しているかどうかを確かめるため、BMP2とともに投与し心内皮細胞の形態変化を観察した。しかしこのときも心内皮細胞の遊走やコラーゲンゲル内への進入は観察できなかった(図D, E, F)。これらの因子についてはさらに別の成長因子との関係を検討中である。一方、心内膜床領域に発現する転写因子についてはホメオボックスタイプの転写因子に注目した。ホメオボックス遺伝子は、発生過程で生物の形づくりにかかわる転写因子群である。これらの遺伝子産物を心内皮細胞で発現させるため全長クローニングを行い、これまでに2つのホ

*埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門

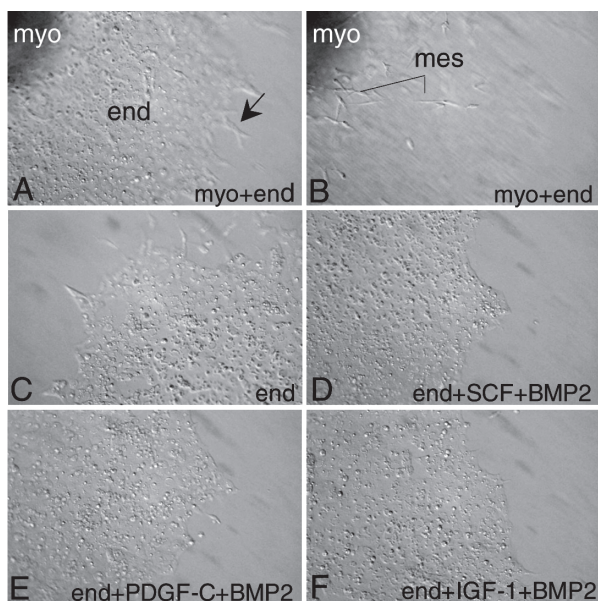


図. 心内皮細胞に対するSCF, PDGF-C, IGF-1の形質転換実験(48時間培養). A: コラーゲンゲル上での心筋細胞(myocardium; myo)と心内皮細胞(endothelial cell; end)の共培養. 心内皮細胞の遊走(矢印)がみられる. B: Aの実験のコラーゲンゲル内部の様子. 心内皮細胞から形質転換した間葉(mesenchymal cell; mes)がある. C: 心内皮細胞だけを培養した場合. 心内皮細胞の遊走やゲル内への間葉細胞の浸潤はみられない. D: SCFとBMP2を同時に投与したとき. E: PDGF-CとBMP2を同時に投与したとき. F: IGF-1とBMP2を同時に投与したとき. D, E, Fでは心内皮細胞だけを培養したときと同じような形態を示した.

メオボックス遺伝子のクローニングを完了した. 今後これらの遺伝子を発現ベクターに組み込み生物検定を行なう予定である.

学会発表

Yamagishi T, Nakajima Y, Nishimatsu S, Nohno T, Ando K, Sakabe M, Nakamura H. Expression patterns of *tbx* genes during chick atrial development. *Experimental biology*. April 1-5, 2006. San Francisco.