

Notch シグナル遺伝子操作による
心血管形成の分子メカニズムの解明

課題番号 15590175

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)一般）
研究成果報告書



平成 17 年 3 月

研究代表者 富松宏文
(東京女子医科大学医学部助手)



研究課題

Notch シグナル遺伝子操作による
心血管形成の分子メカニズムの解明

課題番号 15590175

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)一般）
研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 富松宏文
（東京女子医科大学医学部助手）

目次

1. 研究組織
2. 交付決定額（配分額）
3. はしがき
4. 研究発表
5. 研究成果

1. 研究組織

研究代表者：富松宏文（東京女子医科大学医学部助手）

研究分担者：富田幸子（東京女子医科大学医学部助手）

研究分担者：小久保博樹（国立遺伝学研究所系統生物研究センター助手）

2. 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	2,400	0	2,400
平成 16 年度	1,200	0	1,200
総計	3,600	0	3,600

3. はしがき

発生初期に心臓は、からだに酸素と栄養を送る重要な器官であり、血管は心臓から押し出された血液を運ぶ重要な役目を担っている。最近の分子・細胞工学的研究により心臓と血管の研究は、スピードが一段と加速してきた。我々の調べた範囲では、これまでに約 61 種類の遺伝子を欠失させたマウスで心臓血管異常の原因遺伝子が検討され、徐々に心血管形成、すなわち体軸、心臓前駆細胞、心ループ、心チューブ、各四つの部屋、心臓神経堤細胞などに関わる遺伝子群が明らかにされつつある。最近では、secondary heart field や心外膜前駆組織 proepicardial organ が、心臓形成に関与する細胞群として脚光を浴びており、心臓を構成する細胞の起源はいろいろであることが判明していることから、心臓は heterogenous な器官として認識されつつあり、このことは、再生医療にも何らかのヒントを与えている。例えば secondary heart field に特異的に発現する遺伝子 *Islet-1* が心筋の再生医

療にも役立つ可能性が出ている (Laugwitz ら、Nature 2005 ; 433 : 647)。

Notch シグナルは種を超えて保存されており、発生において細胞の増殖・分化、運命決定に関与し、細胞間の直接的な接触を介する情報伝達において中心的な役割を果たしている。最近、Notch シグナル伝達系のメンバーである Delta4 リガンド、Jagged1 リガンド、Notch1、2、4 レセプター、RBP-J κ 転写調節因子などが心血管形成に関与していることが報告されている。我々は Notch シグナル伝達系の下流に位置する *hairy and enhancer of split-related* (*hesr*) 遺伝子の心臓血管形成における機能について研究成果を報告する。*hesr* 遺伝子 (*hrt*、*chf*、*hey*、*herp*、*gridlock* とも呼ばれている) は、bHLH 転写因子で、Notch シグナルの下流に位置する転写抑制遺伝子である。

hesr2 遺伝子を欠失させたマウスでは心臓の弁および心筋に異常を認めた。さらに、サブタイプの *hesr1* と *hesr2* が心臓および血管で協調的な役割をすることを本研究で明らかにした。このことは、*hesr* 遺伝子が心臓形成と血管形成の両方に関わることを示している。今後、ヒトで心臓及び血管系疾患で *hesr* 遺伝子の変異について研究なされれば、*hesr* 遺伝子を中心とした遺伝子カスケードに新たな注目が集まるであろう。

4. 研究発表

(1) 学会誌等

1. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T (2003) First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation* 108,1729-1734.
2. 岩崎淳一、宮川-富田幸子、森 善樹、富松宏文、中澤 誠、富澤康子、遠藤真弘、小久保博樹 (2004) マウスの心電図計測方法：生後5日目の baby から adult まで。呼吸と循環、52 (2) : 203-206
3. Naruse M, Otsuka E, Naruse M, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Hagiwara H (2004) Inhibition of osteoclast formation by 3-methylcholanthrene, a ligand for arylhydrocarbon receptor: suppression of osteoclast differentiation factor in osteogenic cells. *Biochem Pharm*, 67, 119-127.
4. 宮川-富田幸子、吉田-今中恭子、杉村洋子、富澤康子、中澤 誠 (2004) 冠動脈の発生と発達に関する最近の知見. 冠疾患誌、10 : 55-60.
5. Tsukamoto Y, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Hagiwara H (2004) Tributyltin inhibits ossification in vivo and differentiation of osteoblasts in vitro. *Biochem Pharm*, 68, 739-746.
6. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL (2004) Targeted disruption of *hesr2* results atrio-ventricular valve anomalies, leading to cardiac dysfunction and perinatal lethality. *Circ Res*, 95, 540-547.
7. Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Komatsu K, Nakazawa M, Fukaya T, Baba K, Yutani C (2004) Immunohistochemical study of apparently intact coronary artery in a child after Kawasaki disease. *Pediatr Int* 46(5), 590-596.
8. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL (2005). *hesr1* and *hesr2* are redundantly required for cardiac chamber formation and arterial formation. *Dev Biol* 278(2), 301-309.

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Johnson RL. Hesr, a mediator of the Notch signaling, functions in heart and vessel development. Trends in Cardiovascular Medicine(投稿中)

(2) 口頭発表等

1. 今野結子、米田早織、宮川-富田幸子、星 桂芳、植松 宏、石原陽子 (2003年3月) マウス胎仔骨の発達を指標とした合成女性ホルモンの濃度反応曲線について。第73回日本衛生学会、大分
2. Nakashima Y, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M. (2003 May 16-17) Effect of high dose epinephrine stress in late fetal phase of chick. Weinstein Cardiovascular Meeting, 62, Boston, MA, USA
3. Sugimura Y, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M. (2003 May 16-17) Effect of the cardiac neural crest for the coronary angiogenesis and/or vasculogenesis. Weinstein Cardiovascular Meeting, 60, Boston, MA, USA
4. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Saga Y, and Johnson RL. (2003 May 16-17) Function analysis of hesr genes in cardiovascular development. Weinstein Cardiovascular Meeting, Boston, 102, MA, USA
5. Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Takahashi Y, Inoue T, Kanno J, Saga Y. (2003) *MesP1* and *MesP2* are essential for the cardiogenesis in mice. International Sympo Developmental Biology and Tissue Engineering.
6. 北嶋 聡、宮川-富田幸子、高橋 雄、井上 達、菅野 純、相賀祐美子 (2003年6月11-13日) 転写因子 *MesP1* および *MesP2* の心臓中胚葉形成における役割。第36回日本発生生物学会、札幌、1P79.
7. 小久保博樹、宮川-富田幸子、富松宏文、中畷八隅、杉村洋子、中澤 誠 (2003年7月16-18日) 心臓形態形成における *hesr* 遺伝子群の機能解析。第39回日本小児循環器学会、神戸、19(3), 268.
8. 杉村洋子、宮川-富田幸子 (2003年7月16-18日) ウズラ心における冠血管新

- 生に対する心臓神経堤の影響について。第 39 回日本小児循環器学会、神戸、19(3), 322.
9. 小久保博樹、宮川-富田幸子、富松宏文、中寫八隅、中澤 誠、佐賀祐美子、Johnson RL. (2003 年 7 月 18 日) 心臓形態形成における *hesr* 遺伝子群の機能解析。第 2 回心臓血管発生研究会、神戸、5.
 10. 塚本 優、宮川-富田幸子、石原陽子、萩原啓実 (2003 年 12 月 2-3 日) トリプチルスズによるマウス・ラット頭頂骨骨形成異常の解析。環境ホルモン学会第 6 回研究会、仙台
 11. 北嶋 聡、宮川-富田幸子、菅野 純、井上 達、相賀祐美子 (2003 年 12 月 10-13 日) マウス心臓中胚葉形成に必要な転写因子 *MesP1*, *MesP2*。第 26 回日本分子生物学会、神戸、S1E-1
 12. 黒原一人、小松紘司、若月修二、宮川-富田幸子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鍋島陽一、瀬原淳子 (2003 年 12 月 10-13 日) 心臓形成におけるメルトリン β /ADAM19 の役割。第 26 回日本分子生物学会、神戸、S1E-6
 13. 小久保博樹、宮川-富田幸子、富松宏文、中澤 誠、Johnson R、相賀祐美子 (2003 年 12 月 10-13 日) 心臓形成における *hesr* 遺伝子群の機能解析。第 26 回日本分子生物学会、神戸、3PB-098
 14. Hanato T, Watanabe N, Nakazawa M, Miyagawa-Tomita S, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. (2003, Dec 13-17) Tenascin-C may be involved in the development of the coronary artery. The American Society for Cell Biology 43rd Ann Meet, San Francisco, CA
 15. Nakashima Y, Miyagawa-Tomita S, Sugimura H, Nakazawa M (2004, May 13-16) Effect of high dose epinephrine stress in late fetal phase of chick. Weinstein Cardiovascular Development Conference, F134, Leiden, The Netherlands.
 16. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Y, Saga Y, Johnson RL (2004, May 13-16) *hesr1* and *hesr2* gene knockouts have a synergistic effect on mouse cardiogenesis and angiogenesis. Weinstein Cardiovascular Development Conference, E108,

Leiden, The Netherlands.

17. 小久保博樹、宮川-富田幸子、相賀祐美子 (2004, 7月2日) *hesr1* と *hesr2* 遺伝子の心臓血管における役割。心血管形態形成研究会、2、東京
18. 正木めぐみ、栗崎知浩、若月修二、小松紘司、湯本法弘、増田亜紀、東利圭、横関智一、栗原一人、宮川-富田幸子、瀬原(藤沢)淳子 (2004, 12月8-11日) 細胞の増殖・分化における ADAM プロテアーゼの役割。第27回日本分子生物学会年会、W3R-1, 神戸.
19. 渡辺裕介、小久保博樹、宮川-富田幸子、五十嵐勝秀、菅野 純、相賀祐美子 (2004, 12月8-11日) マウス心臓における Notch1 シグナリングの機能解析。第27回日本分子生物学会年会、2PA-459, 神戸.
20. 小久保博樹、宮川-富田幸子、相賀祐美子 (2004年12月8-11日) 心臓血管形成における *hesr1* と *hesr2* の協調的な機能。第27回日本分子生物学会年会、2PA-460, 神戸.

(3) 報告書

1. 宮川-富田幸子、小久保博樹、中澤 誠 (2004) 心臓に発現するシグナル分子の検討。—Notch シグナル伝達系の心血管形態形成における役割— 東京女子医科大学総合研究所紀要、2003年度報告書、24、57-58.
2. 石原陽子、今野結子、棚沢静香、工藤千穂子、越智真里子、山本道子、富田幸子、萩原啓実 (2004) 内分泌攪乱化学物質トリブチルスズのマウス胎仔骨発達への影響。東京女子医科大学総合研究所紀要、2003年度報告書、24、32-33.
3. 竹内 隆、宮川-富田幸子、中澤 誠 (2004) 心筋細胞の増殖停止機構の解明と心筋再生医療。(財)日本心臓血圧研究振興会、平成15年度研究業績集、No. 18, 1-3.

(4) セミナー

1. 福井由里子、宮川-富田幸子 (2003年12月) 環境ホルモンの健康への影響。平成15年度吉岡彌生記念館 特別展、静岡.

2. Miyagawa-Tomita S. Cardiogenesis and Notch signaling (2004, Nov. 11) In Duke Univ. Dept of Pediatrics (Dr. ML. Kirby) , North Carolina, USA.
3. 富田幸子 (2004年11月24日) 心臓形態形成と心臓における Notch signaling, Meltrin β . 京都大学再生医科学研究所、(瀬原淳子教授)、京都.

5. 研究成果

Notch は細胞膜受容体であり、細胞と細胞の局所的なコミュニケーション（細胞間相互作用）を制御して Notch pathway としてのシグナルカスケードを統合し、すべての動物種に保存されている。Notch 蛋白を含む Notch シグナルは、細胞運命の決定、細胞の増殖、分化、移動、死など多くの現象に関与しており、器官形成、形態形成を司る基本的な制御システムの一つである。発生プロセスで働く主な細胞情報伝達系のほとんどが、分泌性・拡散性のリガンドを介しているのに対し、Notch シグナルは、細胞間の直接的な接触を介して情報を伝達するプロセスで中心的な役割を果たしている。Notch は約 100 年前、ショウジョウバエの翅に notch (切れ込みという異常) という変異をもたらす原因遺伝子として発見された (Morgan, 1917)。その後、ショウジョウバエで皮膚になるべき細胞を神経へとスイッチする neurogenic な形質を示す一連の致死性の機能喪失突然変異の解析で有名になった。Notch シグナルは細胞のタイプや状況によって細胞分化を促進したり、分化させずに増殖させて細胞の維持をおこなったりしている。

Notch シグナルのコアをなす成分はリガンド、レセプター、転写因子である (表 1)。線虫、ショウジョウバエ、哺乳類で現在までに単離されている各成分を示した (Lai, 2004)。そして、それらの成分が局在する予想図を図 1 に示した (Artavanis-Tsakonas et al., 1999)。

表 1. 異なる種での Notch シグナリングのコア成分の名称

Names of core components of Notch signaling (ligand, receptor and transcription factor) in different species			
Core component	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Mammals
Ligand	LAG-2 APX-1 ARG-2 F16B12.2	Delta Serrate	Delta-like1 (DLL1) Delta-like2 (DLL2) Delta-like3 (DLL3) Jagged 1 (JAG1) Jagged 2 (JAG2)
Receptor (Notch)	LIN-12 GLP-1	Notch	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4
Transcription factor (CSL)	LAG-1	Suppressor of Hairless [Su(H)]	CBF1/RBPJκ RBPL

図 1. Notch シグナル系の構成分子とその局在

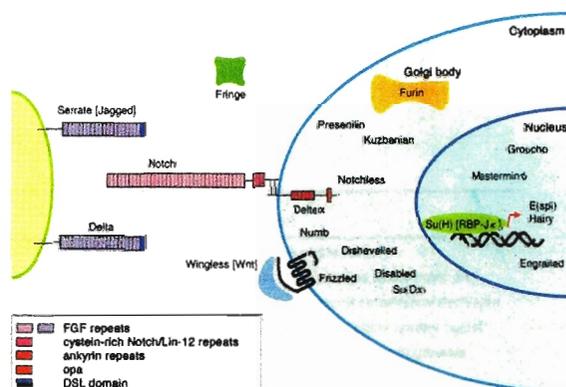


図 1 の説明。ショウジョウバエで単離された Notch 遺伝子は 300kDa の膜タンパク質をコードし、細胞外ドメインと細胞内ドメインから構成される。(Science 1999;284:770 より改変)

Notch シグナル伝達系の主要経路を図 2 に示した(Lai, 2004)。細胞膜上にある受容体分子 Notch が、隣接する細胞膜上にある Delta などのリガンドと結合すると、Notch レセプターはプロテアーゼによる多段階の分解を受け、細胞内ドメイン(NICD)が切り離されて核内に移行し、DNA 結合タンパク質である CSL (RBP-J κ) とコアクチベーターと複合体を形成し、標的遺伝子のプロモーターに結合して転写を活性化する。Notch シグナルは線虫からヒトまで脊椎・無脊椎動物を問わず幅広く発生段階での細胞分化を調節していると前述したが、その機能のすべてが解明されているわけではない。2004 年の発表リストを表 2 に示した(Lai, 2004)。

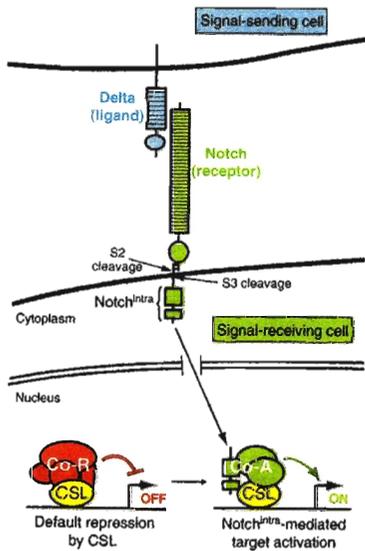


図 2. Notch シグナリングの基本経路。

Key となるのは Delta リガンド、Notch レセプター、そして CSL (RBP-J κ) 転写因子である。Delta と Notch は細胞外に EGF リピートを持つ細胞膜蛋白である。リガンドによる Notch 活性化は、Notch の 2 カ所で蛋白分解酵素により切断される。S3 の切断部位で Notch 細胞内ドメイン (NICD) が核内に移行する。NICD を含むコアクチベーターが CSL (RBP-J κ) と複合体を形成して、Notch 標的遺伝子活性化を制御する。核内 NICD が不在の時は、CSL (RBP-J κ) がコリプレッサーと結合して Notch 標的遺伝子の転写を抑制(不活化状態に維持)している。

表 2. 異なった種の Notch シグナルによって制御される発生過程の非網羅的リスト

C.elegans	D.melanogaster	Vertebrates
Regulation of early blastomere specification	Inhibition of neurogenesis	Inhibition of neurogenesis
Regulation of AC/VU decision	Regulation of gliogenesis, neural lineage fates	Regulation of fate choices in the inner ear
Regulation of vulval precursor fates	Inhibition of wing venation	Inhibition of non-neural ectodermal derivatives (Xenopus ciliated cells, chick feather buds)
Induction of left-right asymmetry	Inhibition of myogenesis, cardiogenesis	Inhibition of myogenesis, cardiogenesis
Induction of germline proliferation	Inhibition of midgut precursors	Induction of left-right asymmetry
	Induction of wing margin	Regulation of limb bud development
	Induction of leg segments	Regulation of somitogenesis
	Induction of dorsoventral eye polarity	Regulation of lymphopoiesis
	Induction of cone cells in the eye	Regulation of vascular development
	Regulation of hematopoiesis	Regulation of kidney development

Notch シグナル系はニューロン、筋細胞分化、増殖など細胞の分化を調節していることが明らかとなっており、その破綻は多くの奇形や疾患に結びついている。近年、Notch シグナル伝達系のメンバーである Delta4 リガンド、Jagged1 リガンド、Notch1、2、4 レセプター、RBP-J κ 転写調節因子などが心臓血管形成に関与していることが報告され (Loomes et al., 2002; Loomes et al., 1999)、心臓血管系の発生発達では Notch シグナル伝達系が重要な制御因子であることが示されるようになってきた。臨床では、胆汁うっ滞、末梢肺動脈狭窄、奇妙な顔面を示すヒトの Allagile 症候群の原因遺伝子が Notch シグナルの Jagged1 (JAG1) リガンドであることが報告された (Li et al., 1997; Oda et al., 1997)。

In vitro の研究で、Notch はベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子である *hairy and enhancer of split-related (hesr)* 遺伝子 (*hrt*, *chf*, *hey*, *herp*, *gridlock* と呼ばれている) を直接制御していることが明らかとなった。この *hesr* 遺伝子の心血管系発生における役割を調べるために、我々は *hesr2* 遺伝子欠損マウスを作製し、その心臓機能解析を中心に検討を行った。生後すぐに *hesr2* ホモマウスの大多数は死亡するが、生後に心拡大と心重量の増大を認めた。生後 5 日目のホモマウスの心エコー検査で、三尖弁閉鎖不全と狭窄、僧帽弁閉鎖不全、左心室の拡大を認め、心室中隔欠損、心房中隔二次孔欠損も認めた。この血行動態異常は、形態学および組織学的検討でも確認した。これらの所見は *hesr2* を中心とする Notch シグナルが心臓の房室弁形成と機能の両方に重要な役割をしていることを示すものである。さらに、本マウスでは左室収縮能 (LVSF) が低下し、電顕所見で心筋異常が認められたことから、*hesr2* 遺伝子は左室収縮性をもたらす心筋自体の発達にも重要と考えられた。

Hesr 遺伝子はアイソタイプとして *hesr1*, *hesr2*, *hesr3* の 3 つのタイプがあるが、*Hesr1* や *hesr3* を欠失させたマウスには異常は見られなかった。そこで、*hesr1* のヘテロマウスと *hesr2* のヘテロマウスを掛け合わせてダブルノックアウトマウスを作成した。このダブルノックアウトマウスでは胎生 10.5 日で致死となり (表 3)、心臓と血管形成に重大な異常を認めた。

変異型マウスの心臓は、単心室様にみえる心室である (図 3)。胎齢 10.5 日の組織像で心室壁が薄く、肉柱層と房室クッションが低形成であった。胎齢 9.5 日では肉柱層は形成されているものの、ダブルヘテロと比較するとやや薄い。胎齢 10.5 日の心臓を TUNEL 法によりアポトーシスを検討したところ肉柱層での細胞死を確認した。さらに心筋の電顕所見でも不整列で数の少ない筋原線維が見られ、膨張

して不整型なミトコンドリアを認めた。つまり、*hesr1* と *hesr2* が心室肉柱層の形成と維持に関係していることが示唆された。また、変異型マウスの房室管では、クッション形成における上皮間葉転換 (EMT) の異常が認められる。将来、三尖弁と僧帽弁が形成される房室管では、EMT をおこして間葉系細胞で充満した房室心内膜床が正常マウス 9.5 日胚で認められる。しかし、本ダブルノックアウトマウスでは房室心内膜床には心ゼリーのみにて間葉系細胞は認められない。これらのことから、心室心筋の肉柱層維持と心内膜床でおこる EMT に *hesr1* と *hesr2* 遺伝子が協調して働いていることを示している。

単心室様にみえる変異体マウス心臓の左右側性を検討した (図 4)。心臓細胞系譜を示す初期マーカー (Nkx2.5)、右室 (dHand ではやや発現低下) と左室 (eHand) を示すマーカー、心房 (MLCa) と心室 (Irx4、MLCv) を示すマーカーは正常であった。すなわち本変異マウス心臓では、心室中隔欠損を持ち単心室様でありながらも左右側性は正常であった。

hesr2 欠損マウスでは、血管異常は認められなかったが (Donovan et al., 2002; Gessler et al., 2002; Kokubo et al., 2004; Sakata et al., 2002)、*hesr1* と *hesr2* のダブルノックアウトで血管形成の異常を認めた (図 5)。変異型マウスの羊膜では大きなサイズの血管が認められず、小さな血管のみであった。さらに体幹部の血管を検討したところ、前主静脈と背側動脈との間に無数の吻合血管を認めた。さらにこのマウスでは、マウス *hesr2* のホモログであるゼブラフィッシュ *gridlock* (交通渋滞あるいは行き詰まり状態の意味) 変異体で見られたような血管異常を認めた。ゼブラフィッシュ *gridlock* 変異体では、2 本の背側大静脈の癒合がみられない (Weinstein et al., 1995)。すなわち正常では 2 本の背側大動脈が後方で 1 本に癒合して、主背側動脈を形成する。しかし、本ダブルノックアウトマウスでは、2 本の背側大動脈が癒合せず背側で一貫して 2 本のまま併走していた。血管マーカー (PECAM1、Ephrin-B2、 α -smooth muscle actin) による検討では、本ダブルノックアウトマウスの動脈では PECAM1 発現によって血管内皮は形成されていることが確認された。しかし、Ephrin-B2、 α -smooth muscle actin 発現が正常と比べて減少している。このことは *hesr1* と *hesr2* が動脈形成に必要であることを示している。従って、*hesr* 遺伝子ファミリーは動脈-静脈分化において、ゼブラフィッシュとマウスで同じ役割をしていることがわかる。

心臓の弁形成についてはこれまでいろいろな因子が関わっていることが

明らかとなっている。弁形成部分の心内皮が向かい側にある心筋のシグナルをうけて EMT をおこし間葉系細胞の増殖・分化が始まるが、そのシグナル経路の代表的なものを図 6 に示した (Armstrong and Bischoff, 2004)。しかし、これら経路の相互の関係はまだ明らかではない。

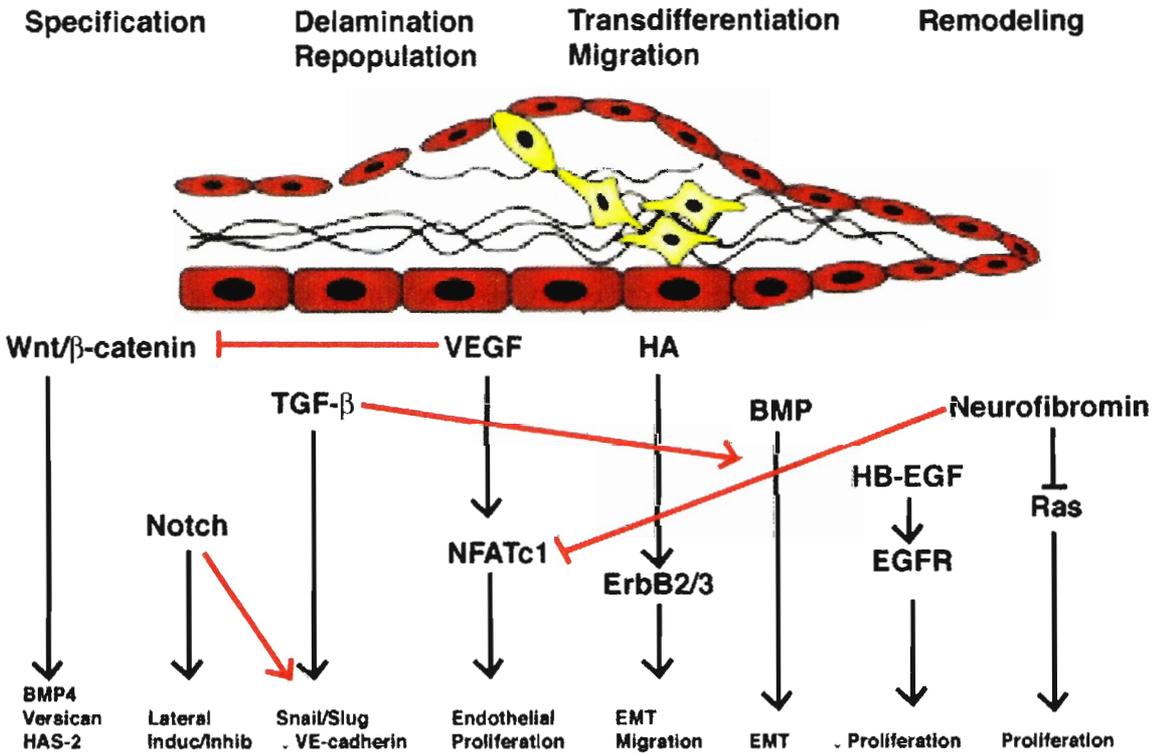


図 6. 心臓弁形成とリモデリングのためのシグナリングネットワーク。弁形成には、いろいろなシグナリングネットワーク経路と転写制御因子が協同して働く。

では、*hesr* を中心としたシグナル経路は明らかであろうか？この点もまだ不明なことが多い。Notch1 および RBP-Jκ ノックアウトマウスでは EMT が起こらず、弁が形成されない (Timmerman et al., 2004)。Notch を強制発現させると過剰の EMT が起こる。*hesr2* 欠損マウスでは、EMT が起こるが、*Hesr1/2* ダブルノックアウトマウスでは EMT が起こらないことを本研究で明らかにした。RBP-Jκ 変異マウスでは *hesr1* 発現が消失するが、*hesr2* 発現は変化しない。従って、これら 2 つの遺伝子以外に Notch の下流で働いている分子がある可能性が考えられる。Notch の上流には BMP シグナル (Itoh et al., 2004)、下流には TGF-β シグナル (Zavadil et al., 2004) が関与するという報告もある。*hesr1* は心房心筋と心外膜に発現し、*hesr2* は心室心筋 (緻密層) と AV クッションに発現している。AV クッションの EMT には、周囲

の心筋からの分泌因子も重要である。これまでクッションの EMT に関する報告は、もっぱら transformation のメカニズムに焦点が当てられていたが、今後は時間空間的な弁形成のメカニズム解析が必要と思われる。弁形成に携わっている様々な因子 (図 6) を含め、今後、これら因子間の相互関係が明らかとなれば将来的には弁形成の再生医療への道が開けよう。

心筋に対する *hesr* の役割はまだ不明である。発生初期にすでに区別される外側にある心筋緻密層と内側にある肉柱層形成において、*hesr1/2* は協同して肉柱層の維持に関わっている可能性がある。これまで心筋緻密層は心外膜とのクロストークが重要であり、心筋肉柱層は心内皮とのクロストークが重要であることが言われてきた。しかし、*Hesr1/2* ダブルノックアウトマウスでは、心内皮は発達している。心筋緻密層の発達低下を示すノックアウトマウスには、*Sos1*, *erbB4 receptor*, *erbB2 receptor*, *EphrinB2 ligand*, *EphB4 receptor*, *TEF1*, *Angiopoietin-1*, *dHand*, *serotonin2b receptor*, *Bmp10*, *VEGF*, *GATA4* 遺伝子の報告がある。一方、心筋緻密層が過剰形成されるものに *jumonji* 遺伝子 (Takeuchi et al., 1999) がある。今後、これらの遺伝子との関わりが明らかとなれば、生後に増殖停止する心筋の細胞サイクル解明や原因不明の non-compactio 心筋症の発症メカニズムに役立つと考えられる。

初期の血管形成は、血管形成 (vasculogenesis) と血管新生 (angiogenesis) に分けられるが、Notch は後者の血管新生に働いていると考えられている。Notch1, Notch4 は血管内皮に発現しており、これらのノックアウトマウスでは、太い血管形成が阻害される (Krebs et al., 2000)。さらに、ゼブラフィッシュの変異体解析 (Zhong et al., 2001) から Notch シグナルが動脈と静脈の分化に関わることが明らかになった。Gridlock を欠如する変異体の静脈は正常に形成されているが、動脈形成に異常があった。逆に gridlock を過剰発現させると静脈形成を阻害する。本研究の *hesr1/2* ダブルノックアウトマウスでは動脈の異常が認められた。動脈と静脈のマーカーに *ephrinB2*, *EphB4* があるが、*hesr1/2* ダブルノックアウトマウスでは *ephrinB2* 発現の低下が見られた。しかし、これらが直接の標的因子がどうかは明らかでない。Angioblast の発生運命についてゼブラフィッシュでは、Shh (脊索より分泌) → VEGF (体節より分泌) → Notch → 動脈分化 (*ephrinB2* 発現) という道筋が提示されている (Lawson et al., 2002)。今後、哺乳類の血管でもこういった経路が明らかになることが期待される。臨床の現場では、動脈硬化などに代表される血管破綻する動脈疾患も多く、また伏在静脈を用いた冠動脈バイパスグラフトも実施

されリモデリングやスイッチングが盛んに論議されている。Notch シグナルの血管系への関与が明らかとなれば、このような臨床経過での Notch シグナル因子の関わりも明らかとなり、将来的に再生医療に役立つと考えられる。

参考文献

- Armstrong, E. J. and Bischoff, J. (2004) Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res*, **95**, 459-470.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**, 770-776.
- Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y. N. and Utset, M. F. (2002) Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice. *Curr Biol*, **12**, 1605-1610.
- Gessler, M., Knobloch, K. P., Helisch, A., Amann, K., Schumacher, N., Rohde, E., Fischer, A. and Leimeister, C. (2002) Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2 $-/-$ mice. *Curr Biol*, **12**, 1601-1604.
- Itoh, F., Itoh, S., Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Iso, T., Dotto, G. P., Hamamori, Y., Kedes, L., Kato, M. and ten Dijke Pt, P. (2004) Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *Embo J*, **23**, 541-551.
- Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Tomimatsu, H., Nakashima, Y., Nakazawa, M., Saga, Y. and Johnson, R. L. (2004) Targeted disruption of hesr2 results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. *Circ Res*, **95**, 540-547.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L. and Gridley, T. (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*, **14**, 1343-1352.
- Lai, E. C. (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*, **131**, 965-973.
- Lawson, N. D., Vogel, A. M. and Weinstein, B. M. (2002) sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell*, **3**, 127-136.
- Li, L., Krantz, I. D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A. B., Collins, C. C., Qi, M., Trask, B. J., Kuo, W. L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M. E., Rand,

- E. B., Piccoli, D. A., Hood, L. and Spinner, N. B. (1997) Alagille syndrome is caused by mutations in human *Jagged1*, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet*, **16**, 243-251.
- Loomes, K. M., Taichman, D. B., Glover, C. L., Williams, P. T., Markowitz, J. E., Piccoli, D. A., Baldwin, H. S. and Oakey, R. J. (2002) Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver. *Am J Med Genet*, **112**, 181-189.
- Loomes, K. M., Underkoffler, L. A., Morabito, J., Gottlieb, S., Piccoli, D. A., Spinner, N. B., Baldwin, H. S. and Oakey, R. J. (1999) The expression of *Jagged1* in the developing mammalian heart correlates with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet*, **8**, 2443-2449.
- Morgan, T. H. (1917) The theory of the gene. *Am Nat*, **51**, 513-544.
- Oda, T., Elkahlon, A. G., Pike, B. L., Okajima, K., Krantz, I. D., Genin, A., Piccoli, D. A., Meltzer, P. S., Spinner, N. B., Collins, F. S. and Chandrasekharappa, S. C. (1997) Mutations in the human *Jagged1* gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*, **16**, 235-242.
- Sakata, Y., Kamei, C. N., Nakagami, H., Bronson, R., Liao, J. K. and Chin, M. T. (2002) Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor *CHF1/Hey2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16197-16202.
- Takeuchi, T., Kojima, M., Nakajima, K. and Kondo, S. (1999) *jumonji* gene is essential for the neurulation and cardiac development of mouse embryos with a C3H/He background. *Mech Dev*, **86**, 29-38.
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J. M., Diez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J. C. and de la Pompa, J. L. (2004) Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*, **18**, 99-115.
- Weinstein, B. M., Stemple, D. L., Driever, W. and Fishman, M. C. (1995) Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nat Med*, **1**, 1143-1147.

Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N. and Bottinger, E.P. (2004)

Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *Embo J*, **23**, 1155-1165.

Zhong, T.P., Childs, S., Leu, J.P. and Fishman, M.C. (2001) Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, **414**, 216-220.

表 3.

Hesr1 と *hesr2* 変異マウスの掛け合わせによって得られた子供の数。

Numbers of progeny obtained by intercrossing *Hesr1* and *Hesr2* mutants

Age (<i>Hesr1,2</i>)	<i>+/+, +/+</i>	<i>+/+, +/-</i>	<i>+/+, -/-</i>	<i>+/-, +/+</i>	<i>+/-, +/-</i>	<i>+/-, -/-</i>	<i>-/-, +/+</i>	<i>-/-, +/-</i>	<i>-/-, -/-</i>	ND	Total
10 dpp (<i>+/-, +/-</i> × <i>+/-, +/-</i>)	12 (9)	25 (18)	4 (9)	23 (18)	37 (36)	10 (18)	17 (9)	16 (18)	0 (9)	12	155
10.5 dpc (<i>+/-, -/-</i> × <i>-/-, +/-</i>)					19 (22)	20 (22)		21 (22)	23 (22)	7	90

Genotypes of the progeny from the intercross between *Hesr1^{+/-}/2^{+/-}* mice, or between *Hesr1^{-/-}/2^{+/-}* and *Hesr1^{+/-}/2^{-/-}* mice were examined at day 10 postpartum (dpp) or at day 10 postcoitum (dpc), respectively. *Hesr1^{-/-}/2^{+/-}* mice were not detected at 10 dpp, but were evident at 10 dpc as expected. The predicted numbers are parenthesized in the panel.

Hesr1^{+/-}/2^{+/-} マウス間の交配、または *Hesr1^{-/-}/2^{+/-}* と *Hesr1^{+/-}/2^{-/-}* マウス間の交配からできる子供を用いて、生後 (dpp) 10 日または胎齢 (dpc) 10 日に genotype の検討を行った。*Hesr^{-/-}/2^{-/-}* マウスは生後 10 日では認められなかったが、胎齢 10 日で認められた。予想数はかっこ内に示した。

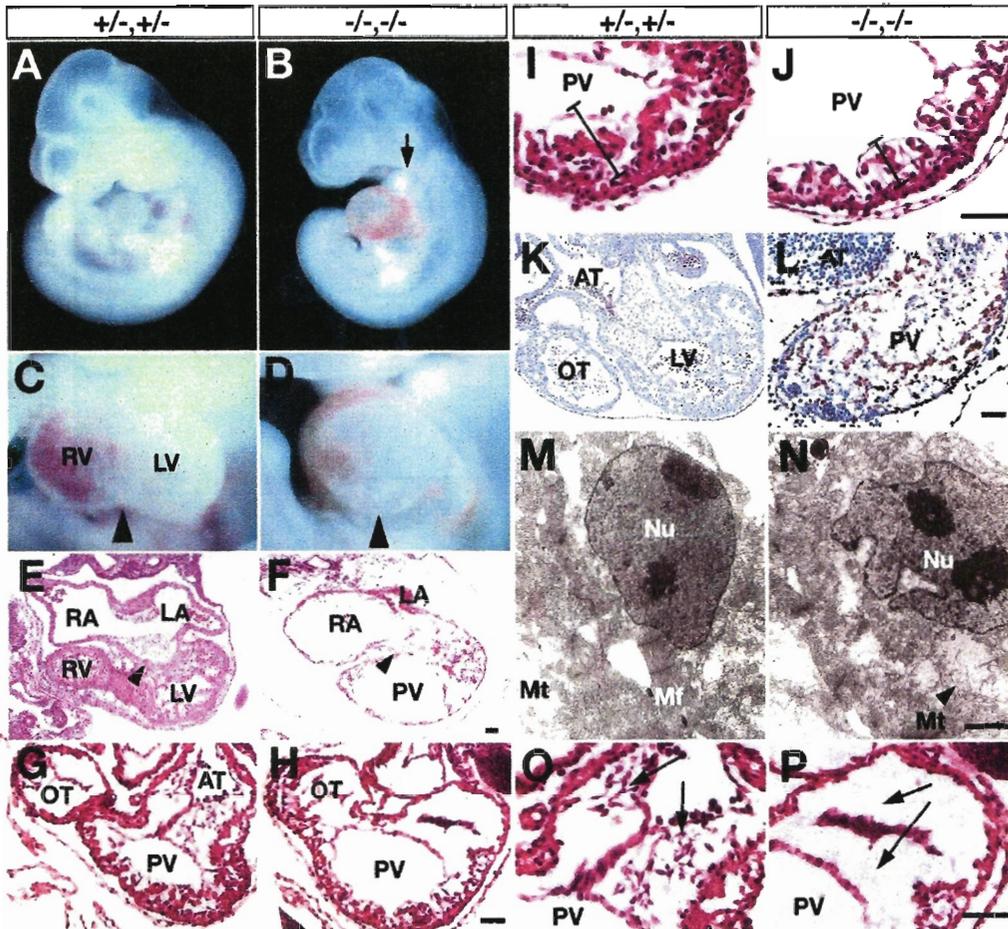


図3. ダブルノックアウトマウスの外表形態と心臓異常。(A, B) 胎齢 10.5 日の *hesr1^{-/-}/2^{-/-}* 胎仔では第 2 弓鰓弓が小さい (矢印)。(C, D) A と B の胎仔の高倍率の心臓正面像。ダブルヘテロでは右室 (RV) と左室 (LV) が外表で明確だが、ダブルホモ (変異型) では単心室様にみえる。矢尻は中央を示す。(E, F) 胎齢 10.5 日の心臓 HE 染色組織。ダブルヘテロでは 4 つの部屋が形成され、AV クッション組織 (矢尻) もよく発達している。変異型では、左右心房と原始心室 (PV) がみられる。心房中隔は認められるが、心室中隔は認められない。AV クッション (矢尻) と心室肉柱層の発達も悪い。(G, H) 胎齢 9.5 日の心臓 HE 染色組織。両者とも d-ループを示す。(I, J) G と H の心室高倍率像。心室肉柱層は変異型で薄い。(K, L) TUNEL 法により、アポトーシスが変異型の心室肉柱層で認められる。胎齢 10.5 日。(M, N) 電顕像。胎齢 10.5 日の心筋では、心筋線維とミトコンドリアがよく発達しているが、変異型では不整列な心筋線維と膨化したミトコンドリアが見られる。(O, P) G と H の AV クッション部の高倍率像。心内皮からの上皮間葉転換細胞 (矢印) がみられるが、変異型ではほとんどない。

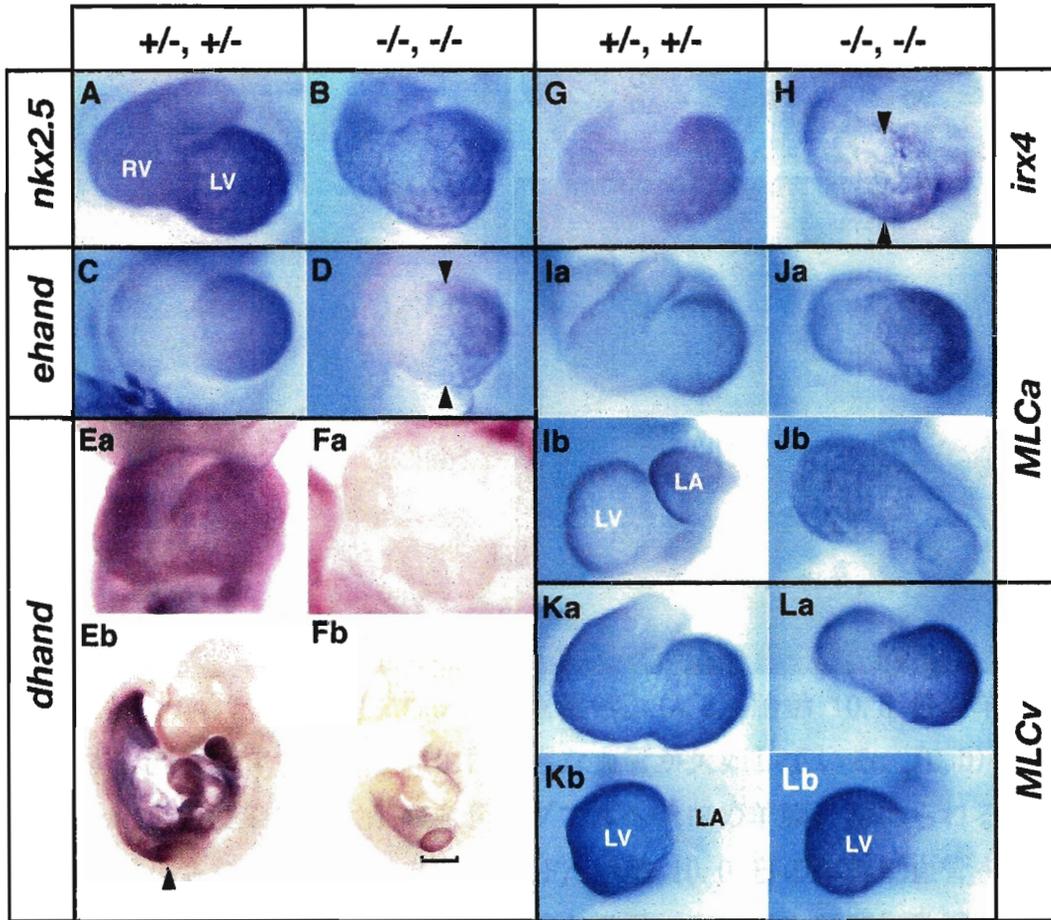


図4. 心房と心室マーカーを使った胎齢10.5日心臓 in situ ハイブリダイゼーション解析。(A, B) *Nkx2.5* はダブルヘテロと変異型マウス心臓で同様に右心室 (RV) と左心室 (LV) に発現する。(C, D) *ehand* は通常左心室のみに発現する。変異型では単心室の左側に発現している。(E, F) *dhand* は変異型マウス心臓で全体にその発現が低下している。前肢では、正常では後方部分のみの発現だが、変異型ではその発現が前方にまで拡大している。(G, H) *Irx4* はダブルヘテロ、変異型ともに両心室に発現している。(I, J) *MLCa* (myosin light chain atrium) は通常、マウス胚心臓では心房心室に発現しており、変異型でも同様であった。(K, L) *MLCv* (myosin light chain ventricle) はダブルヘテロ、変異型ともに同じ発現パターンで、心室に発現している。

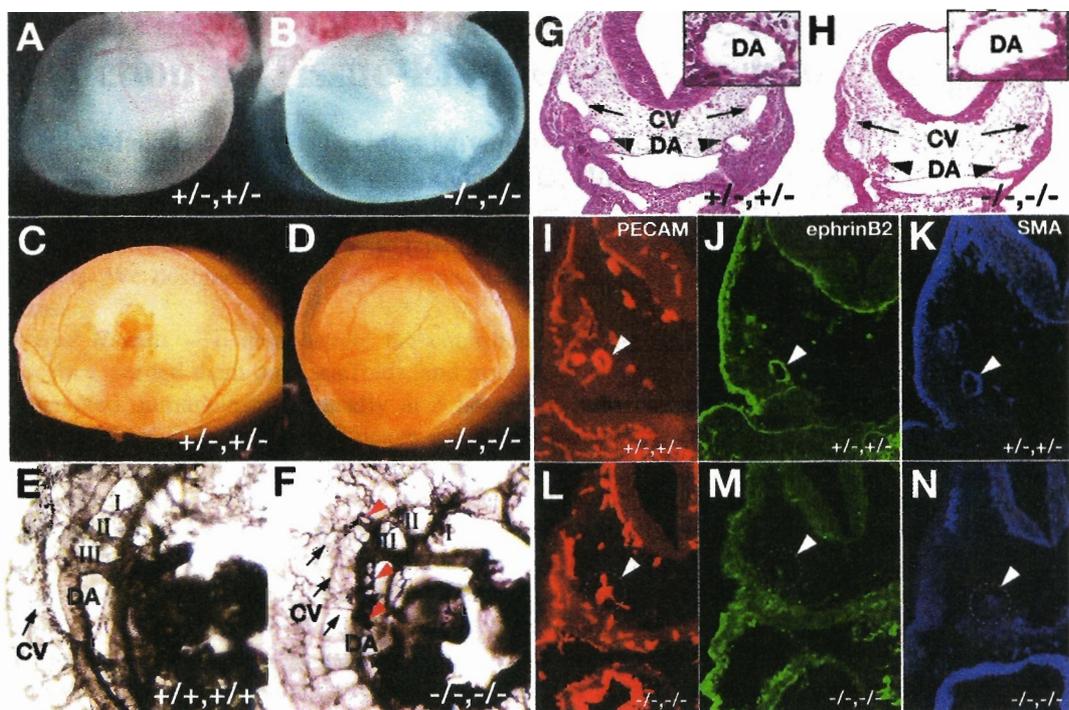


図5. *hesr1*^{-/-/2}変異型マウスの血管異常。(A, B) 胎齢 10.5 日の羊膜の血管形成を示す。変異型マウスの羊膜には大きな血管が欠如している。(C, D) PECAM-1 の whole mount 免疫染色。大小の血管がダブルヘテロの羊膜に認められるが、変異型マウスでは小さな血管のみである。(E, F) 胎齢 10.0 日の体幹部血管をインク注入で観察。右側面。野生型マウスでは、前主静脈 (CV) および背側動脈 (DA) が平行し、その太さはほとんど同じである。また第 1、2、3 鰓弓動脈が認められる。一方、変異型マウスでは前主静脈と背側動脈との間に無数の吻合血管 (矢尻) が認められ、右静脈洞は正常に見えるが、前主静脈 (矢印) が細い。2 本の背側動脈は野生型では、後方で癒合して 1 本の主背側動脈を形成するが、変異型では癒合せずに 2 本のまま併走している (図には示していない)。(G, H) 頭部断面の HE 染色組織像。前主静脈と背側動脈がダブルヘテロと変異型マウスに見られる。しかし、高倍率で背側動脈を観察すると、変異型の動脈壁は薄い。(I-N) 頭部部分の PECAM-1 (I, L)、ephrinB2 (J, M)、 α -smooth muscle actin (SMA) (K, N) 抗体免疫組織像。内皮細胞のマーカーである PECAM-1 発現はダブルヘテロと変異型マウスともに同じ発現パターンを示した。しかし、変異型では ephrinB2 および α -smooth muscle actin 発現が減少している。