遺伝子操作マウスを用いた血管形成機構の解明

15390335

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金

（基盤研究（B））研究成果報告書

東京女子医科大学図書館
369
2006. 6. 30
蔵書印

平成18年3月

研究代表者　中澤　誠

東京女子医科大学医学部教授

H17
KB
Nak

遺伝子操作マウスを用いた血管形成機構の解明

15390335

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

（基盤研究（Ｂ））研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者　中澤　誠

東京女子医科大学医学部教授

はしがき

心臓血管は生命維持の源であり、個体発生のなかで最も早く機能を開始し、「生」「死」の定義にもよるが生命の最後まで働き続ける。この心臓大血管の生体維持における役割を考える時、形態、機能、そして発生発達成長さらに aging と辿る時間の“三つの要素ないし三つの軸”を念頭においておく必要がある。特に、小児科領域ではこのことは重要である。

心臓大血管の機能は、心筋そのものの特性、心室特性、さらに血管特性においても、発生から aging への revolution を経験する。その変化は発生直後から出生を経て、ヒトで言うと幼児期までの間に特に激しい。このことの理解は周生期（周産期は母親の視点であり、ここでは周生期とした）の循環危機に際しての診療上極めて重要であり、循環器小児科医のみならず小児科医とくに新生児科医には必須の基礎知識である。

一方、マクロの形態異常すなわち先天性心臓大血管疾患（congenital cardiovascular disease = CCVD）は循環異常をもたらし、生命予後に大きな影響を与える。生命予後改善のためには循環動態異常の矯正、それは多くは外科手術によるが一部はカテーテルによる治療が必須である。2006 年時点においてこれら治療成績は短期的に見ればある程度満足できるレベルに達している。しかし、開心手術が始まってまだ 53 年余しか経っておらず真の意味での長期予後は不明である。そればかりでなく、現時点において既に術前術後を問わず成人に達した先天性心疾患患者の少なからずの方々に、種々の罹病（morbidity）があり、更には余命としても“正常”平均には及ばないことが徐々に分ってきた。即ちこの疾患群では未だ”完治”を確認出来ていないことになる。今尚そして将来とも、正しい診断から適切な治療への努力の継続は当然のことであるが、他方、“完治”でないことを考えれば、疾病の発症予防・発生予防への努力が不可欠であることを強調したい。

一般的に、疾患が存在すれば医科学のアプローチは、適切な治療は当然のこととして、原因の解明、そして予防法の探索と確立へと向う。CCVD においては、まず診断治療への寄与として形態分析が行われ、次いで形態異常のメカニズムの解明のため、種々の動物における系統発生学的分析、催奇形物質負荷による実験奇形学とそれによる形態形成過程の分析、などが行われてきた。ただ、これらはマクロの形態学としての分析であったが、細胞生物学の発達に伴って

細胞特性が注目されるようになり、殊に心流出路の形態形成への鰓弓からの細胞そして神経提細胞の関与が示されるようになってきた。そして分子生物学の発展と導入が、この分野でも大きな変化をもたらした。

当初、心臓発生は「心筋」の発生が注目を集め、出雲、小室両先生が、ショウジョウバエの“心臓”に特異的な「CSX（NKX2.5)」と名付けた遺伝子を発見[1]し、後に、同様の遺伝子はヒトにも発現していることが示された。その後、多くの動物で心臓大血管発生に関わる遺伝子が次々と見つけられ、その多くが高い相同性を持って種や属を越えて心臓大血管発生過程の同様な時期に同様な部位に共通に発現していることが分ってきた。そしてそれらに遺伝子操作を加えることによって、種々の心臓大血管形態異常を生じ、その多くはヒトで見られる“先天性心疾患”と全く同様であることが示されている。そして一部には、その情報を元に解析した結果が、ヒトでの責任遺伝子の発見に繋がっている。動物からヒトへの情報の流れによって疾患発生の病態解明が進んでいる。

一方で、先天性心疾患が家系内に繰り返し発生することは19世紀後半から知られており、常に遺伝的素因の存在、換言すれば遺伝子異常の存在が疑われてきた。ここに、臨床分子遺伝学の目覚しい進歩が、その原因遺伝子の同定を可能にした疾患～疾患群が出てくるようになった。ここで発見された遺伝子の役割が、種々の遺伝子操作技術を用いて実験動物において明らかにされつつある。ここでは先の流れとは逆に、ヒトから動物への情報の流れとなって、形態形成メカニズムの解明に繋がっている。

しかし、これら極めてエキサイティングな発見による責任遺伝子の解明は、実はCCVDの一部の疾患の一部の患者に限られたもので、全ての（多くの if not all）患者あるいは家系のCCVDの原因を明らかに出来ているものではない。これも古くから言われていることであるが、CCVDの発生は遺伝的素因と環境因子の相互作用によるものが大多数とされる（多因子遺伝説)。即ち、ヒトでも実験動物でも、ある遺伝子異常があってもその表現型は必ずしも一致しないことは周知である。--遺伝子が一形態に対応しないことから、その他の因子Epigenetic factorが何らかの作用を及ぼしていることが示唆されている。糖尿病などの母体因子、サリドマイド、抗痙攣薬、ビタミンA（およびその誘導体）および殺鼠剤など、あるいは妊娠初期の母体感染などは、現象として「環境因子」に挙げられている。しかし、これらが遺伝的素因（基盤となる遺伝子異常ないし多型）とどのように関わっているのかは、未だ殆ど手付かずの状態である。

これらが解明されれば、CCVD の予防も道が開けてくると思う。

ここ10年ぐらいの研究から心臓は多様な細胞由来であることが明らかとなってきた。古くから言われてきた原始心臓前駆細胞領域は第 1 次心臓形成領域（primary heart field）と呼ばれ、これは最近の分子生物学の進歩により第 2 次心臓形成領域（secondary heart field）という概念が出現したためである。第1次心臓形成領域は、側板中胚葉が内胚葉と接する臓側中胚葉部分を指し、主に左心室形成に寄与する。第 2 次心臓形成領域は、詳細な部分はまだ統一されていないが、第 1 次心臓形成領域よりも遅れて心臓形成に参加し、からだのやや前方に位置するため前方心臓形成領域（anterior heart field）とも呼ばれ主に右心室、流出路形成に寄与する[2]。心房は両方の心臓形成領域が関与する。第 2 次心臓形成領域由来の細胞は第 1 次心臓形成領域由来細胞に比べて比較的後期まで未分化な状態のままとどまり *islet-1* の様な特異的遺伝子を発現する。最後に、心臓神経堤細胞が心臓形成の仕上げに流出路から侵入して流出路と大動脈肺動脈中隔形成に寄与し、同時に心外膜前駆組織も冠状動脈や間質細胞の形成に関わる。

先天性心血管異常の形態形成を考える上で、前述の概念は非常に重要な事柄と思われる。なぜならこれまでの知識だけでは先天性心血管異常の形態形成を説明できなかったからである。左心室と右心室が異なった領域由来の細胞であるなら、左室低形成症候群、心室中隔欠損、ファロー四徴症、肺動脈狭窄など様々な疾患が納得のいく説明ができるようになるかもしれないのである。また、第 2 次心臓形成領域に特異的な遺伝子は *islet-1* の他にいくつか候補があがってきている。第 2 次心臓形成領域由来細胞は心筋前駆細胞に成りうるのか、そうであれば再生医療にもつながるのである[3]。現在のところ islet-1 陽性細胞は stem cell マーカーである Sca-1 や c-kit は陰性であるが、Gata4 や Nkx2.5 は陽性である。islet-1 陽性細胞は adult までマウスやヒトでみつかっており、in vivo および in vitro 実験で心筋細胞になるという報告もある。今後の発展が期待されている。

参考文献

1. Komuro I, Izumo S: Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. Proc Natl Acad Sci U S

A 1993;90:8145-8149.
2. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S: Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nat Rev Genet 2005;6:826-835.
3. Parmacek MS, Epstein JA: Pursuing cardiac progenitors: regeneration redux. Cell 2005;120:295-298.

研究組織

研究代表者：中澤　誠（東京女子医科大学・医学部・教授）
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）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	8,400,000	0	8,400,000
平成 16 年度	3,400,000	0	3,400,000
平成 17 年度	3,000,000	0	3,000,000
総計	14,800,000	0	14,800,000

研究発表

(1) 論文

Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Ikeda Y, Kurosawa H, Shin'oka T. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. Circulation, 2003; 108:1729-1734.

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL. Targeted disruption of hesr2 results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. Circ Res, 2004;95:540-547.

岩崎淳一、宮川-富田幸子、森　善樹、富松宏文、中澤　誠、冨澤康子、遠藤真弘、小久保博樹. 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、2004：52（2）：203-206.

Naruse M, Otsuka E, Naruse M, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Hagiwara H. Inhibition of osteoclast formation by 3-methylcholanthrene, a ligand for arylhydrocarbon receptor: suppression of osteoclast differentiation factor in osteogenic cells. Biochem Pharm, 2004; 67:119-127.

Tsukamoto Y, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Hagiwara H. Inhibition of ossification in vivo and differentiation of osteoblasts in vitro by tributyltin. Biochem Pharm, 2004; 68:739-746.

Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Komatsu K, Nakazawa M, Fukaya T, Baba K, Yutani C. Immunohistochemical study of apparently intact coronay artery in a child after Kawasaki disease. Pediatr Inter, 2004;46(5): 590-596.

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL.

Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. Dev Biol 2005;278:301-309.

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Johnson RL. Hesr, a mediator of the Notch signaling in heart and vessel development. Trends in Cardiovascular Medicine, 2005;15(5):190-194.

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. Dev Dyn, 2006;235:395-402.

Watanabe U, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, et al. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces deformed heart morphogenesis. Development, 2006;133:1625-1634.

Matsumura G, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Ikeda Y, Matsuda S, Kurosawa H, Shin'oka T. Evaluation of tissue-engineered vascular autografts. Tissue enginnering (in press).

Hirono K, Foell D, Xing Y, Miyagawa-Tomita S, et al. Expression of myeloid-related protein (MRP)8 and MRP14 in patients with acute Kawasaki disease. J Ame Coll Cardiology (in press).

(2) 総説

宮川-富田幸子、今中-吉田恭子、杉村洋子、冨澤康子、中澤　誠. 冠動脈の発生と発達に関する最近の知見. 冠疾患誌、2004；10：55-60.

宮川-富田幸子、小久保博樹. Notch シグナルと心内膜床形成. 分子心血管病、2006;7(2): 55-63.

小久保博樹、宮川-富田幸子.　心臓・血管形成と Notch シグナル. 医学のあゆみ（印刷中）

(3) 出版物

Miyagawa-Tomita S and Nakazawa M.　Editorial:Cardiac neural crest. In:Cardiovascular development and congenital malformations. Molecular and genetic mechanisms. M Artman, et al., eds., Blackwel, Futura, New York, 2005, pp.137-140.

宮川-富田幸子　心臓刺激伝導系の発生・生理と臨床.　臨床発生心臓病学（印刷中）.

(4) 紀要報告書

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、2003 年度報告書、紀要 24：pp57-58.

石原陽子、今野結子、棚沢静香、工藤千穂子、越智真理子、山本道子、宮川-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、2003 年度報告書、紀要 24：pp32-33.

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.

宮川-富田幸子、中嶌八隅、富松宏文、中澤　誠（2005）心臓血管発生・発達に関与する遺伝子群の検討—心外膜前駆組織由来細胞の心臓内の動向とテネイシンの役割—　東京女子医科大学総合研究所、2004 年度報告書、紀要 25：pp54-55.

（5） 講演

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 年度吉岡出版物出版物弥生記念館　特別展、静岡.

Miyagawa-Tomita S. Cardiogenesis and Notch signaling. (2004, Nov 11) In Duke Univ. Dept of Pediatrics (Dr.ML.Kirby), North Carolina, USA

宮川-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 beta. 京都大学再生医科学研究所、(瀬原淳子教授)、京都

宮川−富田幸子（2005 年 11 月 28 日）心臓の発生と先天性心疾患、そして再生医療への展望. 座談会. 東京. 分子心血管病、7 (2) ,1-10, 2006

（6） 学会発表

今野結子、米田早織、宮川-富田幸子、星　桂芳、植松　宏、石原陽子. 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 (2003 年 3 月 27 日).

Nakashima Y, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M. Effect of high dose epinephrine stress in late fatal phase of chick. Weinstein Cardiovascular Meeting, 62, Boston, MA, USA (2003, May 16-17).

Sugimura Y, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M. Effect of the cardiac neural crest for the coronary angiogenesis and /or vasculogenesis. Weinstein Meeting, 60, Boston, MA, USA (2003, May 16-17).

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomitatsu H, Nakashima Y, Saga Y, Johnson RL. Function analysis of hesr genes in cardiovascular development. Weinstein Meeting, 102, Boston, MA, USA (2003, May 16-17).

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Takahashi Y, Inoue T, Kanno J, Saga Y. *MesP1* and *MesP2* are essential for the cardiognesis in mice. International Sympo Developmental Biology and Tissue Engineering (2003).

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Takahashi Y, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Role of the transcription factors, *MesP1* and *MesP2* in development of cardiac mesoderm. 36th Ann Meeting Jpn Soc Dev Biol, 1P-079, Sapporo, Japan (2003, June11-13).

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Sugimura Y, Nakazawa M. Function analysis of *hesr* genes in cardiac development. 38th Ann Meeting Jpn Soc Ped Cardiol, 19(3), 268, Kobe, Japan (2003 July 16-18).

Sugimura H, Miyagawa-Tomita S. Effect of the cardiac neural crest for the coronary angiogenesis in quail heart. 38th Ann Meeting Jpn Soc Ped Cardiol,19(3), 322, Kobe, Japan (2003 July 16-18).

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Sugimura Y, Nakazawa M Saga Y, Johnson RL. Function analysis of *hesr* genes in cardiac development. 2nd Heart Development Meeting, 5, Kobe, Japan (2003 July 18).

Tsukamoto Y, Miyagawa-Tomita S, Ishihara Y, Hagiwara H. Analysis of the occipital bone affected by Tributyltin in mouse and rat. Environmental Hormone 6th Meeting, Sendai, Japan (2003, Dec 2-3).

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Role of the transcription factors, *MesP1* and *MesP2* in development of cardiac mesoderm. 26th Mol Biol Society Japan, 338, Kobe, Japan (2003,Dec 10-13).

Kurohara K, Komatsu K, Sakazuki S, Miyagawa-Tomita S, Asano M, Iwakura Y, Nabeshima Y, Sehara J. Role of Meltrin beta/ADAM19 in cardiogenesis. 26th Mol Biol Society Japan, 339, Kobe, Japan (2003, Dec 10-13).

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakazawa M, Johnson R, Saga Y. Function analysis of *hesr* genes in cardiogenesis. 26th Mol Biol Society Japan, 883, Kobe, Japan (2003, Dec 10-13).

Hanato T, Watanabe N, Nakazawa M, Miyagawa-Tomita S, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may be involved in the development of the coronary artery. The American Society for Cell Biology 43rd Ann Meet, Mol Biol Cell, 14supple, 210a,San Francisco, CA, USA (2003, Dec 13-17).

Nakashima Y, Miyagawa-Tomita S, Sugimura H, Nakazawa M. Effect of high dose epinephrine stress in late fetal phase of chick. 10th Weinstein Cardiovascular Development Conference, F134, 97, Leiden, The Netherlands (2004, May 13-16).

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Saga Y, Jonhnson RL. Hesr1 and hesr2 gene knockouts have a synergistic effect on mouse cardiogenesis and angiogenesis. 10th Weinstein Cardiovascular Development Conference, E108, 83, Leiden, The Netherlands (2004, May 13-16).

Miyagawa-Tomita S, Nakagawa M, Sugimura H, Nakazawa M, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may regulate behavior of proepicardial organ-derived cells. 11th Weinstein Cardiovascular Development Conference, I9, 117-118, Tucson, AZ, USA (2005 May19-21).

Nakashima Y, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M. Effect of high dose norepinephrine stress in late phase of chick fetus. 11th Weinstein

Cardiovascular Development Conference, J6, 123-124,Tucson, AZ, USA (2005 May 19-21).

中嶌八隅、宮川-富田幸子、中澤　誠、小久保博樹. 成獣 hesr2 ノックアウトマウスの心機能解析. 第 41 回日本小児循環器学会、小児循環器学会要旨、21(3), E-I-24, 東京 (2005 年、7 月 6-8 日).

小久保博樹、宮川-富田幸子、相賀裕美子.　Hesr1とhesr2の心臓chamber formationにおける役割.　第28回日本分子生物学会、日本分子生物学会講演要旨、3P-0713、福岡 (2005年、12月7-11日).

北嶋　聡、Fishman GI, 宮川-富田幸子、井上　達、菅野　純、相賀裕美子.　転写因子*Mesp1*非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与する。第28回日本分子生物学会、日本分子生物学会講演要旨、3P-0655、福岡 (2005年、12月7-11日).

Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Saga Y.　Hesr1 and Hesr2 regulate atrioventirucular boundary formation in the mouse heart. 12nd Weinstein Cardiovascular Development Conference, Tampa, FL, USA (2006, May 11-13)

研究成果

心臓から送り出される血液は動脈、毛細血管、そして静脈を経て心臓にもどるといった閉鎖した循環路をとることが脊椎動物では知られている。マウス胎仔の解析から静脈内皮細胞にEphB4、動脈内皮細胞にその特異的リガンドであるephrinB2が選択に発現していることが報告[1]されて、はじめて動脈と静脈の分子レベルでの研究が始まった（表1)。続いてゼブラフィッシュの研究より動脈と静脈の分化機構が明らかにされた。Fishmanらは化学物質ENUを用いたゼブラフィッシュの飽和変異体プロジェクトの中でgridlockという変異体を見出し、静脈は正常だが背側大動脈形成に異常をきたしていた。その原因遺伝子としてbHLH転写因子gridlockの異常によることを見出した[2]。つまりgridlock遺伝子を欠如すると動脈に異常がみられ、gridlockを過剰に発現させると静脈形成が阻害される。この遺伝子はホ乳類ではhesr（hairy/enhancer-of-split-related）をはじめとして他に様々な名前で呼ばれている（表2)。NotchおよびそのリガンドであるjaggedやDeltaが動脈にのみ発現することから（表3) Notchシグナルが血管の動脈や静脈化に関連することが示唆され[3]、Notchシグナルのノックアウトマウスでも血管系の異常が報告された(表3右側)。その後の研究でNotchがhesrの発現を制御していること、さらにNotchの上流にVEGF、sonic hedgehog（shh）シグナルが存在することが明らかとなり、これらが動脈-静脈分化を制御するシグナルとして注目されている[4]。現在のところ、Shh—VEGF—Notch—hesrカスケードの活性化が血管内皮細胞を動脈内皮細胞へ分化させ、反対にこのシグナルの遮断、もしくは欠如が静脈内皮細胞へと分化させることがわかっている。つまり静脈化への運命決定はデフォルトであると考えられている。末梢では隣接した神経由来のVEGFが末梢血管を動脈化し、離れた血管は静脈化されることも報告された[5]。以上のことより、血管発生では、脊索からのShhシグナルがVEGFを誘導し、VEGFがNotchシグナルを誘導し、活性化されたNotchシグナルがhesrの転写を活性化するというカスケードが重要であると考えられている。また、動脈系血管分化と血管網分岐パターンは独立したシグナルで制御されていることが示唆されている。動脈系血管分化ではVEGFがneuropilin-1を介して作用し、neuropilin-1介在positive feedback loopによって動脈化分化が活性化することがわかってきた[6]。血管網分岐パターンにはVEGFに加えて、もしくはVEGF

以外の末梢神経束由来分子（factor X）が寄与している可能性が考えられている。

神経軸索ガイダンス分子と血管網形成について考えると、ガイダンス分子として反発因子と誘因因子が同定されている。リガンド−受容体の組み合わせとして、反発因子である ephrin-Eph, sema-NRP/plexin, Slit-Robo、誘因因子として netrin-DCC/Unc5 がある。これらの神経軸索ガイダンス分子が心血管系の発生に関わることが相次いで報告されている[7]。では神経軸索ガイダンス分子は、末梢神経主導の血管分岐パターンの決定にどのように関わるのだろうか？これは今後の研究報告を待たなければならないだろう。また神経軸索ガイダンス分子ではなく末梢神経由来分子によって、動脈血管分岐パターンが決定されることも示唆されている。一方、血管内皮細胞が神経幹細胞の微小環境（niche）として働くという報告がある。つまり血管が単に酸素と栄養分の供給、老廃物の廃棄という役割だけでなく、積極的に神経発生、分化に関与していることも示唆されている[8-10]。

Notch シグナルによる動脈化の制御機構は次のように理解されている。血管内皮前駆細胞膜上にある Notch 受容体がリガンド（Delta、Jagged）と結合後、ADAM プロテアーゼにより膜貫通ドメインの細胞外領域が切断され、次に Presenilin（γセクレターゼ）により膜貫通ドメインの細胞内が切断される。遊離した Notch 細胞内ドメイン（NICD）が核内に移行し、転写調節因子 RBPjk と複合体を形成して、転写抑制因子 hesr を活性化する。これにより血管内皮前駆細胞は、静脈内皮細胞へのデフォルトな分化が抑制され、動脈内皮細胞に分化すると考えられている。NICD はユビキチンリガーゼの Sel10/Fbw7 にユビキチン化され 26S プロテアソームにより分解されて hesr の活性化をはかることが示されている[11]。

Notch はショウジョウバエの羽に切れ込み（notch）がある突然変異として約 100 年前に単離され、最近になってその原因遺伝子が膜蛋白であることがわかった。さまざまな研究から Notch シグナル伝達系は線虫からヒトにいたるまで種を超えて保存された細胞間情報伝達機構であることが明らかとなってきた。特に発生過程では様々なプロセス、例えば神経分化、内耳の発生制御、リンパ球の分化、左右側性の誘導、肢芽形成の制御、体節形成の制御、腎発生制御に関わっている[12]。表 3 に示したように膜貫通型 Notch 受容体は 4 種類（Notch1, Notch2, Notch3, Notch4）、膜貫通型リガンドは 5 種類（Delta-like1, Delta-like3, Delta-like4, Jagged1, Jagged2）がホ乳類で同定されている。Notch シグナルの

標的因子はHesファミリー(Hes1, Hes5, Hes7)とその類似タンパクhesr(*hesr1*, *hesr2*, *hesr3*) が報告されている。

我々の作成した*hesr1*ノックアウトマウスには特に異常は認められなかった。*hesr2*ノックアウトマウスではzebrafishにあるような血管異常は認められないものの心臓に異常を認めた[13]。すなわち三尖弁狭窄、三尖弁および僧帽弁閉鎖不全、心室中隔欠損、心房中隔 2 次孔欠損であった。この心臓形態異常は心エコーと組織学的検査で確認できた。とくに *hesr2* ノックアウトマウスの房室弁は低形成であった。つまり *hesr2* は房室弁形成に非常に重要な役割を演じることが示唆された。また、心エコー検査で左室内径短縮率 (fractional shortening) が低下していた。通常、僧帽弁閉鎖不全のヒトでは左室内径短縮率が上昇する。従って、心筋の走査電子顕微鏡結果と考え合わせると、*hesr2*は心筋自体の形成に関与し心筋症が強く疑われる結果を得た。さらに *hesr1* と *hesr2* ノックアウトマウスを掛け合わせて作成したダブルノックアウトマウスの胎仔を検討したところ、胎生 11.5 日で致死であった[14]。これらには明らかな血管異常が認められ、zebrafish の gridlock 変異体と同様に背側大動脈が 1 つに癒合せず 2 本平行したままであった。さらに、動脈と静脈間には多くの細かい血管が連絡しているのを見出した。背側大動脈では内皮細胞マーカーである PECAM は認められたが、動脈マーカーであるephrinB2と血管マーカーである平滑筋アクチンの発現が減少していた。また、卵黄嚢大血管の欠如も認められた。このことからマウスでは *hesr1* と *hesr2* 遺伝子が血管形成に協調して働いていることが明らかとなった。しかし、これら遺伝子発現が ephrinB2、EphB 4 の直接の標的遺伝子かどうかはまだ明らかでない。その他の異常としては心臓に心室中隔欠損が認められた。心室心筋は胎生 9.5 日では肉柱層が野生型と比べて薄くなっているのが認められ、胎生 10.5 日では心室心筋は菲薄化していた。これは一度形成された肉柱層がアポトーシスにより薄くなっているのが原因であることを確認した。房室弁原基の心内膜床クッション組織には、胎生 9.5 日ですでに心内皮細胞が間葉系細胞に変換 (epitherial-mesenchyal transformation、略してEMT) して、間葉系細胞がクッションに蓄積されつつある。ダブルノックアウトマウスのクッション組織には細胞外基質は認められるものの EMT 細胞は全く認められなかった。このことは *hesr1* および *hesr2* 遺伝子が協調して EMT 機構に関与していることが推測された。

Hesr の機能をまとめてみると次の 3 つである[15]。(1) 血管新生

（angiogenesis）で認められる血管リモデリングに関与する。これは Notch シグナル分子である *Jagged1*, *Notch1* あるいは *Notch1/Notch4* 欠損マウスで認められる無秩序な血管形成でも示されている。*Hesr1* と *hesr2* が協調して血管リモデリングの過程に関与することが明らかとなった。これら遺伝子がどのように制御しているのかは今後の検討課題である。(2) 心臓の弁形成に関与する。弁原基となる心内膜床クッション組織では、心筋シグナルが心内皮細胞を刺激して、心内皮細胞を間葉系細胞に変換するのを助ける。間葉系細胞で充満したクッション組織は、成熟するにつれ徐々に薄くなって線維化し弁構造を形成する。*Hesr2* ノックアウトマウスで房室弁の低形成が認められた。また *hesr1/hesr2* ダブルノックアウトマウス、*Notch1* 欠損マウス、*RBPjκ* 欠損マウスではクッション組織に心ゼリー（細胞外基質）は認められるものの EMT がおこらない。このメカニズムは今後の課題だが、弁形成の初期 EMT とリモデリングに *hesr* 遺伝子が関わることが示唆された。(3) 心筋分化に関与する。Hesr ノックアウトマウス心筋の組織所見と走査電子顕微鏡所見から拡張型心筋症が示唆された。hesr2 ノックアウトマウスのホモ個体は一部成獣にまで生存するため、今後成獣心筋についての検討を行う必要があると考えている。

参考文献

1. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ: Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. Cell 1998;93:741-753.
2. Zhong TP, Rosenberg M, Mohideen MA, Weinstein B, Fishman MC: gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. Science 2000;287:1820-1824.
3. Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G: Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. Mech Dev 2001;108:161-164.
4. Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM: sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. Dev Cell 2002;3:127-136.
5. Mukouyama YS, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ: Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and

blood vessel branching in the skin. Cell 2002;109:693-705.

6. Mukouyama YS, Gerber HP, Ferrara N, Gu C, Anderson DJ: Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. Development 2005;132:941-952.
7. Weinstein BM: Vessels and nerves: marching to the same tune. Cell 2005;120:299-302.
8. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S: Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. Science 2004;304:1338-1340.
9. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH: Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J Comp Neurol 2000;425:479-494.
10. Louissaint A, Jr., Rao S, Leventhal C, Goldman SA: Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. Neuron 2002;34:945-960.
11. Tsunematsu R, Nakayama K, Oike Y, Nishiyama M, Ishida N, Hatakeyama S, Bessho Y, Kageyama R, Suda T, Nakayama KI: Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. J Biol Chem 2004;279:9417-9423.
12. Lai EC: Notch signaling: control of cell communication and cell fate. Development 2004;131:965-973.
13. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL: Targeted disruption of hesr2 results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. Circ Res 2004;95:540-547.
14. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL: Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. Dev Biol 2005;278:301-309.
15. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Johnson RL: Hesr, a mediator of the Notch signaling, functions in heart and vessel development. Trends Cardiovasc Med 2005;15:190-194.

表1.　　血管マーカー

	名称	発現部位	
動脈系マーカー	ephrinB2	内皮	
	Bmx	内皮	
	Delta-like 4	内皮	
	activin receptor-like kinase(Alk1/ACVRL)		内皮
	Notch1		
	Notch4		
	neuropilin-1	内皮	
	Cx37,40	内皮	
	CD44	内皮	
	CXCR4		
	gridlock		
静脈系マーカー	COUP-TFII	内皮	
	EphB4	内皮	
血管マーカー	VEカドヘリン		
	平滑筋αアクチン	平滑筋	
	Tie2	内皮	細胞死抑制、細胞静止維持、血管新生抑制
	PECAM	内皮	
	VEGF-A,B,C,D,E	内皮	血管新生増殖
	VEGFR-1(Flt-1)	内皮	
	VEGFR-2(Flk-1)	内皮	
	VEGFR-3(Flt-4)	内皮	リンパ管内皮
	PDGF-B,D	内皮	
	PDGFR-β	壁細胞	
	Ang2	内皮	

表2

*hesr*遺伝子の別名と発現する種

Abbreviations			Full name	Species
Hesr1	Hesr2	Hesr3	Hairy/E(spl)-related	ハエ、マウス、ヒト
Hey1	Hey2	HeyL	Hairy/E(spl)-related with YRPW	ハエ、ニワトリ、マウス、ヒト
HRT1	HRT2	HRT3	Hairy-related transcription factor	マウス、ヒト
HERP2	HERP1	HERP3	HES-related repressor protein	マウス、ラット、ヒト
CHF2	CHF1		Cardiovascular helix-loop-helix factor	マウス、ヒト
	Gridlock			ゼブラフィッシュ、ヒト

表3.

		Notchシグナルの血管系発現				ノックアウトマウス		
		体動脈		肺動脈	体静脈	KO mouse	致死性	血管の異常
リガンド	Delta like1	−			−		胎生12日	出血
	Delta like3	−			−		生育可	unknown
	Delta like4	+	内皮、毛細血管		−			
	Jagged1	+	内皮、平滑筋	+	(+) or (−)		胎生11.5日	出血、卵黄嚢内大血管欠失、リモデリング障害
	Jagged2	+	内皮		−		生育可	unknown
受容体	Notch1	+	内皮	+	−		胎生11.5日	卵黄嚢内大血管欠失、ネットワーク構築異常
	Notch2	(+) or (−)		+	−		胎生11.5日	unknown
	Notch3	+	平滑筋、ペリサイト	+	(+) or (−)			
	Notch4	+	内皮、毛細血管	+	(+) or (−)		生育可	異常なし
						N1/N4	胎仔9.5日	N1 KOマウスよりも強い障害
標的因子	HES1	unknown					周産期	unknown
	HES5	unknown					成育可	unknown
	HES7	unknown					周産期	unknown
	hesr1	+		+	−		成育可	異常なし
	hesr2	+	内皮、平滑筋		−		周産期	異常なし
	hesr3	+	平滑筋	+			成育可	異常なし
						hesr1/hesr2	胎生11.5	卵黄嚢内大血管欠失、動静脈結合