

研究課題

心臓形成における Notch シグナリングの機能解析

課題番号 15591139

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 富田幸子  
(東京女子医科大学医学部助手)



研究課題

心臓形成における Notch シグナリングの機能解析

課題番号 15591139

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 富田幸子  
(東京女子医科大学医学部助手)

## 目次

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

## 1. はしがき

骨格筋のマスター遺伝子が1987年に発見された後、心筋のマスター遺伝子の探索も開始された。ショウジョウバエから単離（1989年）された転写因子NK-4/msh-2を破壊した変異体で心臓がまったく形成されないことから、この遺伝子はtinmanと再命名された（1993年）。その名の由来は、アメリカ童話の一つであるオズの魔法使いにでてくる心臓を持たないブリキの木こりtinmanである。TinmanのマウスホモログであるNkx2.5/Csxが同じ1993年に単離され、そのノックアウトマウスの心臓は形成されるが発生初期の段階で胎生致死であった。Nkx2.5はショウジョウバエからヒトに至るまで保存され、心臓発生に必須の転写因子と認識され、さらにヒト心房中隔欠損の病因遺伝子の一つとして考えられている。その後、現在にいたるまで続々と心臓の発生、分化、形態形成に関わる重要な因子が報告されている。

現在、発生初期の心臓形成にNkx2.5、Mef2C、GATA4、dHand/Hand2、eHand/Hand1が中心的な役割を果たすと考えられている。この他に、Iroquois-related homeobox (Irx) ファミリーのIrx1-5、T-box 転写因子であるTbx2-5などが見出されており、各々の遺伝子の心臓での機能解析がすすんでいる。最近、新しいbHLH転写因子ファミリーhesr (hairy and enhancer of split-related) 遺伝子 (hrt、chf、hey、herp、gridlockとも呼ばれている) が注目されている。この遺伝子はNotchシグナルの下流に位置している。我々はこの遺伝子について、心臓における研究成果を報告する。マウスhesr2のホモログであるゼブラフィッシュgridlockの変異体では背側大動脈が1本に収束しないなど血管形成に異常が起こる。そのため当初、マウスhesr2のノックアウトで同じような異常が起こることが予想されたが、結果は異なっていた。また、hesrには1-3までのサブタイプがありhesr1とhesr2の心臓での協調的な役割も本研究で明らかにした。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。今後、ヒトの心疾患でもhesr遺伝子の変異についての研究が行われれば、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。

## 2. 研究組織

研究代表者：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）

研究分担者：中澤 誠（東京女子医科大学医学部教授）

## 3. 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	2,700	0	2,700
平成 16 年度	1,100	0	1,100
総計	3,800	0	3,800

## 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.
9. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Johnson RL. Hesr2 disruption, AV Valve Abnormalities, and Cardiac Dysfunction. *Trends of 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 fatal 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、相賀裕美子 (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、中寫八隅、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、相賀裕美子 (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  $\beta$ /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、相賀裕美子 (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 43<sup>rd</sup> 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、相賀裕美子 (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、相賀裕美子 (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、相賀裕美子 (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  $\beta$ . 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 を介した細胞間相互作用、いわゆる Notch シグナル系は、進化的に保存された細胞間相互作用メカニズムである。ショウジョウバエ変異体の解析によりニューロン分化で側方抑制があることに端を発して Notch シグナルの研究が開始された。Notch タンパク質はショウジョウバエのほか、線虫、ウニから脊椎動物にいたるすべての後生動物に発見されている。Notch を含む Notch シグナル系はニューロン、筋細胞分化、増殖など細胞運命の決定や組織構築に重要な役割を果たしていることが明らかとなっており（表 1）<sup>1</sup>、その破綻は多くの奇形や疾患に結びついている。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 2）。そして、その予想される局在を図 1 にまとめた<sup>2</sup>。この Notch シグナル伝達系の主要経路を図 2 に示した<sup>1</sup>。細胞膜上に発現した受容体分子 Notch が、隣接する細胞膜上に発現した 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、コアアクチベーターとして転写活性化能をもつ細胞内ドメイン (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 RBP-Jk 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。

近年、Notch シグナル経路に関与する遺伝子が心臓血管系の発生発達で重要な制御因子であることが示されてきた。ヒトの Alagille 症候群は胆管形成不全による胆汁うっ滞、末梢肺動脈狭窄を臨床的特徴として常染色体優性遺伝するが、肝臓、心臓、眼、顔面、骨格などいろいろな臓器に異常が認められ、Notch のリガンドである *JAG1* 遺伝子 (20p12.2) に変異があることが明らかとなった<sup>3,4</sup>。Notch2/Jag1 ダブルヘテロマウスで Alagille 症候群と同じような表現型を持つ報告もある<sup>5</sup>。心臓の形態形成過程で発現している Notch シグナル因子としては、Delta4 リガンド、Notch1 レセプター<sup>6</sup>、RBP-Jk<sup>7</sup>、下流遺伝子として *hesr1*<sup>8</sup>、*hesr2*<sup>9</sup>がある。

In vitro の研究で、Notch シグナリングは bHLH 型転写因子である hairy and enhancer of split-related (*hesr*) 遺伝子を直接制御していることが明らかとなった。*Hesr* 遺伝子は Notch シグナル経路の下流に位置し、その働きは転写抑制機能である。現在のところ *hesr2* は上記に示したように NICD、RBP-Jk、co-activator が結合して転写活性化がおきるが、その下流遺伝子は明らかではない。また、RBP-Jk 変異マウスでは *hesr1* 遺伝子発現は減少するが、*hesr2* は変化しない<sup>7</sup>。このことから *hesr2* 遺伝子発現には RBP-Jk が関与しない可能性

も考えられている。我々は *hesr* 遺伝子の心臓における役割を調べるために *hesr2* 遺伝子欠損マウスを作製し、心エコー法を用いて心臓機能を解析した (図 3)。マウス *hesr2* のホモログであるゼブラフィッシュ *gridlock* 変異体では、血管の動脈静脈分化異常が認められるが、マウス *hesr2* では血管系の異常は認められなかった<sup>10-12</sup>。*hesr2* ホモマウスの多くは生後すぐに心拡大が認められ死亡するが、これは心不全によるものと考えられた (表 3)。生後 5 日目のホモマウスの心エコーでは、三尖弁の狭窄と閉鎖不全、僧帽弁閉鎖不全、心室中隔欠損、心房中隔欠損を認め、左心室は拡大し左室収縮率 (LVSF) は低下していた (図 4-8)。この形態の異常は、解剖所見でも確認できた。すなわち房室弁の低形成、膜様部の心室中隔欠損、心房中隔二次孔欠損であった。房室弁低形成に起因する房室弁逆流が、*hesr2* ホモマウスの心不全の原因と考えられる。これらの所見から *hesr2* をターゲットとする Notch シグナルは心臓房室弁の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。さらに通常、ヒト僧帽弁閉鎖不全では LVSF は正常または上昇するが、本ノックアウトマウスでは新生仔期から LVSF が減少し、左室機能が落ちていることが示唆された。このことから、心筋自体の働きが悪いことが推測された。事実、心筋の電子顕微鏡所見でグリコーゲンの異常蓄積、不整な筋線維などの心筋異常が認められた。従って *hesr2* 遺伝子は正常な左心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。以上のことから、*Hesr2* 遺伝子欠損マウスによって示された心臓異常の特有なスペクトラムの結果より、本マウスは、心不全の遺伝的基礎を明らかにするための有用なマウスモデルであるといえる。

## 参考文献

1. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. Mar 2004;131(5):965-973.
2. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. Apr 30 1999;284(5415):770-776.
3. Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*. Jul 1997;16(3):235-242.
4. Li L, Krantz ID, Deng Y, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet*. Jul 1997;16(3):243-251.
5. McCright B, Lozier J, Gridley T. A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency. *Development*. Feb 2002;129(4):1075-1082.
6. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*. Jun 1 2000;14(11):1343-1352.
7. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*. Jan 1 2004;18(1):99-115.
8. Kokubo H, Lun Y, Johnson RL. Identification and expression of a novel family of bHLH cDNAs related to *Drosophila* hairy and enhancer of split. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 5 1999;260(2):459-465.
9. Nakagawa O, Nakagawa M, Richardson JA, et al. HRT1, HRT2, and HRT3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic, and pharyngeal arch segments. *Dev Biol*. Dec 1 1999;216(1):72-84.
10. Gessler M, Knobloch KP, Helisch A, et al. Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2  $-/-$  mice. *Curr Biol*. Sep 17 2002;12(18):1601-1604.

11. Donovan J, Kordylewska A, Jan YN, et al. Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice. *Curr Biol.* Sep 17 2002;12(18):1605-1610.
12. Sakata Y, Kamei CN, Nakagami H, et al. Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 10 2002;99(25):16197-16202.

表 1

異なった種において Notch シグナルが制御する発生過程のおおまかなリスト

**A non-exhaustive list of developmental processes that are regulated by Notch signaling in different species**

<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	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
Induction of left-right asymmetry	Inhibition of myogenesis, cardiogenesis	( <i>Xenopus</i> ciliated cells, chick feather buds)
Induction of germline proliferation	Inhibition of midgut precursors	Inhibition of myogenesis, cardiogenesis
	Induction of mesectoderm	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

This is only a sampling of the spectrum of Notch functions; new examples continue to be discovered.

表 2

異なった種における 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**

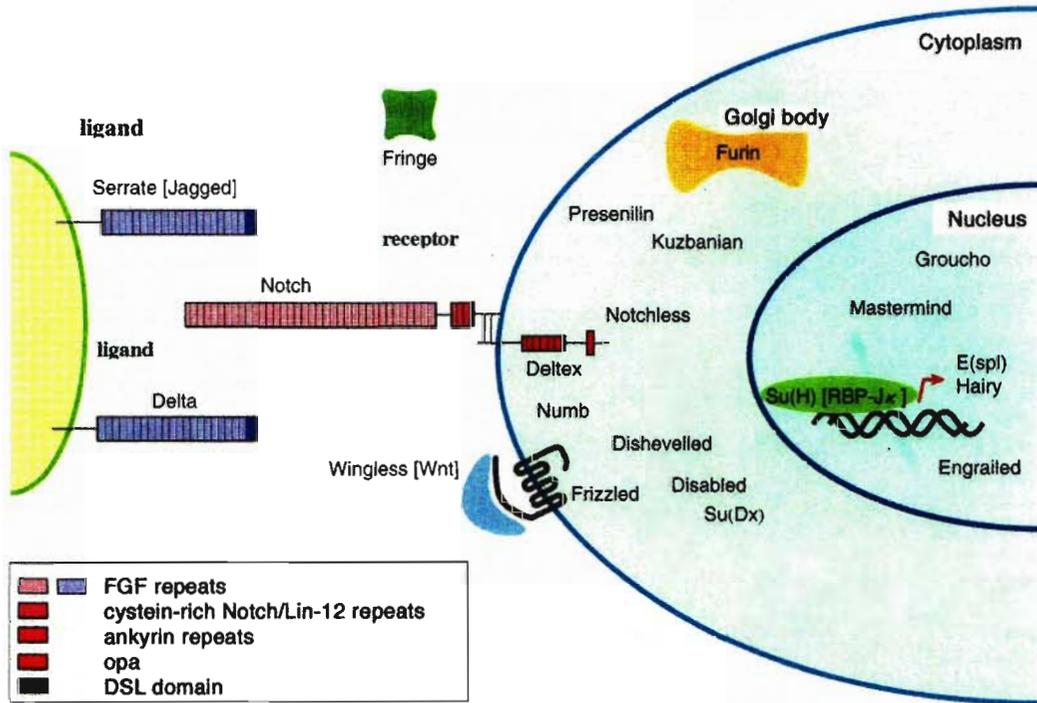
Core component	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Mammals
Ligand	LAG-2 APX-1 ARG-2 F16B12.2	Delta Serrate	Delta-like1 (DLL1) Delta-like2 (DLL2) Delta-like3 (DLL3) Jagged 1 (JAG1) Jagged 2 (JAG2)
Receptor (Notch)	LIN-12 GLP-1	Notch	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4
Transcription factor (CSL)	LAG-1	Suppressor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

表 3

**Analysis of body and heart weight in *hesr2* mice  
at 1 and 5 days after birth**

Age/genotype		Body weight (BW)	Heart weight (HW)	Ratio (HW/BW)
1 dpp	+/- (n=4)	1.47 ± 0.1g	17.5 ± 4.2mg	1.17 ± 0.22%
	-/- (n=7)	1.38 ± 0.1g	16.4 ± 3.9mg	1.18 ± 0.25%
5 dpp	+/- (n=9)	3.32 ± 0.37g	40.6 ± 9.8mg	1.22 ± 0.27%
	-/- (n=7)	1.65 ± 0.17g	46.1 ± 7.4mg	2.83 ± 0.63%

図 1



### Notch シグナル系の構成分子とその局在

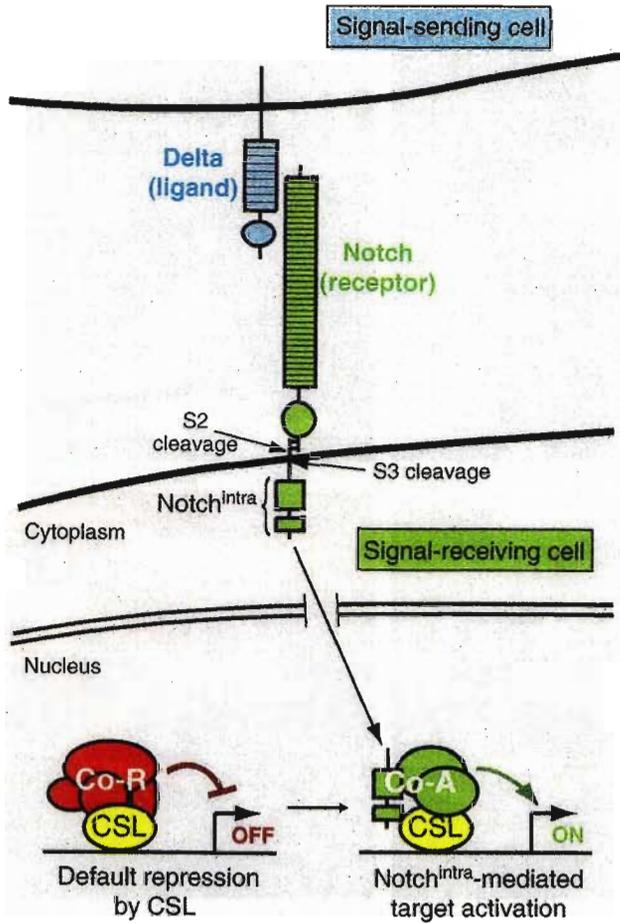
(Science1999;284:770-776 より改変)

Notch 遺伝子は細胞外と細胞内に成分をもち、Notch リガンドとしてショウジョウバエで Delta, Serrate、脊椎動物で Delta, Jagged、線虫では LAG-2, APX-1 などが単離されている。

細胞外では Fringe によってリガンドの作用、活性が修飾され、ショウジョウバエでは Wingless が直接 Notch と作用する。Notch はゴルジ体で Furin を介して切断され、ヘテロ二量体として細胞膜に存在する。Kuzbanian, Presenilin は Notch および Delta 形成、またはその細胞内輸送に関わる。

細胞内では Deltex, Su(H) と相互作用する。ショウジョウバエでは Numb, Dishevelled, Disabled などが Notch シグナル系に関与する。

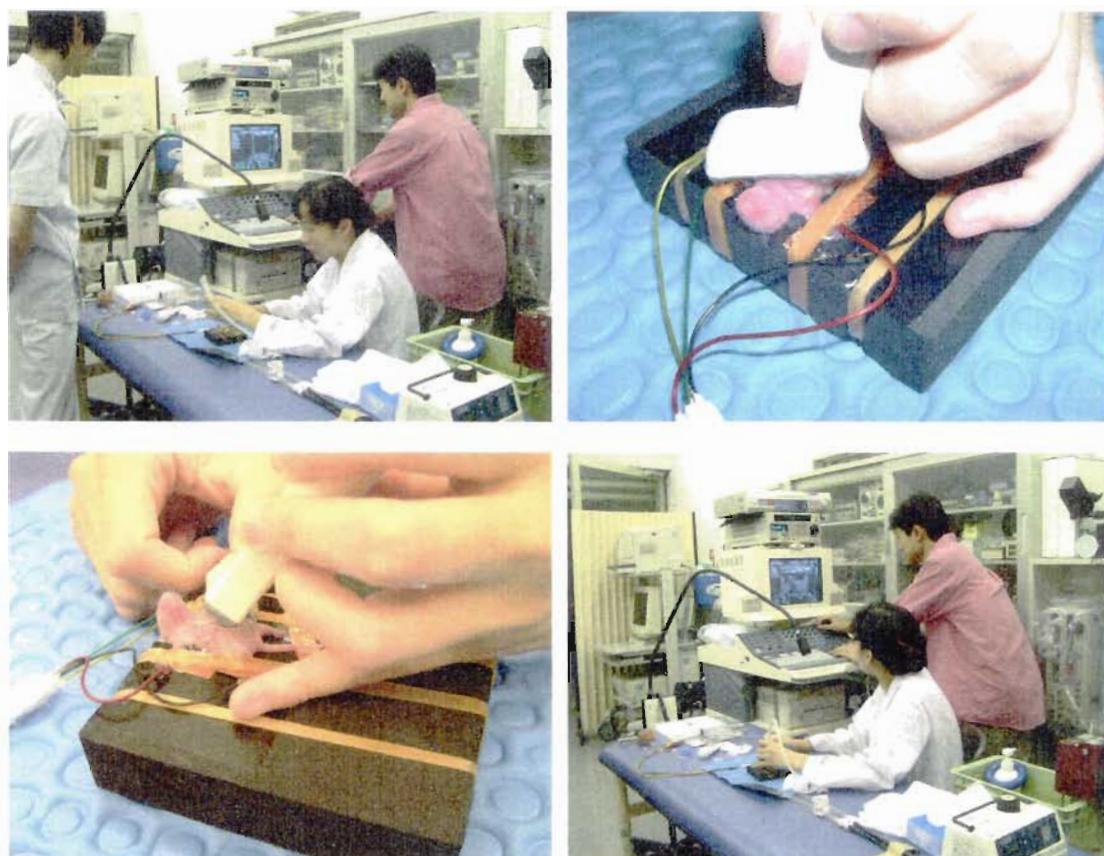
図 2



### Notch シグナリング伝達の基本経路

キープレイヤーは Delta リガンド、Notch レセプター、CSL 転写因子である。Delta や Notch は膜タンパク質で細胞外に EGF リピートを持つ。リガンドの結合により活性化された Notch レセプターは、プロテアーゼにより分解されて、細胞内ドメイン (NICD) が核内に移行する。NICD 不在下ではコリプレッサー (Co-R) と結合している RBP-Jk (CSL) が下流遺伝子を不活化状態に維持しているが、核内に移行した NICD はコアクチベーター (CoA) と RBP-Jk (CSL) と結合して下流遺伝子の転写を活性化する。

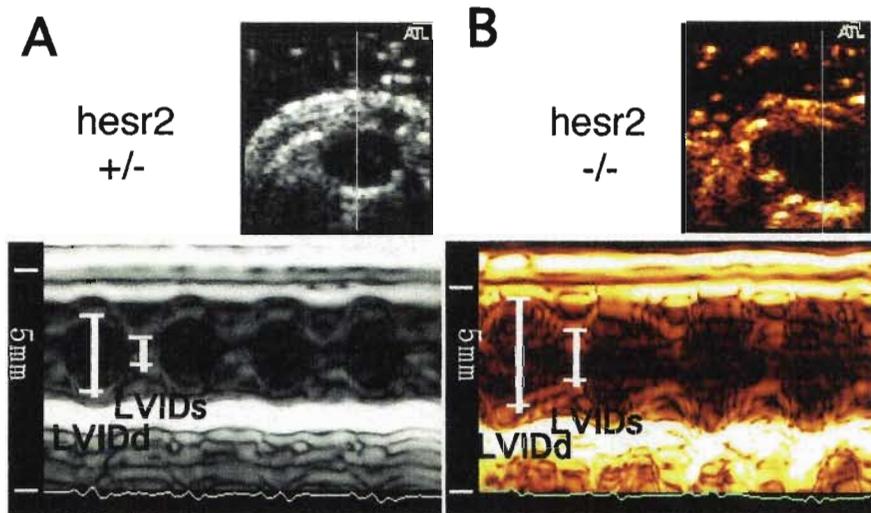
図 3



### 生後 5 日ベビーマウスの心エコー解析風景

マウスには麻酔はかけずに覚醒状態で検査を行った。簡易のゴム板上に仰向けに置きゴムバンドで四肢を固定し、心電図測定のため四肢に電極をつけた。予め保温した心エコー用ゼリーを胸部にのせプローブをあてて心エコー解析を実施した。

図 4



	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	LVFS (%)
+/- (n=5)	1.56±0.97	0.73±0.12	53.8±7.0
-/- (n=5)	2.09±0.37	1.29±0.28	* 38.3±11.1

生後 5 日の *hesr2* ノックアウトホモベビーマウスの左室 M-mode と左心室拡張機能解析

A. ヘテロベビーマウスの左室 M-mode

B. ホモベビーマウスの左室 M-mode

C. ホモマウスで左室拡張末期径 (LVIDd) が拡大し、左室内径短縮率 (LVFS) が有意に減少している (\*で示した)。このことは左心室収縮機能が減少していることを示す。

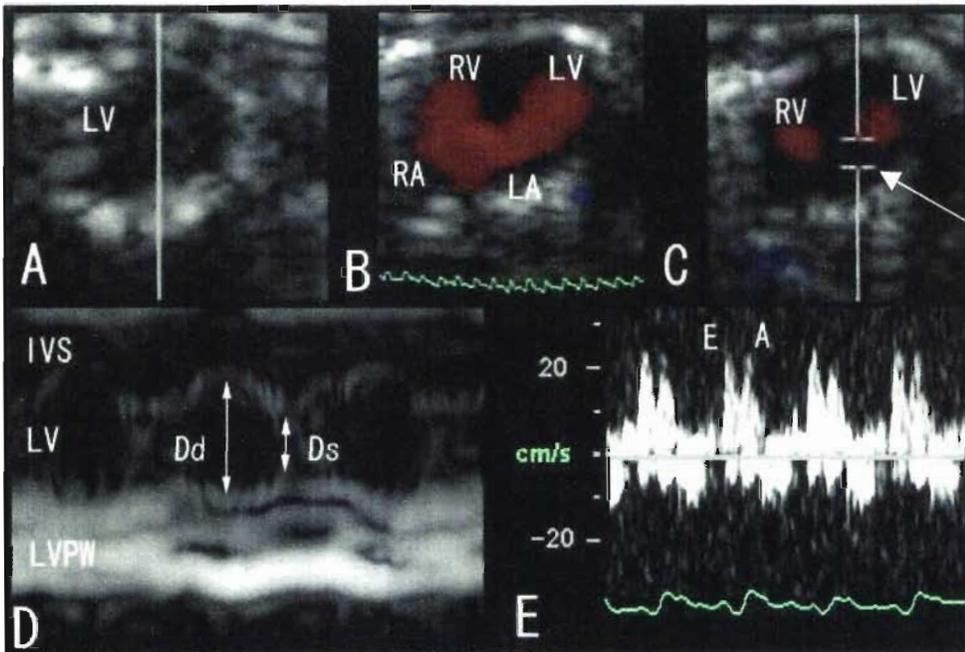
LVIDd: LV diastolic dimension 左室拡張末期径

LVIDs: LV systolic dimension 左室収縮末期径

LVFS (%) : LV shortning fraction 左室内径短縮率

%LVFS=[(LVIDd-LVIDs)]/LVIDd)x100

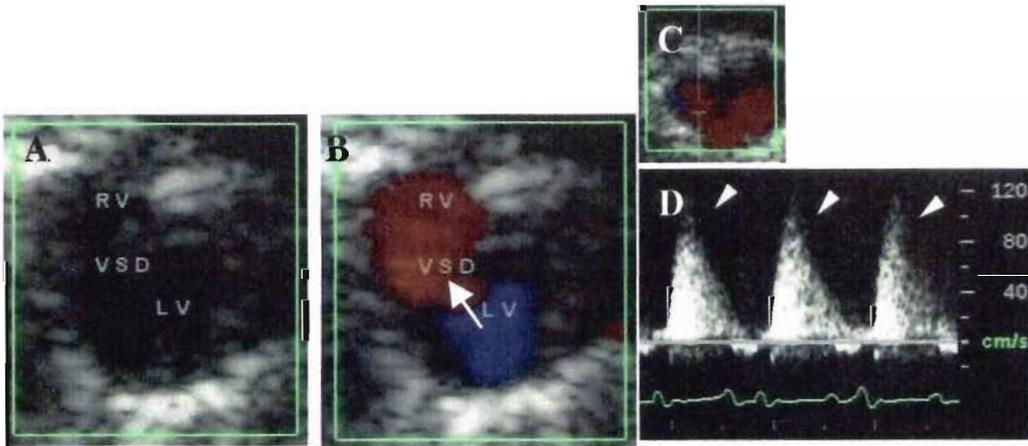
図 5



正常 5 日マウスベビーの心エコー像。

A. 左心室 (LV) 短軸像。B. 心尖部四腔断面像のカラー Doppler 血流画像。血流は心房から心室に向かって流れている。この場合プローブに向かう血流のため赤色となる。LA, 左心房; RA, 右心房; RV, 右心室。C. 左心室流入路のパルス Doppler を計測するためのサンプルポイント (矢印) を示す。D. 左心室 M モードエコー像。(A) で示した部位で計測した。Dd, 左室拡張末期径; Ds, 左室収縮末期径; IVS, 心室中隔; LVPW, 左室後壁。E. パルス Doppler による左心室拡張期の僧帽弁流入路血流波形。(C) で示した部位で計測した。E, 拡張早期血流; A, 心房収縮期血流。

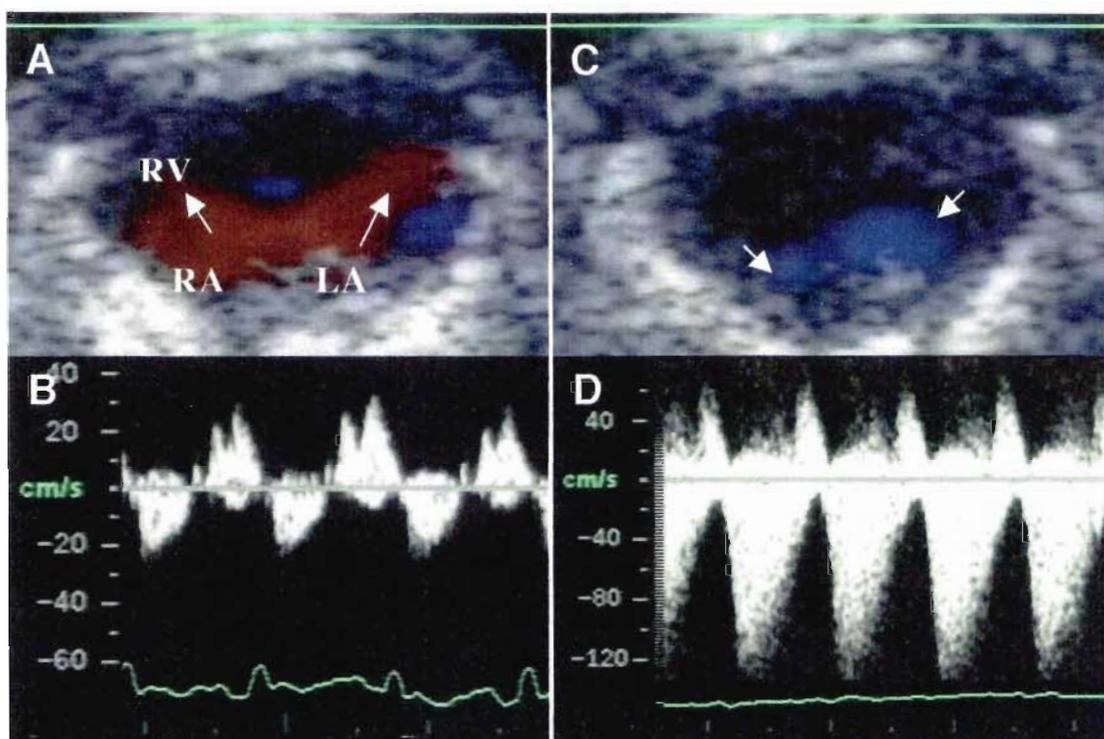
図 6



生後5日目の *hesr2* ホモベビーマウスの心室中隔欠損像。

- A. 心室短軸断層像にて、心室中隔の欠損口 (VSD) が描出された直接的所見。
- B. カラードップラー法によって左心室 (LV) から心室中隔の欠損口を通過して右心室 (RV) に向かう短絡血流がみえる。C. D. パルスドップラー法による心室中隔欠損部の血流パターン。収縮期に左室-右室方向の短絡血流を認める。矢頭は短絡血流波形を示す。C. はサンプルポイントを示す。

図 7



生後5日目の her2 ホモベビーマウスの房室弁逆流像。

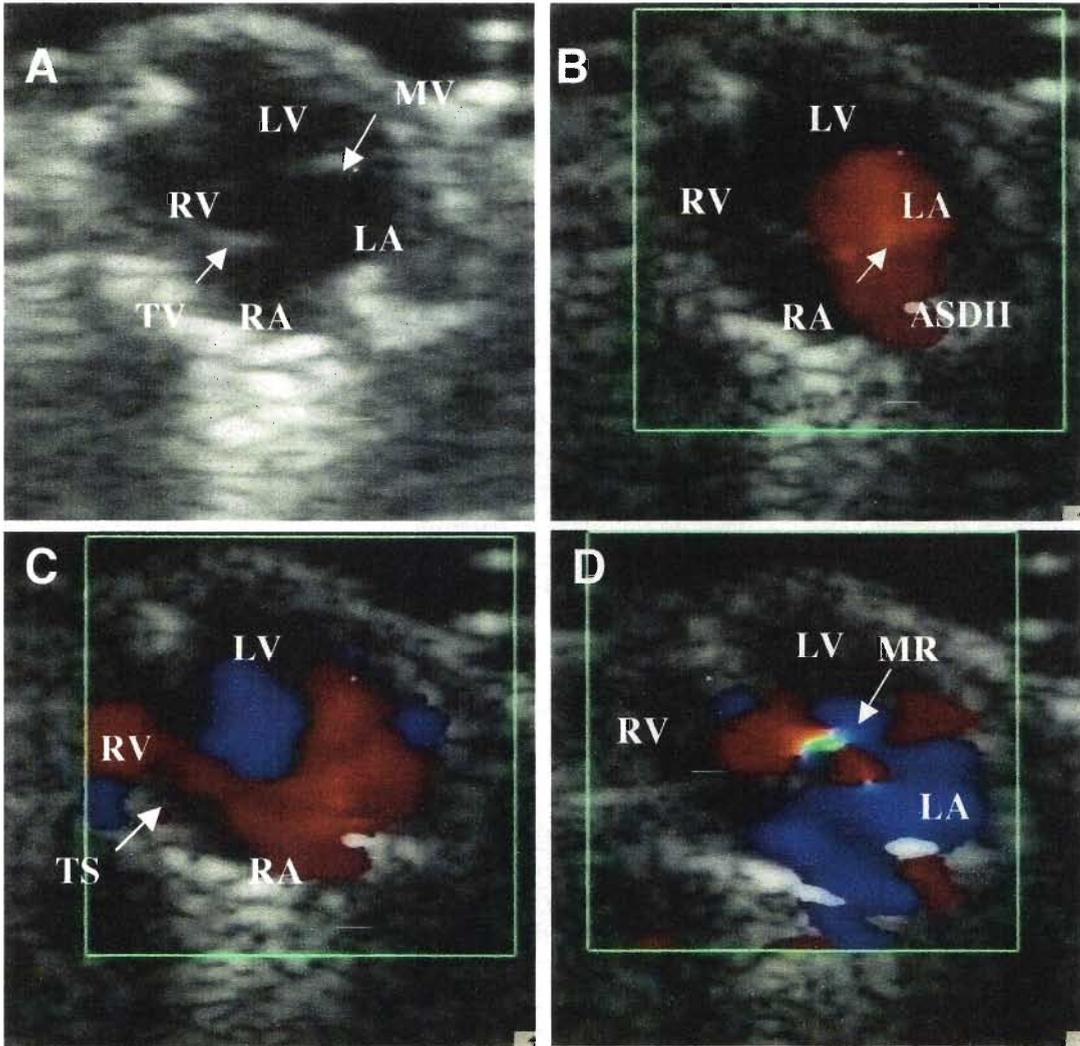
A. 心尖部四腔断面カラードップラー心エコー図。それぞれの心房から心室に向かう心室流入血流が赤色で描出される。

B. 左心室流入部の正常血流パルスドップラー波形。

C. 心尖部四腔断面カラードップラー心エコー図。収縮期に三尖弁および僧帽弁で逆流が認められる。プローブから遠ざかる血流のため青色（矢印）に描出される。

D. パルスドップラー法による僧帽弁の収縮期逆流波形。

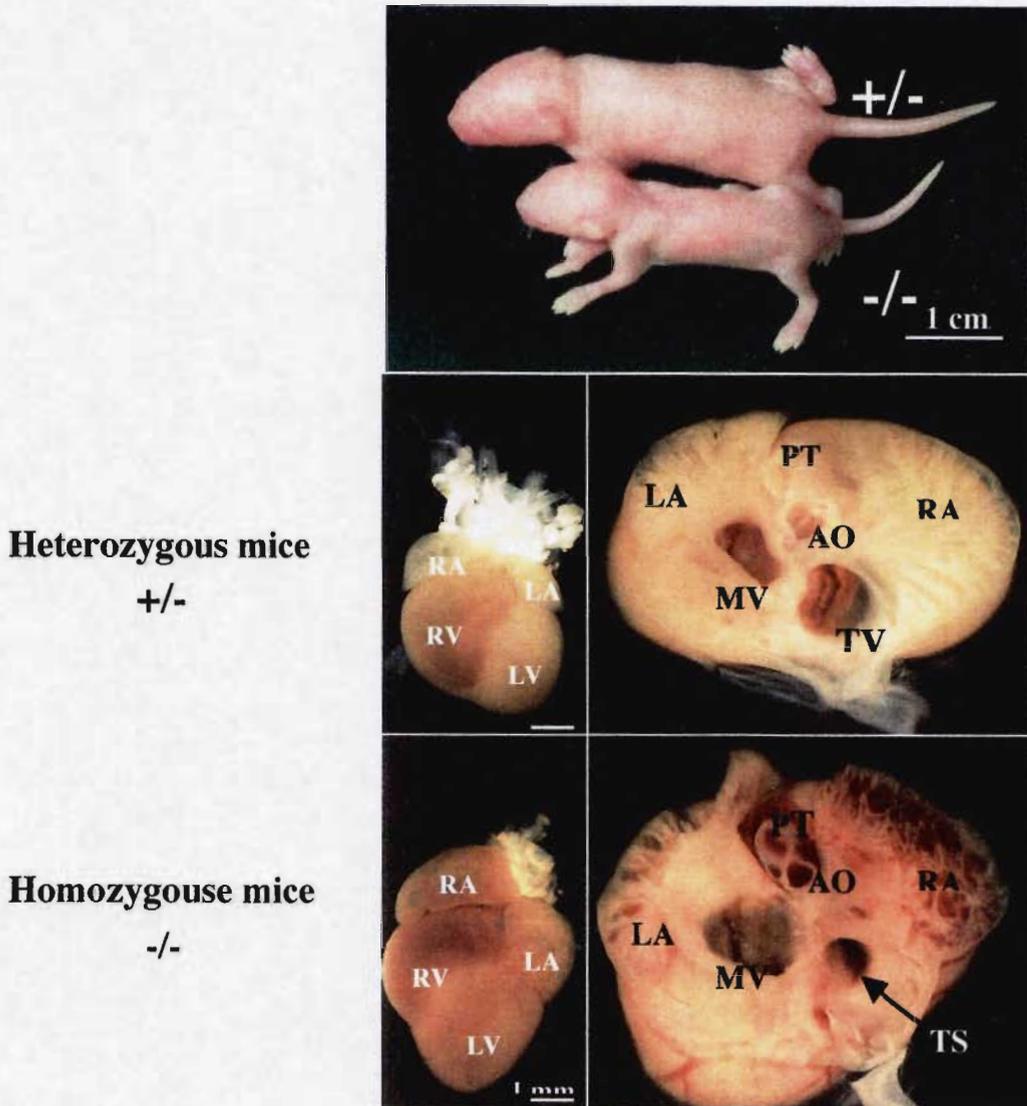
図 8



生後 5 日 *hesr2* ホモベビーマウスの心房中隔二次孔欠損、三尖弁狭窄および僧帽弁逆流像。

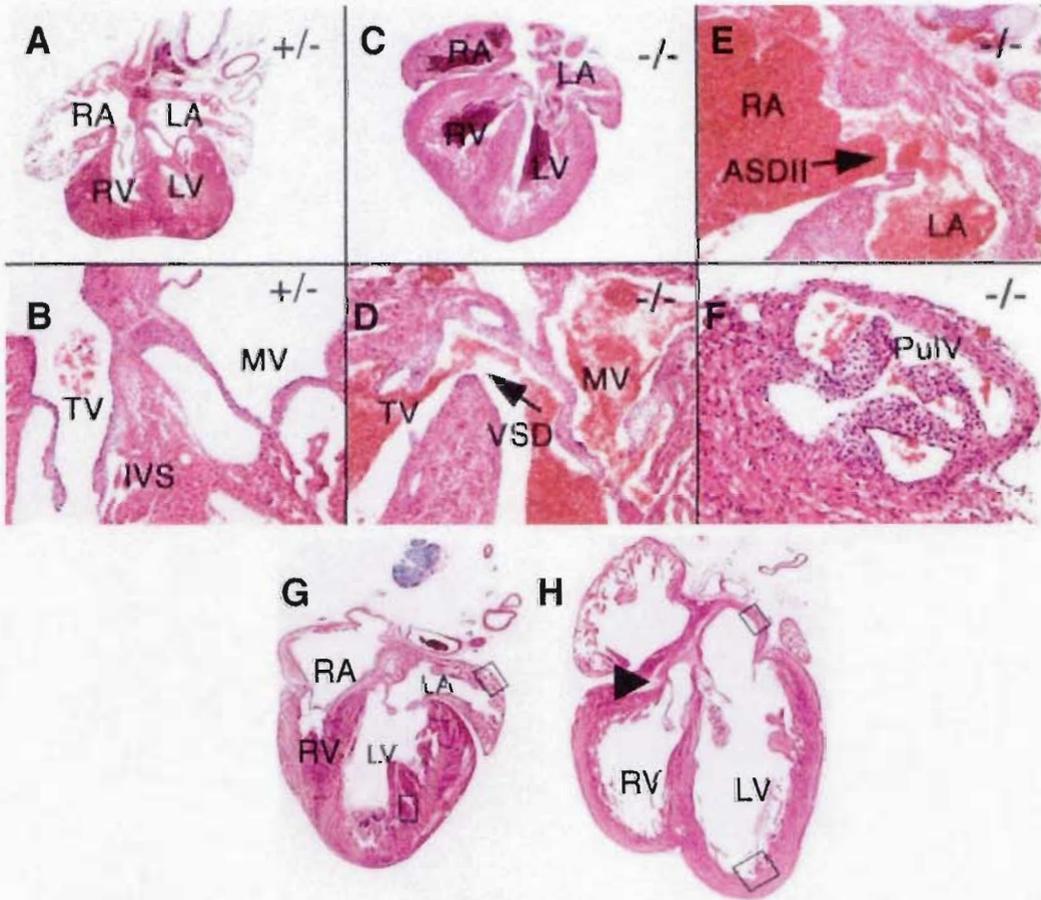
- A. 心尖部四腔断面像。三尖弁狭窄 (TS) を認める。LA、左心房；LV、左心室；RA、右心房；RV、右心室。
- B. 右心房から左心房へ心房中隔二次孔欠損部 (ASDII) を短絡するカラードップラー血流像。この症例では三尖弁狭窄があるため RA 圧が高い。
- C. 三尖弁狭窄 (TS) の通過血流を示すカラードップラー像。
- D. 心室収縮期に認められる僧帽弁逆流 (MR) のカラードップラー像。

図 9



生後5日のベビーマウスのヘテロとホモ。全身の発育が悪く、生後5日頃ほとんどが死亡する。ホモマウスの心臓は拡大して胸腔いっぱい占有し、三尖弁の狭窄が認められ、また僧帽弁の形成も悪い。

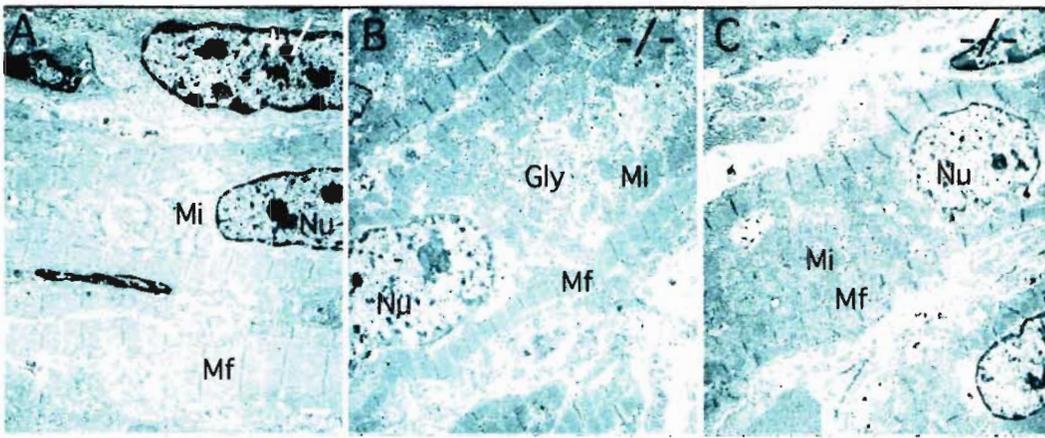
図 10



Hesr2 ホモマウス心臓の組織所見。

ヘマトキシリン-エオジン染色。A、B、Gはヘテロマウス。C-F、Hはホモマウスを示す。ホモマウス心臓では、(D) 膜様部心室中隔欠損 (VSD)、(E) 心房中隔二次孔欠損 (ASDII)、(H) 三尖弁狭窄 (矢尻) が認められる。ホモマウスの房室弁の発育は低形成である。

図 11



生後5日の *hesr2* ホモマウス心筋の電顕所見。

A. 正常ヘテロマウス。Z-バンドは整列して、よく形成された筋原線維 (Mf) が密になりつつあり、円形のミトコンドリア (Mi) が認められる。B-C. *hesr2* ホモマウス。筋原線維の形成は粗で、空胞のあるミトコンドリアは異型性を示し、多数のグリコーゲン粒子が認められる。

第 73 回日本衛生学会総会 (H15.3 月 大分市)

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

今野結子、○米田早織、富田幸子、星 佳芳、植松 宏、石原陽子

[目的]現在、内分泌攪乱物質の濃度反応曲線での閾値の有無が問題となっている。そこで、マウス胎仔骨の骨発達異常を指標として、合成女性ホルモン(DES)の濃度反応曲線の線形について検討した。[方法]BALB/c 妊娠マウスに、DES を 1 匹当たり 0.1ml で腹部皮下に胎齢 10 日目より隔日 3 回投与した。17. 5 日齢の胎仔を摘出し、Alizarin red, Alcian blue で骨染色を行った。骨化と形態異常は、頭部と体幹部に分けて、実体顕微鏡下で対照群と比較することによって観察し、DES 濃度と異常発生率の濃度反応曲線を作成した。[結果]DES 投与による骨異常としては、体幹部では全身又は部分的骨化の遅延や欠如、環椎と軸椎の形態異常、肋骨融合を、頭部では上後頭骨と上顎骨の骨化遅延、上顎骨の形態異常を認めた。高濃度 DES では、形態異常発生頻度が骨化遅延のそれより高い傾向を認めた。濃度反応曲線は、頭部及び体幹部で共に DES  $5 \times 10^{-8}$ g/kg 体重で最小発生率を示す U 字型曲線を描いた。[考察]DES  $5 \times 10^{-11} \sim 5 \times 10^{-5}$ g/kg 体重の濃度範囲では、頭部及び体幹部の骨異常発生率に閾値を認めなかった。本成績から、従来より指摘されている閾値の欠如が、胎仔骨発達異常を指標とした DES 濃度反応曲線でも観察されることが示唆された。本研究は、科学研究費基盤(B)、私学大学院重点研究助成金によって行われたものである。