
心臓冠動脈発生における心臓外細胞の関与

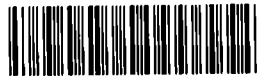
- 先天性心疾患モデルラット全胚培養での検討

1 6 3 9 0 2 9 9

**平成 16 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 中川 雅生
滋賀医科大学医学部講師**



2005014977

〈はしがき〉

小児循環器病学の分野において、先天性心疾患の診断や治療は著しい進歩をとげた。先天性心疾患の成因に関する研究分野では、この数年のヒトゲノム解析の目覚ましい進展により、心臓の発生に関与する遺伝子とその異常により引き起こされる先天性心疾患の関係が明らかにされつつある。今や、「先天性心疾患をいかに次世代に継承しないようにするか」が大きな命題として課せられている。しかし、ヒトの心血管奇形の発生には、遺伝因子と環境因子があることが疫学的に示されており、環境因子が心臓発生の過程でそれに関与する遺伝子に何らかの異常を引き起こすことが推測されていても、どのように作用するのかは明らかにされていない。

私どもは、平成5年から平成6年にかけて科学研究費補助金（一般研究-C）を受け、先天的に心血管奇形を有するラット（WKY/NCrj）の胚を培養することで心臓発生の過程を観察し、免疫組織学的手法によって神経堤細胞がどのように関与するかについて実験的研究を行ってきた。平成7年から8年にかけては、同じく科学研究費補助金（基盤研究-C）を受け、催心奇形性のある化学薬品（ビスダイアミン）を投与したラット胚を培養し、心臓発生過程においてこの薬剤が及ぼす影響について研究を進めてきた。そして、平成9年から10年には再度科学研究費補助金（基盤研究-C）を受け、ビスダイアミンにより引き起こされる心血管奇形とWKY/NCrjラットの心血管奇形を形態的、循環動態的に比較検討することで、心奇系発生に関与する一次的な因子と二次的な因子を明らかにすべく研究を行った。そして、この二つの動物モデルにおいて、心奇形発生の機序は同一であったが出生後の生存率には差があり、対償機転や二次的な循環動態に違いが存在する可能性があることを示すことができた。次いで平成11年から12年には科学研究費補助金（基盤研究-C）により、正常な冠動脈の発生過程の解明と、ビスダイアミン投与ラット胎仔とWKY/NCrjラット胎仔にみられる冠動脈奇形の成因に関する研究に取り組んだ。この研究で、神経堤細胞の障害に基づく動脈幹の分割異常に伴い冠動脈原基に位置異常が生じること、さらに心外膜の発生異常も同時に存在していることを明らかにした。平成13年から14年にも科学研究費補助金（基盤研究-C）を受け、ビスダイアミン投与ラットにおける心外膜の発生異常と冠動脈奇形の発生過程を組織学的に解明する研究に取り組み、そしてその結果を元に、平成16年から17年に、科学研究費基盤研究（B）の補助による「冠動脈の発生に関与する心外膜前駆細胞の障害と冠動脈の発生異常との関係」についての研究へと発展させてきた。

これまでの成果は、研究を始めるにあたって意図した目標とはまだかなりの隔たりがあり十分満足のいくものとはいえないが、心血管奇形発生の機序を考

える上での礎石を築くことができたと思っている。

近年、医療の分野で遺伝子治療が実践され、遺伝子疾患の根治も可能となることが期待される。そのためには、疾患に關与する遺伝子とその発症機序を明らかにすることが重要であるのは言うまでもない。先天性心疾患のように遺伝子の異常とそれが次世代に継承される割合、さらに表現型の多様性と環境因子が複雑にかかわる疾患はなおさらその発症過程を明らかにする必要がある。この研究を開始した初心を忘れず、目標に沿うよう研究を進めていきたい。そして、先天性心疾患が本当に根治できる時期が来ることを切に願ってやまない。

研究組織

研究代表者	中川雅生	(滋賀医科大学医学部講師)
研究分担者	藤野英俊	(滋賀医科大学医学部助手)
研究分担者	今中恭子	(三重大学医学部講師)
研究分担者	富田幸子	(東京女子医科大学医学部助手)
(研究協力者	花戸貴司、渡邊格子、黄瀬一慶、岡本暢彦、西島節子)	

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 16 年度	7,200,000	0	7,200,000
平成 17 年度	3,900,000	0	3,900,000
総 計	11,100,000	0	11,100,000

研究発表

(1) 学会誌等

(英文発表)

- 1) Okamoto N, Nakagawa M, Nishijima S, Hanato T, Fujino H, Narita T, Takeuchi Y, Imanaka K, Teratogenic effects of bis-diamine on the

developing myocardium. Birth Defects Research Part A 70: 132-141, 2004.

- 2) Shiraishi I, Yamagishi M, Toiyama K, Osawa Y, Nakagawa M, Takahashi A, Shunto K, Hamaoka K, Coronary artery obstruction due to membranous ridge of the right sinus valsalva associated with Teratology of Fallot: syncope mimics anoxic spell. Ann Thorac Surg 77: 321-322, 2004.
- 3) Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. Histol Histopathol 19:517-525, 2004.
- 4) Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Saga Y, Johnson RL Targeted disruption of *hesr2* results in atrio-ventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. Cir Res 95:540-547, 2004.
- 5) Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Komatsu K, Nakazawa M, Fukaya T, Baba K, Yutani C, Immunohistochemical study of apparently intact coronary artery in a child after Kawasaki disease. Ped Inter, 46: 590-596, 2004.
- 6) Nakagawa M, Kise K, Okamoto N, Fujino H, Iwai M, Nomura Y, Sawa H, Serious cardiac and pulmonary calcification in a young peritoneal dialysis patient: potential role of continuous correction of acidosis. Clin Nephrol 63:313-316, 2005.
- 7) Nakagawa M, Osawa Y, Hanato T, Fujino H, Watanabe N, Takeuchi Y, Association of aortic arch anomalies and subclavian artery supply disruption with neurofibromatosis. Int J Cardiol 104:32-34, 2005.
- 8) Kise K, Nakagawa M, Okamoto N, Hanato T, Watanabe N, Nishijima S, Fujino H, Takeuchi Y, Shiraishi I, Teratogenic effects of bis-diamine on the developing cardiac conduction system. Birth Defects Research Part A 73:547-554, 2005.

- 9) Fujino H, Nakagawa M, Nishijima S, Okamoto N, Hanato T, Watanabe N, Shirai T, Kamiya H, Takeuchi Y, Morphological differences in cardiovascular anomalies induced by bis-diamine between Sprague-Dawley and Wistar rats. *Cong Anom* 45:52-58, 2005.
- 10) Ito-Akabori S, Nakagawa M, Okamoto N, Fujino H, Yamagishi M, Shunto K, Kitamura N, Clinical characteristics and diagnosis of double-orifice left atrioventricular valve associated with other congenital heart disease. *Heart Vessels* 20: 286-289, 2005
- 11) Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Y, Saga Y, Johnson RL. Mouse *hesr1* and *hesr2* genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Dev Biol* 278: 301-309, 2005.
- 12) Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Johnson RL, *hesr*, a mediator of the Notch signaling in heart and vessel development. *Trends Cardiovasc Med* 15:190-194, 2005.
- 13) Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kannno J, Saga Y. *Mesp1*-non-expressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn* 235:395-402, 2006
- 14) Yamamoto K, Onoda K, Sawada Y, Fujinaga K, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Yoshida T, Yada I, Tenascin-C is an essential factor for neointimal hyperplasia after aortotomy in mice. *Cardiovasc Res* 65:737-742, 2005.
- 15) Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T, Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol* 167:71-80, 2005.
- 16) Watanabe N, Nakagawa M, Hanato T, Takeuchi Y, Hara M, Yoshida T, Imanaka YK, An *in vitro* model for mouse coronary vasculogenesis. *Anat Rec* (in press)

(和文発表)

- 1) 宮川一富田幸子、今中一吉田恭子、杉村洋子、富澤康子、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 10:55-60、2004

(2) 口頭発表

(一般口演)

- 1) Watanabe N, Hanato T, Nakagawa M, Imanaka-Yoshida-K, An in vitro model for mouse coronary vasculogenesis. Weinstein Cardiovascular Conference 2004 (Leiden, Netherland), 2004. 5. 14.
- 2) 黄瀬一慶、岡本暢彦、花戸貴司、渡邊格子、神谷 博、白井文晶、西島節子、藤野英俊、中川雅生、白石 公、Bis-diamineが刺激伝道系発生に与える影響について、第40回日本小児循環器学会、2004. 6. 30
- 3) 花戸貴司、渡邊格子、岡本暢彦、西島節子、藤野英俊、中川雅生、竹内義博、今中恭子、マウス冠動脈発生におけるテネイシンCの役割、第40回日本小児循環器学会、2004. 6. 30
- 4) 渡邊格子、花戸貴司、中川雅生、今中恭子、マウス冠血管形成の in vitro モデル、第3回心臓血管発生研究会、2004. 7. 2
- 5) 渡邊格子、花戸貴司、中川雅生、今中一吉田恭子、An in vitro model for mouse coronary vasculogenesis. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2005. 3. 19
- 6) Watanabe N, Hanato T, Nakagawa M, Imanaka-Yoshida-K, An in vitro model for mouse coronary vasculogenesis, a possible role of growth factors. Weinstein Cardiovascular Conference 2005 (Tucson), 2005. 5. 20.
- 7) Hanato T, Watanabe N, Fujino H, Nakagawa M, Imanaka-Yoshida-K,

Yoshida T, The expressional pattern of Tenascin-C during coronary artery development in mouse embryo. Weinstein Cardiovascular Conference 2005 (Tucson), 2005. 5. 20

8) Miyagawa-Tomita S, Nakagawa M, Sugimura H, Nakazawa M, Imanaka-Yoshida-K, Tenascin-C may regulate behavior of proepicardial organ-derived cells. Weinstein Cardiovascular Conference 2005 (Tucson), 2005. 5. 21

9) 松岡瑠美子、小穴慎二、市田路子、小川俊一、小野安生、小山耕太郎、上砂光裕、黒江兼司、里見元義、城尾邦隆、白石 公、高橋悦郎、塚野真也、富田 英、中川雅生、中西敏雄、羽根田紀幸、馬場 清、広田浜夫、福重淳一郎、松裏裕行、村井孝安、村上智明、森 克彦、森 一博、安田東始哲、山岸敬幸、吉永正夫、Down 症候群に認められる心血管疾患の特徴、第 41 回日本小児循環器学会、2005. 7. 7

(3) 出版物

(英文発表)

1) Okamoto N, Nakagawa M, Fujino H, Nishijima S, Hanato T, Narita T, Yoshida-Imanaka K, Cardiovascular Development and Congenital Malformations. Molecular and genetic mechanisms. Artman M, Benson DW, Srivastava D, Nakazawa M., eds., Teratogenic effects of bis-diamine on the developing myocardium. pp44-46, Blackwell, Futura, New York, 2005.

2) Hanato T, Nakagawa M, Okamoto N, Nishijima S, Fujino H, Takeuchi Y, Cardiovascular Development and Congenital Malformations. Molecular and genetic mechanisms. Artman M, Benson DW, Srivastava D, Nakazawa M., eds., Abnormal coronary development in bis-diamine treated rat embryo. pp116-118, Blackwell, Futura, New York, 2005.

3) Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M., Editorial: Cardiac neural crest. In: Cardiovascular development and congenital

malformations. Molecular and genetic mechanisms. Artman M, Benson DW, Srivastava D, Nakazawa M.,eds., Blackwell, Futura, New York, pp.137-140, 2005.

- 4) 中川雅生、花戸貴司、渡邊格子、Annual Review 循環器 2005、矢崎義雄、山口 徹、高本眞一、中澤 誠編、冠状動脈の発生、pp1-7、中外医学社（東京）、2005
- 5) 中川雅生、新目でみる循環器病シリーズ13 先天性心疾患、中澤誠編、左冠状動脈肺動脈起始症（Bland-White-Garland 症候群）、pp264-268、メジカルビュー社（東京）、2005
- 6) 中川雅生、新目でみる循環器病シリーズ13 先天性心疾患、中澤誠編、冠動静脈瘻、pp269-272、メジカルビュー社（東京）、2005
- 7) 中川雅生、新目でみる循環器病シリーズ13 先天性心疾患、中澤誠編、冠動脈開口異常（閉鎖、狭窄、起始異常）、pp273-278、メジカルビュー社（東京）、2005
- 8) 中川雅生、臨床心臓発生学、山岸敬幸、白石公編、冠動脈の発生・生理と病態、メジカルビュー社（東京）、（2006 刊行予定）
- 9) 中川雅生、心臓血管発生学テキスト、心臓血管発生研究会編、冠動脈の発生、（2006 刊行予定）

目 次

I 冠動脈の発生

1. Tenascin-C expressional patterns during coronary artery development. Hanato T, Nakagawa M, Okamoto N, Nishijima S, Fujino H, Takeuchi Y, pp11-18
2. An *in vitro* model for mouse coronary vasculogenesis. Watanabe N, Nakagawa M, Hanato T, Takeuchi Y, Hara M, Yoshida T, Imanaka YK, pp19-71
3. 冠状動脈の発生、中川雅生、花戸貴司、渡邊格子 pp73-79
4. 冠動脈の発生と発達に関する最近の知見、宮川一富田幸子、今中一吉田恭子、杉村洋子、富澤康子、中澤 誠、pp81-86
5. 冠動脈の発生・生理と病態、中川雅生 pp87-101
6. Association of aortic arch anomalies and subclavian artery supply disruption with neurofibromatosis. Nakagawa M, Osawa Y, Hanato T, Fujino H, Watanabe N, Takeuchi Y, pp103-105
7. 左冠状動脈肺動脈起始症(Bland-White-Garland症候群) 中川雅生 pp107-118
8. 冠動静脈瘻、中川雅生 pp119-131
9. 冠動脈開口異常(閉鎖、狭窄、起始異常)、中川雅生 pp133-146

II 心臓の発生と遺伝子

1. Mesp1-non-expressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kannno J, Saga Y. pp147-154
2. Mouse *hesr1* and *hesr2* genes are redundantly required to

mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system.
Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Y, Saga Y, Johnson RL.
Pp155-163

3. *Hesr*, a mediator of the Notch signaling in heart and vessel development. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Johnson RL, pp165-169
4. Targeted disruption of *hesr2* results in atrio-ventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Saga Y, Johnson RL pp171-178
5. Clinical characteristics and diagnosis of double-orifice left atrio-ventricular valve associated with other congenital heart disease. Ito-Akabori S, Nakagawa M, Okamoto N, Fujino H, Yamagishi M, Shunto K, Kitamura N, pp179-182

III ビスダイアミンが心臓及び冠動脈の発生に及ぼす影響

1. Teratogenic effects of bis-diamine on the developing myocardium. Okamoto N, Nakagawa M, Nishijima S, Hanato T, Fujino H, Narita T, Takeuchi Y, Imanaka K, pp183-193
2. Teratogenic effects of bis-diamine on the developing cardiac conduction system. Kise K, Nakagawa M, Okamoto N, Hanato T, Watanabe N, Nishijima S, Fujino H, Takeuchi Y, Shiraishi I, pp195-202
3. Morphological differences in cardiovascular anomalies induced by bis-diamine between Sprague-Dawley and Wistar rats. Fujino H, Nakagawa M, Nishijima S, Okamoto N, Hanato T, Watanabe N, Shirai T, Kamiya H, Takeuchi Y, pp203-210
4. Teratogenic effects of bis-diamine on the developing coronary vasculature in rat embryos. Hanato T, Nakagawa M, pp211-236