

200911018A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

RMCE 法による心血管傷害モデルの開発と
核酸医薬標的分子の探索に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成 22(2010)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

RMCE法による心血管傷害モデルの開発と核酸医薬標的分子の探索に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成22（2010）年5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

RMCE法による心血管傷害モデルの開発と核酸医薬標的分子の探索に関する研究 ----- 1

栗原裕基

II. 分担研究報告

1. マウス発生工学による遺伝子ノックインマウスの樹立と解析に関する研究 ----- 7

栗原由紀子

2. エンドセリンA受容体遺伝子を発現する心血管細胞の動態に関する研究 ----- 11

西山功一

3. 心血管系の細胞系譜に関する研究 ----- 13

富田幸子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 20

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

RMCE 法による心血管傷害モデルの開発と核酸医薬分子標的の探索

研究代表者 栗原 裕基 東京大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

近年、マイクロ RNA (miRNA) の病態生理学的意義が注目されている。本研究は、エンドセリン A 受容体遺伝子座 (ETAR) を標的とするリコンビナーゼ依存性カセット交換を用いたマウス遺伝学的研究を基盤として、心および平滑筋細胞における miRNA の病態生理的役割の検証や標的分子の探索が可能なマウスモデルの確立を試みた。その結果、心筋、血管平滑筋細胞系譜のマッピング、ジフテリア毒素による細胞特異的な傷害の誘導に応用が期待できる ETAR-CreERT2 ノックインマウスが得られた。miRNA ノックインによる疾患モデルマウス作成のため、レスキュー実験でその有効性の検証を行った後、ETAR 遺伝子座への miR199a+miR214 ノックインを試みている。一方、本研究の標的細胞である ETAR 発現心筋細胞が発生初期に心流入路の限局した領域に発生し、その後左心室と両心房に寄与すること、刺激伝導系の形成とも関連する可能性があることが明らかになり、本研究計画の重要な基盤となるとともに、心臓発生のメカニズムを理解する上でも重要な知見となった。さらに、鳥類における領域特異的な蛍光色素標識や血管鋳型作成技術をマウスに応用することによって、心血管系の病態解析の基盤が充実した。これらの実験系は、心血管系における miRNA 特異的発現による疾患モデルマウスの確立と解析に有用と考えられる。

研究分担者氏名

栗原由紀子 東京大学大学院医学系研究科講師
西山 功一 東京大学大学院医学系研究科助教
富田 幸子 東京女子医科大学医学部助教

A. 研究目的

近年、マイクロ RNA (miRNA) をはじめとする non-coding RNA が、さまざまな生理機能や病態形成の担い手として、さらには創薬の標的として注目されている。循環系においても、心肥大や線維化、血管形成に関わる miRNA が報告されるなど、病態での役割の検証や標的分子の探索が可能な動物モデルシステムが強く求められている。本研究は、我々がこれまで行ってきたエンドセリン A 受容体遺伝子座 (ETAR) を標的とするリコンビナーゼ依存性カセット交換法 (Recombinase-mediated cassette exchange; RMCE) を用いたマウス遺伝学的研究を基盤として、心および平滑筋細胞における miRNA の病態生理的役割の検証や標的分子の探索が可能なマウスモデルを確立することを目標とする。これにより、心筋梗塞や血管病の病態に関与する miRNA とその標的分子を同定し、核酸医薬開発への道を探る。

B. 研究方法

(1) 遺伝子改変マウスの作成: ETAR 遺伝子座、2つ

の miRNA (miR199a, miR214) の前駆体である Dnm3os 遺伝子座のそれぞれに変異型 lox 配列を組み込んだ、RMCE によるノックイン可能な ES 細胞に対し、EGFP 遺伝子カセット、CreERT2 (タモキシフェン誘導型 Cre) 遺伝子カセット、miR199a+miR214 遺伝子カセットを変異型 lox 配列で挟んだノックインベクターを Cre-アデノウイルスとともに導入した。ノックインベクターに組み込んだピューロマイシン耐性遺伝子を用いた薬剤耐性クローンを回収し、PCR による遺伝子型のスクリーニングで RMCE によるノックイン ES 変異体を選別した。これより作成したキメラマウスから、生殖細胞系列移行を示したものを選択して、F1 ヘテロ結合体を得た。

ETAR-CreERT2 ノックインマウス F1 ヘテロ結合体については、これと CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配を行い、複合変異マウスを得た。

(2) 遺伝子改変マウス表現型の解析: ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスについて、以下の方法で ETAR 発現細胞の動態を、心血管系を中心に解析した。

- i) β -ガラクトシダーゼ染色による lacZ 発現細胞の可視化
- ii) EGFP 蛍光シグナルの生体観察による発現細胞の動態解析
- iii) 心筋、平滑筋マーカーに対する in situ ハイブリ

ダイゼーション、免疫染色

iv) 蛍光色素標識による細胞の生体追跡

v) EGFP 発現細胞の移植による細胞動態の解析

(3) 心臓細胞の蛍光標識解析: ニワトリ・ウズラ移植キメラ胚などを用いて、神経堤細胞をはじめとする心臓発生領域に蛍光色素を微小注入し、発生過程における細胞動態を可視化した。

(4) 血管鋳型の作成: 血管系、特に冠動脈の形態解析として、合成樹脂を大動脈近位部から冠動脈入口部に注入し、血管鋳型を作成した。これらの技術を、マウス胚にも適用した。

C. 研究結果

1. 遺伝子ノックインマウスの作成

(1) ETAR-CreERT2 ノックインマウスを樹立した。これにより、ETAR を発現する心筋、血管平滑筋におけるコンディショナルな遺伝子組み換え→発現誘導が可能になった。

(2) (1)のマウスと CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配を開始した。これにより、遺伝子組み換え効率が評価できるとともに、ETAR を発現する心筋、血管平滑筋細胞系譜のマッピング、本研究の中心となる細胞傷害の誘導が期待される。

(3) miR199a+miR214 欠損マウスにおいて、miR199a+miR214 ノックインが表現型を部分的にレスキューすることを明らかにした。これにより、RMCE ノックインシステムによる miRNA の機能的発現が確かめられた。

(4) (3)のノックインベクターを用いて ETAR 遺伝子座への miR199a+miR214 ノックイン ES 細胞は得られたが、キメラマウスの生殖細胞系列移行には至っていない。

2. マーカー遺伝子ノックインマウスによる ETAR 発現細胞動態の解析

ETAR 遺伝子座にノックインした場合の発現標的細胞の同定とその動態を把握しておくことは、モデルマウスの病態解析などにおいて不可欠の基盤となる。そのため、ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスにおけるマーカー遺伝子の発現解析を行い、本研究の標的細胞である ETAR 発現心筋細胞が発生初期に心流入路の限局した領域に発生し、その後左心室と両心房に寄与すること、刺激伝導系の形成とも関連する可能性があること、発生初期より血管平滑筋において広く発現が分布することなどが示された。

3. 心血管系の発生と病態における細胞系譜解析法の確立

鳥類において、神経堤細胞をはじめとする領域特異的な蛍光色素標識や、合成樹脂などの血管内注入による鋳型作成によって、心血管系の発生過程の解析

法を改良するとともに、マウスに応用することによって、正常胚と遺伝子変異による異常胚の心血管系の解剖学的解析がより精密に行えるようになった。

D. 考察

ETAR-CreERT2 ノックインマウスにより、ETAR 発現細胞におけるコンディショナルな遺伝子組み換えが可能になった。CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配は、このシステムの最初の応用例であり、遺伝子組み換え効率の評価とともに、ETAR 発現細胞系譜のマッピング、ジフテリア毒素による ETAR 発現細胞特異的な細胞傷害の誘導が期待され、心血管系の病態モデルとなる可能性が期待できる。

miR199a+miR214 ノックインによるレスキュー実験は、RMCE ノックインシステムによる miRNA の機能的発現がこのベクターデザインによって可能であることを示しており、現在並行して行っている ETAR 遺伝子座への miR199a+miR214 ノックイン実験の妥当性の根拠となる。miR199a と miR214 は、心肥大において上昇が報告されている miRNA であり、ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスによる ETAR 発現細胞動態の解析の結果とともに、次年度以降の基盤となる成果と考えられる。

次年度はこれらを新しいノックインマウスの作成や病態モデルの作成に活用する予定である。また、本研究で得られたマウスについては、表現型の妥当性や有用性が確認できたところで、論文発表とともに、独立行政法人 医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンク等への寄託により、本領域の研究推進に広く貢献すると期待できる。

さらに、鳥類における方法論の改良とマウスへの応用は、CreER ノックインマウスの活用や心筋の領域特異的マーカー染色を組み合わせることにより、病態形成に寄与する細胞系譜を解析する基盤となることが期待される。

E. 結論

ETAR-CreERT2 ノックインマウスのマウスの樹立と ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスによるノックイン標的細胞の動態解析を行った。これらの実験系は、心血管系における miRNA 特異的発現による疾患モデルの確立と解析に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitani, A., Nagase, T., Fukuchi, K.,

- Aburatani, H., Makita, R., Kurihara, H. (2009). Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 180:326-38.
2. Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H. and Sasaki, H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* 16:398-410.
 3. Ogonuki, N., Inoue, K., Hirose, M., Miura, I., Mochida, K., Sato, T., Mise, N., Mekada, K., Yoshiki, A., Abe, K., Kurihara, H., Wakana, S. and Ogura, A. (2009). A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE* 4:e4943.
 4. Harada, N., Narimatsu, N., Kurihara, H., Nakagata, N., Okajima, K. (2009). Stimulation of sensory neurons improves cognitive function by promoting the hippocampal production of insulin-like growth factor-I in mice. *Transl Res.* 154:90-102.
 5. Narimatsu N, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Sobue K, Okajima K. (2009). Donepezil improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330:2-12.
 6. 宮川-富田幸子, 今中-吉田恭子 (2009). 冠血管の発生. *細胞* 14 (13) :6-9.
 7. Gitton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Levi G. (2010). Evolving maps in craniofacial development. *Semin Cell Dev Biol.* 21:301-8.
 8. Zhao J, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K. (2010). Cilostazol improved cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *Neuropharmacology* 58:774-83.
 9. Cui X, Kushiyaama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, Shiomi M, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T. (2010). Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 87: 57-63
 10. Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S, Kato M. (2010). Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood* 115:4138-47
 11. Harada N, Zhao J, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K. (2010). Effects of topical application of alpha-D-glucosylglycerol on dermal levels of insulin-like growth factor-i in mice and on facial skin elasticity in humans. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74:759-65.
 12. Watanabe U, Miyagawa-Tomita S, Vincent SD, Kelly RG, Moon AM, Buckingham ME. (2010). Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. *Circ Res* 106:495-503.
 13. Vieux-Rochas M, Mantero S, Heude E, Barbieri O, Astigiano S, Couly G, Kurihara H, Levi G, Merlo GR. (2010). Spatio-temporal dynamics of gene expression of the Edn1-Dlx5/6 pathway during development of the lower jaw. *Genesis.* (in press)
 14. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. TGF- β 3 and MMP3 contribute to the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in canines. *Am J Vet Res* (in press)
 15. Heude E, Bouhalia K, Kurihara H, Kurihara Y,

Coulya G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. Proc Natl Acad Sci U S A. (in press)

2. 学会発表

1. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium」 日本発生生物学会第42回大会 2009年5月28・30日 新潟市・朱鷺メッセ
2. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 櫛山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「Functional analysis of subtype-specific domains of endothelin receptor type A in craniofacial development」 第42回日本発生生物学会大会 2009年5月31日 新潟市・朱鷺メッセ
3. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Hiroki Kurihara 「Blood vessel formation as a stage of coordinated morphogenesis- Analysis using in vitro real-time imaging」 日本数理生物学会第20回年会 2009, 9/10-11 東京, 東京大学
4. 西山 功一, 有馬 聡, 栗原 裕基 「in vitro ライブイメージングによる血管新生機構の解明」 第17回日本血管生物医学学会大会 2009, 10/8-9 東京, 東京大学
5. 有馬 聡, 西山 功一, 候 聡志, 小関 宏明, 内島 泰信, 栗原 由紀子, 栗原 裕基 「Modular analysis of angiogenic cell movement by real-time live imaging」 第17回日本血管生物医学学会大会 2009, 10/8-9 東京, 東京大学
6. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara. 「Id1-mediated dynamic regulation of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第17回日本血管生物医学学会大会, 2009, 10/8-9, 東京, 東京大学
7. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 may control the specification and the timing of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第82回日本生化学会大会 2009, 10/21-24 神戸, 神戸ポートアイランド
8. 礪波 一夫, 栗原 由紀子, 内島 泰信, 浅野 知一郎, 栗原 裕基 「活性中心欠大型カルパインによる新しい細胞骨格制御機構の同定」 第82回日本生化学会大会 2009年10月22日 神戸・神戸ポートアイランド
9. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 櫛山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「顎顔面の形態形成におけるエンドセリン受容体の in vivo ドメイン機能解析」 第82回日本生化学会大会 2009年10月22日 神戸市・神戸ポートアイランド
10. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 regulates angiogenesis by determining the specification and the timing of Notch signaling」 American Heart Association, scientific session 2009, 11/8-12 Orland, USA
11. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 相賀 裕美子, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the first heart field contributing to chamber myocardium」 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜市・パシフィコ横浜
12. 内島 泰信, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 藤澤 興, 櫛山 櫻, 栗原 裕基 「Role of non-coding RNA Evf2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway regulation jaw morphogenesis」 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜市・パシフィコ横浜
13. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 櫛山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗

- 原 裕基 「In vivo analysis of subtype-specific domain functions of endothelin receptors in craniofacial development」 第32回日本分子生物学会 2009年12月10日 横浜市・パシフィコ横浜
14. 礪波 一夫, 栗原 由紀子, 内島 泰信, 浅野知一郎, 栗原 裕基 「活性中心欠失型カルパインによる低分子量Gタンパク質 Rac1 の活性制御機構の同定」 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜市・パシフィコ横浜
 15. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「Complex and Heterogeneous cell behaviour during angiogenesis revealed by real-time live imaging」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂
 16. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, Hiroki Kurihara 「Id1 may regulate angiogenesis by dynamically controlling Notch signaling in vascular endothelial cells」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂
 17. 今中恭子, 原万里, 浪方美幸, ポンセ デ レオン バルディビリア サラ イサベル, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子. 「テネニンCによる心臓血管新生の制御. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性心筋症に関する調査研究<北風班>」2008年度第2回総会・研究報告会. 2009年3月3日 大阪・国立循環器病センター図書館講堂
 18. 大林浩二, 宮川-富田幸子, 松本浩毅, 小山秀一, 廣瀬 昶. 「僧帽弁閉鎖不全症発症における TGF β の役割.」2009, 4月2-4日 第147回日本獣医学会, 宇都宮・総合文化センター
 19. MIYAGAWA-TOMITA S, SUGIMURA H, TOMIMATSU H, YOSHIDA T, NAKANISHI T, IMANAKA-YOSHIDA K 「Tenascin-C expression and neural crest are associated with formation of the coronary orifice.」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 132, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
 20. OBAYASHI K, MIYAGAWA-TOMITA S, MATSUMOTO H, KOYAMA H, NAKANISHI T, HIROSE H 「TGF- β 3 and MMP3 contribute to pathogenesis of myxomatous mitral valve in canine.」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 148, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
 21. ASAI R, KURIHARA Y, SATO T, KAWAMURA Y, KOKUBO H, TONAMI K, UCHIJIMA Y, SAGA Y, MIYAGAWA-TOMITA S, KURIHARA H 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium.」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 9, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
 22. VINCENT SD, MIYAGAWA-TOMITA S, BUCKINGHAM M. 「The transcriptional repressor prdm1/blimp1 is required within the second heart field for the morphogenesis of the distal outflow tract.」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 210, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
 23. 大林浩二, 宮川-富田幸子, 松本浩毅, 小山秀一, 廣瀬 昶. 「僧帽弁閉鎖不全症発症における TGF β 3 および MMP3 の役割.」第22回日本臨床獣医学会 2009年6月27-28日 埼玉
 24. 大林浩二, 宮川-富田幸子, 富松宏文, 中西敏雄. 「僧帽弁粘液腫様変性における TGF β の役割.」第45回日本小児循環器学会 2009年7月15-17日神戸・神戸国際会議場
 25. 渡辺祐介, 宮川-富田幸子, Robert Kelly, Anne Moon, Margaret Buckingham. 「心臓円錐動脈幹と鰓弓動脈の発生における中胚葉性 fgf8 と fgf10 の機能解析.」第8回心臓血管発生研究会, 2009年7月24-25日 福島・磐梯熱海温泉

26. 今中-吉田恭子, 原 万里, 浪方美幸, レオンバルディビィア サラ イサベル, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子「テネイシン C による心臓血管新生の制御。」第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference, 2009 年 9 月 4-6 日 北海道・小樽
27. Ando K, Yamagishi T, Miygawata-Tomita S, Imanaka-Toshida K, Yoshida T, Nakajima Y. 「Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development.」 49th Ann Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, 12/5-9 San Diego, CA, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

マウス発生工学による遺伝子ノックインマウスの樹立と解析に関する研究

研究分担者 栗原 由紀子 東京大学大学院医学系研究科講師

研究要旨

マウス発生工学により、エンドセリン A 受容体遺伝子座 (ETAR) を標的とするリコンビナーゼ依存性カセット交換 (RMCE) によるノックインマウスの作成を試みた。ETAR-CreERT2 ノックインマウスを樹立し、その解析のため CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配を開始した。これにより、心筋、血管平滑筋細胞系譜のマッピング、ジフテリア毒素による細胞特異的な傷害の誘導に応用が期待できる。現在、同遺伝子座に miR199a+miR214 ノックインを試みている。これにより、心血管系における miRNA 特異的発現による疾患モデルマウスの確立が期待される。

A. 研究目的

本研究は、我々がこれまで行ってきたエンドセリン A 受容体遺伝子座 (ETAR) を標的とするリコンビナーゼ依存性カセット交換法 (Recombinase-mediated cassette exchange; RMCE) を用いたマウス遺伝学的研究を基盤として、心および平滑筋細胞における miRNA の病態生理的役割の検証や標的分子の探索が可能なマウスモデルを確立することを目標とする。これにより、心筋梗塞や血管病の病態に関与する miRNA とその標的分子を同定し、核酸医薬開発への道を探る。

B. 研究方法

ETAR 遺伝子座に変異型 lox 配列を組み込んだ、RMCE によるノックイン可能な ES 細胞に対し、CreERT2 (タモキシフェン誘導型 Cre) 遺伝子カセット、miR199a+miR214 遺伝子カセットを変異型 lox 配列で挟んだノックインベクターを Cre-アデノウイルスとともに導入した。ノックインベクターに組み込んだピューロマイシン耐性遺伝子により薬剤耐性を獲得したクローンを回収し、PCR による遺伝子型のスクリーニングで RMCE によるノックイン ES 変異体を選別した。これより作成したキメラマウスから、生殖細胞系列移行を示したものを選択して、F1 ヘテロ結合体を得た。

ETAR-CreERT2 ノックインマウス F1 ヘテロ結合体については、これと CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配を行い、複合変異マウスを得た。

C. 研究結果

(1) ETAR-CreERT2 ノックインマウスを樹立した。

これにより、ETAR を発現する心筋、血管平滑筋におけるコンディショナルな遺伝子組み換え→発現誘導が可能になった。

(2) (1) のマウスと CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配を開始した。これにより、遺伝子組み換え効率が評価できるとともに、ETAR を発現する心筋、血管平滑筋細胞系譜のマッピング、本研究の中心となる細胞傷害の誘導が期待される。

(3) miR199a+miR214 欠損マウスのレスキュー実験で用いたノックインベクターを用いて ETAR 遺伝子座への miR199a+miR214 ノックイン ES 細胞は得られたが、キメラマウスの生殖細胞系列移行には至っていない。

D. 考察

ETAR-CreERT2 ノックインマウスにより、ETAR 発現細胞におけるコンディショナルな遺伝子組み換えが可能になった。CAG-CAT-lacZ マウス、Cre 誘導型 DTR 発現マウス (iDTR) との交配は、このシステムの最初の応用例であり、遺伝子組み換え効率の評価とともに、ETAR 発現細胞系譜のマッピング、ジフテリア毒素による ETAR 発現細胞特異的な細胞傷害の誘導が期待され、心血管系の病態モデルとなる可能性が期待できる。

miR199a+miR214 ノックインによるレスキュー実験は、RMCE ノックインシステムによる miRNA の機能的発現がこのベクターデザインによって可能であることを示しており、現在並行して行っている ETAR 遺伝子座への miR199a+miR214 ノックイン実験の妥当性の根拠となる。miR199a と miR214 は、心肥大において上昇が報告されている miRNA であり、

ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスによる ETAR 発現細胞動態の解析の結果とともに、次年度以降の基盤となる成果と考えられる。

E. 結論

ETAR-CreERT2 ノックインマウスのマウスの樹立により、心筋、血管平滑筋細胞系譜のマッピング、ジフテリア毒素による細胞特異的な傷害の誘導に応用が期待できる。現在、同遺伝子座に miR199a+miR214 ノックインを試みている。これにより、心血管系における miRNA 特異的発現による疾患モデルマウスの確立が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gitton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Levi G. (2010). Evolving maps in craniofacial development. *Semin Cell Dev Biol.* 21:301-8.
2. Heude E, Bouhalia K, Kurihara H, Kurihara Y, Couly G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (in press)

2. 学会発表

1. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium」 日本発生生物学会第 42 回大会 2009 年 5 月 28・30 日 新潟市・朱鷺メッセ
2. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 櫛山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「Functional analysis of subtype-specific domains of endothelin receptor type A in craniofacial development」 第 42 回日本発生生物学会大会 2009 年 5 月 31 日 新潟市・朱鷺メッセ
3. 有馬 聡, 西山 功一, 候 聡志, 小関 宏明, 内島 泰信, 栗原 由紀子, 栗原 裕基 「Modular analysis of angiogenic cell movement by real-time live imaging」 第 17 回日本血管生物医学学会大会 2009, 10/8-9 東京, 東京大

学

4. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara. 「Id1-mediated dynamic regulation of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第 17 回日本血管生物医学学会大会, 2009, 10/8-9, 東京, 東京大学
5. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 may control the specification and the timing of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第 82 回日本生化学会大会 2009, 10/21-24 神戸, 神戸ポートアイランド
6. 礪波 一夫, 栗原 由紀子, 内島 泰信, 浅野 知一郎, 栗原 裕基 「活性中心欠失型カルバインによる新しい細胞骨格制御機構の同定」 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸・神戸ポートアイランド
7. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 櫛山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「顎顔面の形態形成におけるエンドセリン受容体の in vivo ドメイン機能解析」 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸市・神戸ポートアイランド
8. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 regulates angiogenesis by determining the specification and the timing of Notch signaling」 American Heart Association, scientific session 2009, 11/8-12 Orland, USA
9. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 相賀 裕美子, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the first heart field contributing to chamber myocardium」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜市・パシフィコ横浜

10. 内島 泰信, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 藤澤 興, 櫛山 櫻, 栗原 裕基 「Role of non-coding RNA Evf2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway regulation jaw morphogenesis」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜市・パシフィコ横浜
11. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 櫛山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「In vivo analysis of subtype-specific domain functions of endothelin receptors in craniofacial development」 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 10 日 横浜市・パシフィコ横浜
12. 礪波 一夫, 栗原 由紀子, 内島 泰信, 浅野 知一郎, 栗原 裕基 「活性中心欠失型カルパインによる低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性制御機構の同定」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜市・パシフィコ横浜
13. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「Complex and Heterogeneous cell behaviour during angiogenesis revealed by real-time live imaging」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂
14. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, Hiroki Kurihara 「Id1 may regulate angiogenesis by dynamically controlling Notch signaling in vascular endothelial cells」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

エンドセリン A 受容体遺伝子を発現する心血管細胞の動態に関する研究

研究分担者 西山 功一 東京大学大学院医学系研究科助教

研究要旨

本研究において、ETAR 発現細胞の動態解析を行った。ETAR 発現心筋細胞が発生初期に心流入路の限局した領域に発生し、その後左心室と両心房に寄与すること、刺激伝導系の形成とも関連する可能性があることが明らかになり、本研究計画の重要な基盤となるとともに、心臓発生のメカニズムを理解する上でも重要な知見となった。さらに、ETAR は神経堤細胞、血管平滑筋細胞に発現していることが明らかになった。発現動態に関するこれらの知見は、ETAR 遺伝子座へのノックインによる疾患モデルマウスの確立と解析を行う上で不可欠の情報であるとともに、病態形成における細胞系譜の役割を解析する重要なツールになる。

A. 研究目的

本研究は、我々がこれまで行ってきたエンドセリン A 受容体遺伝子座 (ETAR) を標的とするリコンビナーゼ依存性カセット交換法 (Recombinase-mediated cassette exchange; RMCE) を用いたマウス遺伝学的研究を基盤として、心および平滑筋細胞における ETAR 発現動態を解析し、ETAR 発現細胞の発生学的役割を明らかにするとともに、病態モデルマウス作成に基盤となる情報を提供することを目標とする。

B. 研究方法

(1) 遺伝子改変マウスの作成: ETAR 遺伝子座に変異型 lox 配列を組み込んだ、RMCE によるノックイン可能な ES 細胞に対し、EGFP 遺伝子カセットを変異型 lox 配列で挟んだノックインベクターを Cre-アデノウイルスとともに導入し、ノックイン ES 変異体を得た。これより作成したキメラマウスから、生殖細胞系列移行を示したものを選択した。ETAR-EGFP ノックインマウスとして、既報の ETAR-lacZ ノックインマウスとともに、以下の解析に用いた。

(2) 遺伝子改変マウス表現型の解析: ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスについて、以下の方法で ETAR 発現細胞の動態を、心血管系を中心に解析した。

- i) β -ガラクトシダーゼ染色による lacZ 発現細胞の可視化
- ii) EGFP 蛍光シグナルの生体観察による発現細胞の動態解析
- iii) 心筋、平滑筋マーカーに対する in situ ハイブリダイゼーション、免疫染色
- iv) 蛍光色素標識による細胞の生体追跡
- v) EGFP 発現細胞の移植による細胞動態の解析

C. 研究結果

ETAR 遺伝子座にノックインした場合の発現標的細胞の同定とその動態を把握しておくことは、モデルマウスの病態解析などにおいて不可欠の基盤となる。そのため、ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスにおけるマーカー遺伝子の発現解析を行い、本研究の標的細胞である ETAR 発現心筋細胞が発生初期に心流入路の限局した領域に発生し、その後左心室と両心房に寄与すること、刺激伝導系の形成とも関連する可能性があること、ETAR のリガンドである endothelin-1 はこの細胞における増殖活性や Tbx5 の発現に影響を与えることなどが明らかになった。また、ETAR は発生初期より神経堤細胞とともに、血管平滑筋において広く発現が分布することなどが示された。

D. 考察

ETAR 発現細胞が、心臓発生初期に流入路に出現する領域性をもった細胞群であり、特徴的な分布様式によって左室や左右心房に寄与することが明らかになった。現在、本プロジェクトにおいて ETAR-CreERT2 ノックインマウスが作られており、これによって各発生段階の ETAR 発現細胞が同じ細胞系譜上にあるのか否かなど、系譜解析がより進むことが期待できる。

本研究による知見は、心血管傷害モデルなどの解析において、病態モデルとなる表現型をノックイン遺伝子発現細胞の機能と動態から理解する上でも重要な情報を提供する。

E. 結論

ETAR-lacZ/EGFP ノックインマウスによるノックイン標的細胞の動態解析は、新しい細胞群の発生学的役割を示唆するとともに、ETAR 遺伝子座へのノック

インによる心血管系疾患モデルの確立と解析に有用な情報になると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S, Kato M. (2010). Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood* 115:4138-47

2. 学会発表

1. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Hiroki Kurihara 「Blood vessel formation as a stage of coordinated morphogenesis- Analysis using in vitro real-time imaging」 日本数理生物学会第20回年会 2009, 9/10-11 東京, 東京大学
2. 西山 功一, 有馬 聡, 栗原 裕基 「in vitro ライブイメージングによる血管新生機構の解明」 第17回日本血管生物医学会大会 2009, 10/8-9 東京, 東京大学
3. 有馬 聡, 西山 功一, 候 聡志, 小関 宏明, 内島 泰信, 栗原 由紀子, 栗原 裕基 「Modular analysis of angiogenic cell movement by real-time live imaging」 第17回日本血管生物医学会大会 2009, 10/8-9 東京, 東京大学
4. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara. 「Id1-mediated dynamic regulation of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第17回日本血管生物医学会大会, 2009, 10/8-9, 東京, 東京大学
5. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 may control the specification and the timing of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第82回日本生化学会大会 2009, 10/21-24 神戸, 神戸ポートアイランド
6. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki

Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 regulates angiogenesis by determining the specification and the timing of Notch signaling」 American Heart Association, scientific session 2009, 11/8-12 Orland, USA

7. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「Complex and Heterogeneous cell behaviour during angiogenesis revealed by real-time live imaging」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂
8. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, Hiroki Kurihara 「Id1 may regulate angiogenesis by dynamically controlling Notch signaling in vascular endothelial cells」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

心血管系の細胞系譜に関する研究

研究分担者 富田 幸子 東京女子医科大学医学部助教

研究要旨

心血管系の病態理解において、先天性心疾患だけでなく、成人以降に発症する疾患においても、その発症原因となる細胞の発生学的系譜や発生過程での異常の観点から理解することの重要性が指摘され始めている。私の研究グループでは、ニワトリ初期胚の神経堤細胞の切除実験を実施したところ冠血管平滑筋の異常を形成することができた。この結果は、最近論争的になっている冠血管の起源について、神経堤細胞が関与することを裏付けた。一方、ニワトリ胚における領域特異的な蛍光色素標識や血管鋳型作成技術をマウスに応用することによって、心血管系の病態解析の基盤が充実した。これらの実験系は、心血管系の疾患モデルマウスの表現型解析に有用なアプローチ法と視点を提供すると考えられる。

A. 研究目的

循環器疾患の発生学的理解は、これまで先天性心疾患に限られていたが、最近では成人以降に発症する疾患においても、その発症原因となる細胞の発生学的系譜や発生過程での異常の観点から理解することの重要性が指摘され始めている。本研究では、鳥類胚における冠動脈の起源に関する研究を通して、マウス発生工学を中心とする本プロジェクトに新しいアプローチ法と視点を提供することを試みた。

B. 研究方法

(1) ニワトリ初期胚操作：ニワトリ初期胚の神経堤細胞の切除実験を実施し、冠血管の形態の異常を解析した（下記）。

(2) 血管鋳型の作成：血管系、特に冠動脈の形態解析として、合成樹脂を大動脈近位部から冠動脈入口部に注入し、血管鋳型を作成した。これらの技術を、マウス胚にも適用した。

(3) 心臓細胞の蛍光標識解析：ニワトリ・ウズラ移植キメラ胚とともに、マウス胚などを用いて、神経堤細胞をはじめとする心臓発生領域に蛍光色素を微小注入し、発生過程における細胞動態を可視化した。

C. 研究結果

1. 冠血管平滑筋の由来

冠血管平滑筋の由来は、これまで心外膜前駆組織といわれてきたが、最近になってマウスの研究から神経堤細胞が平滑筋の一部を形成することもわかってきた。本年度の研究で、ニワトリ初期胚の神経堤細胞の切除実験を実施したところ冠血管平滑筋の異常を形成することができた。

2. 心血管系の発生と病態における細胞系譜解析法

の確立

鳥類において、神経堤細胞をはじめとする領域特異的な蛍光色素標識や、合成樹脂などの血管内注入による鋳型作成によって、心血管系の発生過程の解析法を改良するとともに、マウスに応用することによって、正常胚と遺伝子変異による異常胚の心血管系の解剖学的解析がより精密に行えるようになった。これにより、発生初期に心流入路に出現する ETAR 発現細胞が左側壁を上行して左室と両心房に寄与する新たな細胞群である可能性を支持する結果を得た。マウス血管鋳型作成は、研究代表者のグループが作成したマウス解析に応用し始めている。

D. 考察

冠血管の起源については、これまで心外膜前駆組織といわれてきたが、神経堤細胞の関与については一定の見解がない。本研究による結果は、冠血管の一部に、神経堤細胞が関与することを裏付けた。この結果は、神経堤細胞を含む ETAR 発現細胞を標的とする心血管傷害モデルの作成と病態解析を1つの柱とする本プロジェクトにも有用なアプローチ法と視点を提供すると考えられる。次年度には、この平滑筋異常の詳細な検討をするとともに、心臓神経堤移植ウズラ-ニワトリキメラ胚と神経堤細胞マーカーである P0-cre マウスを利用し、心臓神経堤細胞の詳細なマッピングを作製する予定である。また、鳥類胚で改良された技術のマウスへの応用は、大きさの問題などで困難さは伴うものの、細胞系譜や病態形成に関わる発生基盤の理解に重要なアプローチ法を提供すると考えられる。

E. 結論

冠血管の起源に関する新しい知見と心血管系の発生学的解析法は、心血管系における miRNA 特異的発現による疾患モデルの確立と解析に有用と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 宮川-富田幸子, 今中-吉田恭子 (2009). 冠血管の発生. *細胞* 14 (13) :6-9.
2. Watanabe U, Miyagawa-Tomita S, Vincent SD, Kelly RG, Moon AM, Buckingham ME. (2010). Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. *Circ Res* 106:495-503.
3. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. TGF- β 3 and MMP3 contribute to the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in canines. *Am J Vet Res* (in press)

2. 学会発表

1. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium」 日本発生生物学会第42回大会 2009年5月28・30日 新潟市・朱鷺メッセ
2. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 相賀 裕美子, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the first heart field contributing to chamber myocardium」 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜市・パシフィコ横浜
3. 今中恭子, 原万里, 浪方美幸, ポンセ デ レオン バルディビリア サラ イサベル, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子. 「テネascin Cによる心臓血管新生の制御. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性心筋症に関する調査研究<北風班>」2008年度第2回総会・研究報告会. 2009年3月3日 大阪・国立循環器病センター図書館講堂

4. 大林浩二, 宮川-富田幸子, 松本浩毅, 小山秀一, 廣瀬 昶. 「僧帽弁閉鎖不全症発症における TGF β の役割.」2009, 4月2-4日 第147回日本獣医学会, 宇都宮・総合文化センター
5. MIYAGAWA-TOMITA S, SUGIMURA H, TOMIMATSU H, YOSHIDA T, NAKANISHI T, IMANAKA-YOSHIDA K 「Tenascin-C expression and neural crest are associated with formation of the coronary orifice. 」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 132, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
6. OBAYASHI K, MIYAGAWA-TOMITA S, MATSUMOTO H, KOYAMA H, NAKANISHI T, HIROSE H 「TGF- β 3 and MMP3 contribute to pathogenesis of myxomatous mitral valve in canine. 」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 148, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
7. ASAI R, KURIHARA Y, SATO T, KAWAMURA Y, KOKUBO H, TONAMI K, UCHIJIMA Y, SAGA Y, MIYAGAWA-TOMITA S, KURIHARA H 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium. 」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 9, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
8. VINCENT SD, MIYAGAWA-TOMITA S, BUCKINGHAM M. 「 The transcriptional repressor *prdm1/blimp1* is required within the second heart field for the morphogenesis of the distal outflow tract. 」 Weinstein Cardiovascular Developmental Conference 210, 2009, 5/7-9 San Francisco, CA, USA
9. 大林浩二, 宮川-富田幸子, 松本浩毅, 小山秀一, 廣瀬 昶. 「僧帽弁閉鎖不全症発症における TGF β 3 および MMP3 の役割.」 第22回日本臨床獣医学会 2009年6月27-28日 埼玉
10. 大林浩二, 宮川-富田幸子, 富松宏文, 中西敏雄. 「僧帽弁粘液腫様変性における TGF β の役割.」 第45回日本小児循環器学会 2009年7月15-17日神戸・神戸国際会議場

11. 渡辺祐介, 宮川-富田幸子, Robert Kelly, Anne Moon, Margaret Buckingham. 「心臓円錐動脈幹と鯉弓動脈の発生における中胚葉性 fgf8 と fgf10 の機能解析.」第 8 回心臓血管発生研究会, 2009 年 7 月 24-25 日 福島・磐梯熱海温泉
12. 今中-吉田恭子, 原 万里, 浪方美幸, レオンバルディビニア サラ イサベル, 堰本晃代, 吉田利通, 宮川-富田幸子「テネイシン C による心臓血管新生の制御.」第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference, 2009 年 9 月 4-6 日 北海道・小樽
13. Ando K, Yamagishi T, Miyawata-Tomita S, Imanaka-Toshida K, Yoshida T, Nakajima Y. 「Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development.」49th Ann Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, 12/5-9 San Diego, CA, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mitani, A., Nagase, T., Fukuchi, K., Aburatani, H., Makita, R., Kurihara, H.	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice.	Am J Respir Crit Care Med.	180	326-38	2009
Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H. and Sasaki, H.	The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass.	Dev. Cell	16	398-410	2009
Ogonuki, N., Inoue, K., Hirose, M., Miura, I., Mochida, K., Sato, T., Mise, N., Mekada, K., Yoshiki, A., Abe, K., Kurihara, H., Wakana, S. and Ogura, A.	A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells.	PLoS ONE	4	e4943	2009
Harada, N., Narimatsu, N., Kurihara, H., Nakagata, N., Okajima, K.	Stimulation of sensory neurons improves cognitive function by promoting the hippocampal production of insulin-like growth factor-I in mice.	Transl Res.	154	90-102	2009
Narimatsu N, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Sobue K, Okajima K.	Donepezil improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	330	2-12	2009

宮川-富田幸子, 今中-吉田 恭子	冠血管の発生	細胞	14 (1 3)	6-9	2009
Gitton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Levi G.	Evolving maps in craniofacial development.	Semin Cell Dev Biol.	21	301-308	2010
Zhao J, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K.	Cilostazol improved cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus.	Neurop harmac ology	58	774-83	2010
Cui X, Kushiyama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, Shiomi M, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T.	Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy.	Diabet es Res Clin Pract.	87	57-63	2010
Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S, Kato M.	Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis.	Blood	115	4138-47	2010
Harada N, Zhao J, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K.	Effects of topical application of alpha-D-glucosylglycerol on dermal levels of insulin-like growth factor-i in mice and on facial skin elasticity in humans.	Biosci Biotec hnol Bioche m.	74	759-65	2010
Watanabe U, Miyagawa-Tomita S, Vincent SD, Kelly RG, Moon AM, Buckingham ME.	Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries.	Circ Res	106	495-503	2010

Vieux-Rochas M, Mantero S, Heude E, Barbieri O, Astigiano S, Couly G, Kurihara H, Levi G, Merlo GR.	Spatio-temporal dynamics of gene expression of the Edn1-Dlx5/6 pathway during development of the lower jaw.	Genesis.		(in press)	2010
Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H.	TGF- β 3 and MMP3 contribute to the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in canines.	Am J Vet Res		(in press)	2010
Heude E, Bouhalia K, Kurihara H, Kurihara Y, Couly G, Janvier P, Levi G.	Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells.	Proc Natl Acad Sci USA.		(in press)	2010