

201008010A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成 23(2011)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成23（2011）年5月

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 ----- 11
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 ----- 17
西山功一

3. 心血管系の細胞系譜に関する研究 ----- 22
富田幸子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 28

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。本研究において我々は、エンドセリン A 受容体 (ETAR) 遺伝子座を標的とするリコンビナーゼ依存性カセット交換 (RMCE) を用いたマウス遺伝学的研究を基盤として、心筋細胞および血管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。本年度は以下の成果を得た。(i) RMCE により、miR199a + miR214 ノックインマウスを作成した。(ii) 心筋で Cre を発現する Isl1-Cre マウスと Cre 誘導型ジフテリア毒素受容体発現マウス (iDTR) を交配し、ジフテリア毒素 (DT) 投与により重篤な心筋傷害が誘導されることを確認した。(iii) 本研究の標的細胞である ETAR 発現心筋細胞が、心形成過程で流入路から上行して心室筋や心房筋に分化する特徴的な細胞系譜を示すこと、ET シグナルによる ERK 活性化を介して初期の心臓形成に寄与することを明らかにした。(iv) ETAR-EGFP ノックインマウス胚からの初期心筋細胞を、心臓線維芽細胞をフィーダーとして培養することにより、ETAR-EGFP 発現細胞の分化方向性を評価する系を確立した。これにより、複数種の心筋細胞への分化能をもつ可能性が示唆された。(v) ニワトリ-ウズラキメラ胚を用いた細胞系譜の解析と領域特異的な蛍光色素標識解析によって、ETAR を発現する心臓神経堤細胞の分布や冠血管系への寄与を明らかにした。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、さまざまな生理機能や病態形成の担い手として、non-coding RNA の役割が明らかになってきた。中でも、Drosha, Dicer による切断で生ずる miRNA は、核酸医薬の標的としても臨床的意義が注目されている。心疾患においても、心肥大や線維化に関わる miRNA が報告されはじめ (van Rooij et al. PNAS 103:18255, 2006)、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。

我々はこれまで、エンドセリン (ET) シグナルの生理的意義とその機序を明らかにするため、RMCE という新しい遺伝学的方法を用いて、マウス ES 細胞において 80%以上の効率で ETAR 遺伝子座にノックイン可能なシステムを確立してき

た (Sato et al. Development 135:755, 2008; Sato et al. PNAS 105:18806, 2008)。これにより、ETAR 陽性の心筋細胞や血管平滑筋細胞に系統的に遺伝子を発現させることが可能となった。さらに、東大医科研・中岡隆志博士との共同研究により、2つの miRNA (miR199a, miR214) を含む ncRNA (Dnm3os) をノックアウトし、成長障害や骨異常を見いだすとともに (Watanabe et al. Dev Dyn 237:3738, 2008)、miR199a, miR214 を含む遺伝子断片のノックインにより、これらの生体内発現と機能的レスキューを実現した。

これらの成果に基づき、本研究では RMCE を用いたマウス ES 細胞の ETAR 遺伝子座へのノックインによって、心筋・血管平滑筋などに細胞傷害を誘導できるマウスを作成するとともに、このマウスで発現に変化のある miRNA を抽出し、その鋳型となる cDNA を同様に ETAR 座にノックインする。ES 細胞からの分化誘導系での解析後、作用の認められた ES 細胞をマウス個体として心

血管系の表現型を解析する。同時に、組織特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス (iDTR) により心血管傷害モデルマウスを作成してノックイン遺伝子の機能を解析する実験系を確立する。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。

現在、miRNA を中心とする核酸試薬の開発は、新しい創薬の流れとして注目されている。本研究により、心筋梗塞をはじめとする心血管疾患に関与する miRNA とその標的分子を明らかにするとともに、miRNA およびその拮抗型 RNA の治療薬としての意義についてマウス個体により検証できるシステムを確立することが期待できる。本研究で用いている RMCE 法による遺伝子ノックインは他の遺伝子にも応用可能であり、その有用性を示すことによって、心血管疾患のみならず多くの疾患に対する創薬開発に貢献することが期待できる。さらには、ES 細胞における遺伝子ノックインと *in vitro* での分化誘導実験を通して、対象とする miRNA の再生医学における応用への可能性にも発展することができる。本研究で遺伝子ノックインの標的となる ETAR はこれまで多くの心血管疾患における役割が研究され、その拮抗薬は現在肺高血圧症の治療に用いられているほか、抗腫瘍薬としても最近注目されている。miRNA を中心とする本研究提案も、ET システムに関するこれまでの基礎・臨床研究を背景として、これらの疾患における ET シグナルと miRNA のクロストークという観点からも、病態の理解や治療薬効果判定にも新しい切り口を提供することが期待できる。

B. 研究方法

1. 遺伝子改変マウス

(1) ETAR 遺伝子座ノックインマウス

ETAR-lacZ, ETAR-EGFP マウスは、既報の通りリコンビナーゼ依存性カセット交換 (RMCE) を用いて作成した。即ち、ETAR 遺伝子第 2 エクソンに変異型 lox 配列 (lox71, lox2272) で挟んだ neomycin 耐性遺伝子を導入した ES 細胞に対し、上記変異型 lox に対応する配列 (lox66, lox2272) で挟んだ lacZ, EGFP 遺伝子断片それぞれを含むプラスミドを電気穿孔法で導入して Cre リコンビナーゼ遺伝子を含むアデノウイルスベクター (AxCANCre) を感染させて lox 配列に相同組み換えを起こさせ、導入遺伝子を ETAR 遺伝子座にノックインした ES 細胞株を得た。これらよりキメラマウスを作成し、生殖細胞系列

に寄与したキメラマウスよりノックインマウスを得た。同様の方法により、2 つの miRNA (miR199a, miR214) の前駆体である Dnm3os cDNA を改変した DNA 断片を ETAR 遺伝子座に導入し、両 miRNA のノックインマウスを作成した。miR199a, miR214 を含む遺伝子断片が両 miRNA の前駆体として機能することは、既報の Dnm3os ノックアウトマウスにおいて、同様の方法によるノックインにより表現型がレスキューされたことから確かめられた。

(2) Isl1-Cre; iDTR マウス

Isl1-Cre マウス、iDTR マウスはそれぞれ Sylvia Evans 博士 (UCSD, 米国)、Ari Waisman 博士 (Johannes Gutenberg University of Mainz, ドイツ) より供与された。両マウスの交配により、Isl1-Cre; iDTR マウスを作成した。

(3) マウスの飼育と実験

マウスは温度 $23 \pm 2^{\circ} \text{C}$ 、湿度 50-60%、12 時間毎の明暗サイクル下に飼育し、実験に供した。実験は東京大学動物実験規則に則り、東京大学医学系研究科動物実験委員会により承認された実験計画のもとで行われた。

2. 心傷害モデルの作成

使用したマウスは 4 ヶ月齢の Isl1Cre/+; iDTR +/- マウス 2 匹 (心筋障害モデル群) と、Isl1+/-; iDTR +/- マウス 2 匹 (コントロール群)。ジフテリア毒素 $1 \mu\text{g}$ を 24 時間間隔で連続 2 日間投与した。投与後は毎日観察を行い、死亡した時点 (コントロール群は 4 日目に頸椎脱臼による安楽死で) で心臓を採取・固定し、凍結切片による形態評価を行った。

3. β -ガラクトシダーゼ染色による lacZ 発現細胞の可視化

β -ガラクトシダーゼの活性は、全胚固定標本または凍結切片標本において、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl β -D-galactosidase) を基質とした発色反応により検出した。

4. *in situ* ハイブリダイゼーション

全胚固定標本または凍結切片標本において、digoxigenin で標識した RNA プローブを用いて通常の方法で行った。

5. 免疫染色

凍結切片標本において、一次抗体反応後にペルオキシダーゼ、FITC、ビオチンで標識した二次抗体を反応させ、蛍光または発色反応によって

可視化した。

6. 蛍光色素標識による細胞の生体追跡

マウス胎生 8.25 日胚の心流入路領域に対して、蛍光色素 PKH67 (緑) または PKH26 (赤) をマイクロインジェクションした。その後、DMEM/F2 + 50% ラット血清存在下で回転培養を 30 時間行い、蛍光実体顕微鏡 (Leica MZFLIII stereomicroscope + Hamamatsu digital camera C4742-95) で観察した。

7. EGFP 発現細胞の移植による細胞動態の解析

マウス胎生 8.25 日胚の心流入路 EGFP 発現領域より組織片を切り出し、一部の実験では蛍光色素 SYTO16 で細胞をラベルした後、同じ発生段階のマウス胚の流入路領域に移植した。対照群として、心流出路、心筒領域、尾部の組織を移植片に用いた。移植を受けた胚は、 α -MEM + 10% ウマ血清存在下で低酸素状態 (5% CO₂, 95% N₂) で 24 時間培養し、6 と同様に観察した。

8. 心筋細胞の初代培養

マウス胎生 8.25 日胚の心流入路 EGFP 発現領域より組織片を切り出し、トリプシン処理により細胞を単離した後、マウス胎仔心臓より調整した心臓線維芽細胞をフィーダーとして培養した。

9. ニワトリ-ウズラ胚の作成

Hamburger-Hamilton のステージ 8 前後で、鶏胚の心臓神経堤領域を切除し、同時期のウズラ胚の心臓神経堤組織片を移植した。その後、胚発生を進行させ、心臓形成が進んだ後に組織染色でウズラ由来の細胞の分布を調べた。

10. 心臓細胞の蛍光標識解析

鶏胚を用いて、神経堤細胞をはじめとする心臓形成の起源と考えられる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、6 と同様に観察した。

C. 研究結果

1. 遺伝子ノックインマウスの作成

リコンビナーゼ依存性カセット交換 (RMCE) により、2 つの miRNA (miR199a, miR214) の前駆体である Dnm3os cDNA を改変した DNA 断片を ETAR 遺伝子座に導入した ES 細胞株を昨年度に得たが、これより作成されたキメラマウスより生殖細胞系列に ES 細胞の寄与が見られた系統を

選択し、miR199a+miR214 ノックインマウス系統を樹立した。ノックインマウスはヘテロ接合体の状態が発育、形態、生殖能力などは正常であり (ホモ接合体は ETAR 欠損により胎生致死)、心血管系にも明らかな異常は認められなかった。一方、当研究室において以前に作成した Dnm3os 遺伝子欠損マウスは成長障害、骨形成不全 (頸椎の融合不全など) を示すが (Watanabe et al. Dev Dyn 237:3738, 2008)、このマウスにおいて、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、miR199a, miR214 の 2 つの miRNA が実際に生成されてい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。今後、miR199a+miR214 ノックインマウスにおいて、後述の心筋傷害モデル作成などを試み、miR199a, miR214 の病態生理的役割を解析する予定である。

2. 心筋傷害モデルの作成

Isl1-Cre マウス、iDTR マウスの交配により、Isl1-Cre; iDTR マウスを作成した。Isl1-Cre マウスは Cre レポーターマウス (R26R-lacZ) との交配により、既報の通り Cre 依存性の lacZ 発現が右心室、両心房、大血管の一部に認められることを確認した。即ち、Isl1-Cre; iDTR マウスでは同領域に iDTR が発現すると考えられた。そこで、Isl1Cre/+; iDTR +/- マウス 2 匹 (心筋障害モデル群) と、Isl1+/-; iDTR +/- マウス 2 匹 (コントロール群) に対し、ジフテリア毒素投与によって右心室、両心房、大血管の一部に傷害が誘導されるか否かを検討した。その結果、ジフテリア毒素 1 μ g を 24 時間間隔で連続 2 日間投与した後、4 日以内に心筋障害モデル群は死亡した。肉眼所見では、心臓の著明な拡大を認め、組織学的には特に右室腔の拡大、心筋層の広範な破壊と出血、細胞浸潤が認められた。現在、同じマウス系統を用いて、至適条件の検討を行うとともに、他の Cre マウスを用いたモデル作成を検討し始めている。

3. 心臓における ETAR 発現細胞の同定とその動態

ETAR 遺伝子座に lacZ または EGFP 遺伝子座をノックインしたマウス (ETAR-lacZ/EGFP マウス) を用いて、本研究の標的細胞である ETAR 発現心筋細胞の分布と動態を解析した。ETAR-lacZ/EGFP 発現細胞は、マウス E8.0 日胚の心臓原基腹側において最初に認められ、原始心筒形成期には心臓流入路の腹側に局在してい

た。その発現は、in situ ハイブリダイゼーションによる ETAR 遺伝子の発現パターンとほぼ一致しており、内在性 ETAR の発現を反映すると考えられた。この初期の発現は、一次心臓予定領域マーカーである Nkx2.5・Mlc2a の発現領域の一部と一致していたが、二次心臓予定領域マーカーである Is11 とは重ならず、ETAR-lacZ/EGFP 発現細胞は一次心臓予定領域に含まれる細胞集団であると考えられた。心ループ形成期には、ETAR-lacZ/EGFP 発現細胞は左側壁から左心室領域にかけて大彎に沿って分布し、四腔形成期にはその発現は左心室と両心房、さらに右心室の一部に広がった。

マーカー遺伝子発現の経時的解析から、心臓形成初期における ETAR-lacZ/EGFP 発現細胞は、流入路に生じて原始心筒～心ループ形成期に上方へ移動する細胞群と考えられた。また、免疫染色の結果から、ETAR-lacZ/EGFP 発現細胞は心室や心房の作業心筋に分化していくことが示された。細胞移動を証明するため、(i) 蛍光色素標識による細胞追跡、(ii) EGFP 発現細胞移植による動態解析を行った。その結果、E8.25 日の心流入路 ETAR-lacZ/EGFP 発現領域に蛍光標識した場合に、30 時間後の観察で ETAR-lacZ/EGFP 発現パターン同様の分布パターンが認められること、同領域の移植によって EGFP 発現細胞の左心室への分布が認められるのに対し、心流出路、心筒領域、尾部の組織を移植片に用いた対照群では同様の分布が認められなかったことから、細胞の上方への移動が特徴的な分布パターンを形成していることが証明された。

一方、ETAR 欠損胚の一部では心室の低形成、心筋における増殖活性および転写因子 Tbx5 の発現低下が見られ、初期の心臓形成の過程で ETAR シグナルは ERK のリン酸化と左心室マーカー Tbx5 の発現を促進していること、Tbx5 の発現は MEK 阻害薬によって抑制されることが示唆された。Tbx5 は Holt-Oram 症候群の原因遺伝子であり、心臓形成において重要な転写因子である。これらの結果から、ETAR シグナルは ERK のリン酸化を介して、心筋細胞増殖や Tbx5 による心室形成に寄与していることが示唆された。

4. ETAR 発現細胞の培養と心筋分化

ETAR 発現細胞の分化方向とその制御因子について解析するため、マウス胎仔心臓線維芽細胞をフィーダーとして、ETAR-EGFP マウス胚より得た原始心筒形成期の心臓流入路に由来する細胞の培養を試みた。細胞はトリプシン処理の後、単一細胞密度になるようにフィーダー上に播き、

コロニー形成を観察した。その結果、EGFP 陽性コロニーが生じ、その中には心筋特異的マーカー陽性の細胞の他、刺激伝導系を構成すると考えられる細胞が混在するものがあり、ETAR 発現領域には複数の方向に分化する細胞が含まれている可能性が考えられた。

5. ニワトリ胚による細胞系譜と動態の解析

ニワトリ-ウズラキメラ胚を用いた細胞系譜の解析と領域特異的な蛍光色素標識解析によって、ETAR を発現する心臓神経堤細胞の分布を確認した。これにより神経堤細胞が大動脈起始部の中隔をはじめとする領域に寄与が認められるとともに、冠血管系にも寄与している結果が得られた。冠血管に対する神経堤細胞の寄与については研究グループにより異なる結果が報告されており、現在詳細を解析中である。これらの結果により、ETAR 発現細胞を標的とする遺伝子機能解析の解剖学的基盤が明確になるとともに、キメラ組織片に対する遺伝子導入による機能解析の準備が整えられた。

D. 考察

1. miRNA ノックインマウス

本年度の研究により、新たに ETAR-(miR199a+miR214) ノックインマウスが作成された。このマウスは発育や形態などは正常と差が認められず、生殖能力も正常に保たれている。一方、Dnm3os 遺伝子欠損マウスに対する 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、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、心肥大や虚血後の腎障害モデルにおいて増加することがこれまで明らかになっており、この上昇が病態に対して促進的に働くのか、防御的に働くのか、ETAR-(miR199a+miR214) ノックインマウスに対する病態形成の評価により検討を行う予定である。

問題点としては、ETAR 遺伝子座へのノックインによる発現レベルが、miR199a と miR214 の機能的効果発現に十分か否か、心臓血管以外の ETAR 発現細胞における miR199a+miR214 過剰発現による表現型が心臓血管系における病態評価に影響を与えるか否か、の2点が考えられる。現在、ノックインマウスにおける両 miRNA の基礎レベルにおける発現量を評価する予定であり、

病態形成中の変化とともに、発現量が心肥大などによる変動に比べてどの程度かを見ながら病態の解析を行う必要がある。同時に、より強力なプロモーター下での発現系も今後必要と考えられ、ROSA26 遺伝子座へのノックインにより Cre 依存性に高発現するマウスの作成を検討している。心臓血管以外の ETAR 発現細胞における発現の問題に対しても、このマウスの作成はその解決につながると考えられる。

2. 心筋傷害モデル

心筋傷害モデルの作成については *Isl1-Cre; iDTR* マウスにおいて、予備実験の段階ながらも明らかな傷害が形成され、実験系としては基盤が整えられたと考えられる。このマウスでは、二次心臓領域に由来する細胞に DTR が発現するため、陽性領域である右室や両心房と陰性（一部を除き）領域である左室とを比較することで、それぞれの組織の特徴が大きく異なるものの、同じ生体条件下で組織傷害の評価が行いやすいのではないかと期待される。現在、ジフテリア毒素の投与量やタイミングなど、至適条件の検討を行うとともに、これまで作成されたマウスとの交配を進めている。

3. ETAR 発現細胞

心臓における ETAR 発現細胞は、主に心流出路～大血管起始部に寄与する心臓神経堤細胞と、心室心房領域の作業心筋の 2 つに大別されるが、本研究では後者に関し、心臓形成の初期からその起源となる領域と動態を *lacZ/EGFP* ノックインマウスを用いて明らかにした。*ETAR-lacZ/EGFP* 発現細胞は一次心臓予定領域の一部として心流入路の限局した領域に形成され、心ループ形成期には、左側壁から左心室領域にかけて大彎に沿って分布するという特徴を示した。四腔形成期にはその発現は左心室と両心房、さらに右心室の一部に広がったが、この広範囲の発現の多くは、二次心臓領域由来の細胞などが後の段階で ETAR を発現するようになったと考えられる。大彎に沿った特徴的分布パターンと細胞移動はこれまで報告されていないものであるが、流入路における細胞の出現と上行する細胞移動の方向は、発生初期の刺激伝導系の形成と興奮伝播様式と一致しており、刺激伝導路形成への寄与が考えられる。実際、ETAR の最も初期の発現パターンはペースメーカー細胞の特徴である K_1 チャネルをコードする *HCN4* 遺伝子の発現パターンとよく一致しており、現在その関連について解析を進めている。

ETAR 発現細胞の時空間的分布の変化や細胞系譜における位置づけは、心臓発生研究における重要性に加え、本研究の中心である miRNA の発現による機能解析を行う上で、重要な情報を提供すると考えられる。

4. ETAR 発現細胞の系譜と分化

In vitro の培養系としては、ETAR-EGFP ノックインマウス胚からの初期心筋細胞を、心臓線維芽細胞をフィーダーとして培養することにより、ETAR-EGFP 発現細胞の分化方向性を評価する系を確立した。これにより、ETAR-EGFP 発現細胞から生じたと考えられるコロニーにおいて、心筋特異的マーカー陽性の細胞の他、刺激伝導系を構成すると考えられる細胞が混在するものがあり、ETAR 発現領域には複数の方向に分化する細胞が含まれている可能性が考えられた。この結果は、先に述べた *HCN4* 遺伝子の発現パターンとの類似性の関係から、極めて興味深い。

鳥類胚を用いた解析は、既に古典的手法となっているが、マウスにおける Cre-loxP 配列による細胞系譜解析の問題点や限界が最近指摘されており、両者の方法論で補完し合うことは今後極めて重要である。冠血管の細胞起源などに関する新しい知見も生まれており、こうした細胞系譜が病態形成にどのような意義をもつか、その過程において miRNA がどのように関わっているかは、今後の発展的課題となる。

5. 今後の展望

これまでの成果を踏まえ、次年度は作成した遺伝子改変マウスの解析と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、Cre 発現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

本研究において、以下の成果を得た。(i) RMCE により、*miR199a+miR214* ノックインマウスを作成した。(ii) 心筋で Cre を発現する *Isl1-Cre* マウスと Cre 誘導型ジフテリア毒素受容体発現マウスを交配し、ジフテリア毒素投与により重

篤な心筋傷害が誘導されることを確認した。

(iii) 本研究の標的細胞である ETAR 発現心筋細胞が、心形成過程で流入路から上行して心室筋や心房筋に分化する特徴的な細胞系譜を示すこと、ET シグナルによる ERK 活性化を介して初期の心臓形成に寄与することを明らかにした。

(iv) ETAR-EGFP ノックインマウス胚からの初期心筋細胞を、心臓線維芽細胞をフィーダーとして培養することにより、ETAR-EGFP 発現細胞の分化方向性を評価する系を確立した。これにより、複数種の心筋細胞への分化能をもつ可能性が示唆された。(v) ニワトリ-ウズラキメラ胚を用いた細胞系譜の解析と領域特異的な蛍光色素標識解析によって、ETAR を発現する心臓神経堤細胞の分布や冠血管系への寄与を明らかにした。これらの成果は、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. Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney. *Gene Expr Patterns*. (in press)
2. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Zhang J, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Yoneda M, Ohno H, Horike N, Kanna M, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Isobe T, Ogihara T, Katagiri H, Oka Y, Takahashi SI, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J Biol Chem*. (in press)
3. Ohno H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Otani Y, Okubo H, Yoneda M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Kurihara H, Katagiri H, Oka Y, Asano T. (2011). 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 300, C1047-1054.
4. Tonami K, Kurihara Y, Arima S, Nishiyama K, Uchijima Y, Asano T, Sorimachi H, Kurihara H. (2011). Calpain 6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *J Cell Sci*. 124, 1214-1223.
5. Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M. (2011). Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300, H431-H439.
6. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. (2010). Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *J Clin Invest*. 120, 2817-2828.
7. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. (2010). Endothelin receptor type-A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field, with a later implication of this signaling pathway in chamber myocardium formation. *Development*. 137, 3823-3833.
8. Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, Nishiyama K, Kurihara Y, Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, Kurihara H. (2010). Establishment of mice expressing EGFP in the placode-derived inner ear sensory cell lineage and FACS-array analysis focused on the regional specificity of

- the otocyst. *J Comp Neurol.* 18, 4702-4722.
9. Heude E, Bouhali K, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires *Dlx* expression by cranial neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 11441-11446.
 10. 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.* 48, 262-273.
 11. 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, 301-308.
 12. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyaama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi SI, Kurihara H, Uchida T, Asano T. (2010) *Pin1* associates with and induces translocation of CRT2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J Biol Chem.* 285, 33018-33027.
 13. Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. *Tenascin C* may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. *Differentiation* (in press)
 14. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. (2011) Effects of transforming growth factor- β 3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *Am J Vet Res* 72:194-202.
 15. 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.
2. 学会発表
1. Yukiko Kurihara*, Yasunobu Uchijima, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiyaama, Rieko Asai, Koichi Nishoyama, Hiroki Kurihara. "Non-coding RNA regulation of endothelin signaling in branchial arch development" (口演) Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月13日 Il Ciocco Hotel & Resort (Lucca, Italy)
 2. Kou Fujisawa*, Yukiko Kurihara, Takahiro Sato, Sakura Kushiyaama, Yumiko Kawamura, Rieko Asai, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. "Subtype-specific domain functions of endothelin receptors in craniofacial development." (口演) Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月12日 Il Ciocco Hotel & Resort (Lucca, Italy)
 3. Rieko Asai*, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kokubo, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Yasunobu Uchijima, Yumiko Saga, Sachiko Miyagawa-Tomita and Hiroki Kurihara. "Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium" (口演) Weinstein 2010 cardiovascular development conference 2010年5月21日 Royal Tropical Institute (AMSTERDAM, The Netherlands)

4. 有馬勇一郎, 西山功一, 宮川-富田幸子, 淺井理恵子, 金基成, 有馬聡, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「マウスにおける冠動脈の発生とその異常」(口演) 第9回心臓血管発生研究会 2010年7月10日シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県 浦安市)
5. 淺井理恵子*, 栗原由紀子, 藤澤興, 佐藤崇裕, 河村悠美子, 小久保博樹, 礪波一夫, 西山功一, 内島泰信, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. 「エンドセリンA受容体の発現による一次心臓領域における chamber myocardium 寄与細胞系譜の同定」(口演) 第9回心臓血管発生研究会 平成22年7月10日シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県 浦安市)
6. Kou Fujisawa*, Yukiko Kurihara, Sakura Kushiyama, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Rieko Asai, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. 「胚形成を通してみるGPCRの機能解析——エンドセリン受容体のサブタイプ特異性」(口演) 第7回東京呼吸器リサーチフォーラム2010年11月6日 帝人本社(東京都 千代田区)
7. Yumiko Kawamura*, Yasunobu Uchijima, Nanao Horike, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Tomoichiro Asano, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “Sirt3, a mitochondrial sirtuin, protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest” (口演) International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells” 2010年11月23日 九州大学医学部百年講堂 (福岡県福岡市)
8. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “A novel approach toward an understanding of angiogenesis using in vitro time-lapse live imaging” (ポスター) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月1日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
9. Koichi Nishiyama*, Satoshi Arima*, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, and Hiroki Kurihara. “A newly identified phenomenon “Cell-mixing” during angiogenesis” (ポスター) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月1日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
10. Yuichiro Arima*, Koichi Nishiyama, Sachiko Miyagawa-Tomita, Satoshi Arima, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa, Hiroki Kurihara. “Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A type receptor knock out mice.” (ポスター) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月1日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
11. Koichi Nishiyama*, Satoshi Arima, Hiroki Kurihara. “Novel insight into angiogenesis: In-depth analysis through time-lapse imaging and quantification” (シンポジウム・口演) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月2日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
12. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama*, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “In-depth analysis of angiogenic morphogenesis through time-lapse imaging and quantification” (口演 および ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 2010年12月8日 神戸ポートピアホテル(兵庫県 神戸市)
13. Yukiko Kurihara*, Yasunobu Uchijima, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiyama, Rieko Asai, Koichi Nishiyama, Hiroki Kurihara. “Involvement of non-coding RNA in the

- Endothelin signaling in branchial arch development” (ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同年会 2010年12月8日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
14. Yasunobu Uchijima*, Yukiko Kurihara, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiya, Hiroki Kurihara. “Transcriptional regulation of non-coding RNA Evf-2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway” (ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同年会 2010年12月8日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
15. 礪波一夫, 栗原由紀子, 内島泰信, 浅野知一郎, 反町洋之, 栗原裕基. 「活性中心を欠失した新規カルパインによる細胞骨格・運動性制御機能の解明」(ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同年会 2010年12月8日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
16. Rieko Asai*, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kokubo, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Yasunobu Uchijima, Yumiko Saga, Sachiko Miyagawa-Tomita and Hiroki Kurihara. “Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium” (シンポジウム・口演) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同年会 平成22年12月10日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
17. Yumiko Kawamura*, Yasunobu Uchijima, Nanao Horike, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Tomoichiro Asano, Tomokazu Amano, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest” (ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同年会 2010年12月9日
- 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
18. Kou Fujisawa*, Yukiko Kurihara, Sakura Kushiya, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Rieko Asai, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. “Endothelin-1-mediated intracellular trafficking of endothelin receptor type A is regulated by the cytoplasmic C-terminus and causes the subtype-specific signaling in craniofacial development.” (ポスター) 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月9日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
19. Taro Kitazawa, Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Yumiko Kawamura, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. “Abnormal craniofacial morphogenesis induced by ectopic expression of Hox genes.” (ポスター) 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月10日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
20. Koichi Nishiyama*, Satoshi Arima, Yuichiro Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “Collective endothelial cell movements driving angiogenic morphogenesis” (口演) 第8回心血管幹細胞研究会 2011年1月15日 品川プリンスホテル (東京都 港区)
21. Rieko Asai*, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara. “Endothelin receptor type-A expression defines a distinct subdomain within the heart field and contributes to chamber myocardium” (口演・ポスター) Weinstein meeting 2011 cardiovascular development conference 2011年5月6日 Hilton Cincinnati Netherland Plaza (Cincinnati, OH, America)

22. Imanaka-Yoshida K, Ando K, Yamagishi T, Yoshida T, Nakajima Y, Miyagawa-Tomita S 「Tenascin C may regulate recruitment of mural cells during coronary arterial development.」Weinstein Cardiovascular Development Conference, 49, 2010, 5/20-22, Amsterdam, Netherland
23. 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 Development Conference, 75, 2010, 5/20-22, Amsterdam, Netherland
24. Vincent Sd, Miyagawa-Tomita S, Buckingham M. 「The transcriptional repressor prdml/blimp1 is required within the second heart field for the morphogenesis of the distal outflow tract.」 Weinstein Cardiovascular Development Conference, 114, 2010, 5/20-22, Amsterdam, Netherland
25. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Nakanishi T. 「Hesr2 disrupted mice develop aortic valve disease with advancing age.」 3rd Congress of Asia-Pacific Cardiac Society, ACHD04-04, 2010, 7/6-8, Chiba.
26. 中畠八隅、宮川-富田幸子、富松宏文、中西敏雄、小久保博樹. 「成獣 Hesr2 ノックアウトマウスの心機能解析.」第46回日本小児循環器学会、OJ16-6, s286、2010年7月7-9日 千葉

図書

1. 竹内 純、宮川-富田幸子、笹岡陽介、小柴和子。「心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子。」 pp. 1-16、Annual Review 循環器 2011、山口 徹他編集、中外医学社 (総ページ 365)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

翻訳

1. 分担翻訳. Clinical Veterinary Advisor -Dogs and Cats. Mosby (Elsevier) interzoo 発行。Etienne Cote 監修、長谷川篤彦監訳. 分担翻訳, 1851pages。2010年「クリニカルベテリナリーアドバイザー-犬と猫の診療指針-」 総監修 Etienne Cote (2007) Mosby Elsevier Inc., 監訳長谷川篤彦、2010年、interzoo, 1851pages

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

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、miR199a+miR214 ノックインマウスを作成した。さらに、心筋で Cre を発現する Isl1-Cre マウスと Cre 誘導型ジフテリア毒素受容体発現マウス (iDTR) を交配し、ジフテリア毒素 (DT) 投与により重篤な心筋傷害が誘導されることを確認した。これにより、心血管系における miRNA の機能解析と疾患モデルマウスの確立が期待される。

A. 研究目的

microRNA (miRNA) は、20 数塩基より構成され、多くは相補的な配列をもつ mRNA に結合してその発現調節に関与すると考えられている non-coding RNA の一種である。近年、miRNA はさまざまな生理機能や病態形成における役割が明らかにされ、核酸医薬の標的としても臨床的意義が注目されている。心疾患においても、心肥大や線維化に関わる miRNA が報告されはじめ (van Rooij et al. PNAS 103:18255, 2006)、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

(1) ETAR-(miR199a+miR214) ノックインマウスの作成

ETAR-(miR199a+miR214) ノックインマウスは、既報の ETAR-lacZ, ETAR-EGFP マウスと同様、リコンビナーゼ依存性カセット交換 (RMCE) を用いて作成した。即ち、ETAR 遺伝子第 2 エクソンに変異型 lox 配列 (lox71, lox2272) で挟ん

だ neomycin 耐性遺伝子を導入した ES 細胞に対し、上記変異型 lox に対応する配列 (lox66, lox2272) で挟んだ改変 Dnm3os (miR199a と miR214 の前駆体) cDNA 遺伝子断片を含むプラスミドを電気穿孔法で導入した後、Cre リコンビナーゼ遺伝子を含むアデノウィルスベクター (AxCANCRe) を感染させて lox 配列に相同組み換えを起こさせ、導入遺伝子を ETAR 遺伝子座にノックインした ES 細胞株を得た。これらよりキメラマウスを作成し、生殖細胞系列に寄与したキメラマウスよりノックインマウスを得た。miR199a, miR214 を含む遺伝子断片が両 miRNA の前駆体として機能することは、既報の Dnm3os ノックアウトマウスにおいて、同様の方法によるノックインにより表現型がレスキューされたことから確かめられた。

(2) Isl1-Cre; iDTR マウス

Isl1-Cre マウス、iDTR マウスはそれぞれ Sylvania Evans 博士 (UCSD, 米国)、Ari Waisman 博士 (Johannes Gutenberg University of Mainz, ドイツ) より供与された。両マウスの交配により、Isl1-Cre; iDTR マウスを作成した。

(3) マウスの飼育と実験

マウスは温度 23±2° C、湿度 50-60%、12 時間毎の明暗サイクル下に飼育し、実験に供した。実験は東京大学動物実験規則に則り、東京大学医学系研究科動物実験委員会により承認された実験計画のもとで行われた。

2. 心傷害モデルの作成

使用したマウスは 4 ヶ月齢の Isl1Cre/+; iDTR +/- マウス 2 匹 (心筋障害モデル群) と、Isl1+/-; iDTR +/- マウス 2 匹 (コントロール群)。

ジフテリア毒素 1 μ g を 24 時間間隔で連続 2 日間投与した。投与後は毎日観察を行い、死亡した時点(コントロール群は 4 日目に頸椎脱臼による安楽死で)で心臓を採取・固定し、凍結切片による形態評価を行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子ノックインマウスの作成

2 つの miRNA (miR199a, miR214) の前駆体である Dnm3os cDNA を改変した DNA 断片を ETAR 遺伝子座に導入した ES 細胞株から作成されたキメラマウスより、生殖細胞系列に ES 細胞の寄与が見られた系統を選択し、miR199a+miR214 ノックインマウス系統を樹立した。ノックインマウスはヘテロ接合体の状態では発育、形態、生殖能力などは正常であり(ホモ接合体は ETAR 欠損により胎生致死)、心血管系にも明らかな異常は認められなかった。一方、当研究室において以前に作成した Dnm3os 遺伝子欠損マウスは成長障害、骨形成不全(頸椎の融合不全など)を示すが(Watanabe et al. Dev Dyn 237:3738, 2008)、このマウスにおいて、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、miR199a, miR214 の 2 つの miRNA が実際に生成されてい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。今後、miR199a+miR214 ノックインマウスにおいて、後述の心筋傷害モデル作成などを試み、miR199a, miR214 の病態生理的役割を解析する予定である。

2. 心筋傷害モデルの作成

Isl1-Cre マウス、iDTR マウスの交配により、Isl1-Cre; iDTR マウスを作成した。Isl1-Cre マウスは Cre レポーターマウス(R26R-lacZ)との交配により、既報の通り Cre 依存性の lacZ 発現が右心室、両心房、大血管の一部に認められることを確認した。即ち、Isl1-Cre; iDTR マウスでは同領域に iDTR が発現すると考えられた。そこで、Isl1Cre/+; iDTR +/-マウス 2 匹(心筋障害モデル群)と、Isl1+/-; iDTR +/-マウス 2 匹(コントロール群)に対し、ジフテリア毒素投与によって右心室、両心房、大血管の一部に傷害が誘導されるか否かを検討した。その結果、ジフテリア毒素 1 μ g を 24 時間間隔で連続 2 日間投与した後、4 日以内に心筋障害モデル群は死亡した。肉眼所見では、心臓の著明な拡大を認め、組織学的には特に右室腔の拡大、心筋層の広範な破壊と出血、細胞浸潤が認められた。現在、同じマウス系統を用いて、至適条件の検討

を行うとともに、他の Cre マウスを用いたモデル作成を検討し始めている。

D. 考察

本年度の研究により、新たに ETAR-(miR199a+miR214) ノックインマウスが作成された。このマウスは発育や形態などは正常と差が認められず、生殖能力も正常に保たれている。一方、Dnm3os 遺伝子欠損マウスに対する 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、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、心肥大や虚血後の腎障害モデルにおいて増加することがこれまで明らかになっており、この上昇が病態に対して促進的に働くのか、防御的に働くのか、ETAR-(miR199a+miR214) ノックインマウスに対する病態形成の評価により検討を行う予定である。

問題点としては、ETAR 遺伝子座へのノックインによる発現レベルが、miR199a と miR214 の機能的効果発現に十分か否か、心臓血管以外の ETAR 発現細胞における miR199a+miR214 過剰発現による表現型が心臓血管系における病態評価に影響を与えるか否か、の 2 点が考えられる。現在、ノックインマウスにおける両 miRNA の基礎レベルにおける発現量を評価する予定であり、病態形成中の変化とともに、発現量が心肥大などによる変動に比べてどの程度かを見ながら病態の解析を行う必要がある。同時に、より強力なプロモーター下での発現系も今後必要と考えられ、ROSA26 遺伝子座へのノックインにより Cre 依存性に高発現するマウスの作成を検討している。心臓血管以外の ETAR 発現細胞における発現の問題に対しても、このマウスの作成はその解決につながると考えられる。

心筋傷害モデルの作成については Isl1-Cre; iDTR マウスにおいて、予備実験の段階ながらも明らかな傷害が形成され、実験系としては基盤が整えられたと考えられる。このマウスでは、二次心臓領域に由来する細胞に iDTR が発現するため、陽性領域である右室や両心房と陰性(一部を除き)領域である左室とを比較することで、それぞれの組織の特徴が大きく異なるものの、同じ生体条件下で組織傷害の評価が行いやすいのではないかと期待される。現在、ジフテリア毒素の投与量やタイミングなど、至適条件の検討を行うとともに、これまで作成されたマウス

との交配を進めている。

E. 結論

本研究において、RMCEにより、miR199a+miR214ノックインマウスを作成した。さらに、心筋でCreを発現するIsl1-CreマウスとCre誘導型ジフテリア毒素受容体発現マウスを交配し、ジフテリア毒素投与により重篤な心筋傷害が誘導されることを確認した。これらの成果は、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

16. Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. (2011). Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney. *Gene Expr Patterns*. (in press)
 17. Tonami K, Kurihara Y, Arima S, Nishiyama K, Uchijima Y, Asano T, Sorimachi H, Kurihara H. (2011). Calpain 6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *J Cell Sci*. 124, 1214-1223.
 18. Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M. (2011). Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300, H431-H439.
 19. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. (2010). Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *J Clin Invest*. 120, 2817-2828.
 20. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. (2010). Endothelin receptor type-A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field, with a later implication of this signaling pathway in chamber myocardium formation. *Development*. 137, 3823-3833.
 21. Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, Nishiyama K, Kurihara Y, Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, Kurihara H. (2010). Establishment of mice expressing EGFP in the placode-derived inner ear sensory cell lineage and FACS-array analysis focused on the regional specificity of the otocyst. *J Comp Neurol*. 18, 4702-4722.
 22. Heude E, Bouhali K, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107, 11441-11446.
 23. 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, 301-308.
- ##### 2. 学会発表
27. Yukiko Kurihara*, Yasunobu Uchijima, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiyama, Rieko Asai, Koichi Nishiyama, Hiroki Kurihara. "Non-coding RNA regulation of endothelin signaling in branchial arch development" (口演) Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月13日 Il Ciocco Hotel & Resort (Lucca, Italy)
 28. Kou Fujisawa*, Yukiko Kurihara, Takahiro Sato, Sakura Kushiyama, Yumiko Kawamura, Rieko Asai, Yasunobu

- Uchijima, Hiroki Kurihara.
 “Subtype-specific domain functions of endothelin receptors in craniofacial development.” (口演) Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月12日 Il Ciocco Hotel & Resort (Lucca, Italy)
29. Rieko Asai*, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kokubo, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Yasunobu Uchijima, Yumiko Saga, Sachiko Miyagawa-Tomita and Hiroki Kurihara. “Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to chamber myocardium” (口演) Weinstein 2010 cardiovascular development conference 2010年5月21日 Royal Tropical Institute (AMSTERDAM, The Netherlands)
30. 有馬勇一郎, 西山功一, 宮川-富田幸子, 浅井理恵子, 金基成, 有馬聡, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「マウスにおける冠動脈の発生とその異常」(口演) 第9回心臓血管発生研究会 2010年7月10日シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県 浦安市)
31. 浅井理恵子*, 栗原由紀子, 藤澤興, 佐藤崇裕, 河村悠美子, 小久保博樹, 礪波一夫, 西山功一, 内島泰信, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. 「エンドセリンA受容体の発現による一次心臓領域における chamber myocardium 寄与細胞系譜の同定」(口演) 第9回心臓血管発生研究会 平成22年7月10日シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県 浦安市)
32. Kou Fujisawa*, Yukiko Kurihara, Sakura Kushiyama, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Rieko Asai, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. 「胚形成を通してみるGPCRの機能解析——エンドセリン受容体のサブタイプ特異性」(口演) 第7回東京呼吸器リサーチフォーラム2010年11月6日 帝人本社(東京都 千代田区)
33. Yumiko Kawamura*, Yasunobu Uchijima, Nanao Horike, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Tomoichiro Asano, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “Sirt3, a mitochondrial sirtuin, protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest” (口演) International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells” 2010年11月23日 九州大学医学部百年講堂 (福岡県福岡市)
34. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. “A novel approach toward an understanding of angiogenesis using in vitro time-lapse live imaging” (ポスター) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月1日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
35. Koichi Nishiyama*, Satoshi Arima*, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, and Hiroki Kurihara. “A newly identified phenomenon “Cell-mixing” during angiogenesis” (ポスター) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月1日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
36. Yuichiro Arima*, Koichi Nishiyama, Sachiko Miyagawa-Tomita, Satoshi Arima, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa, Hiroki Kurihara. “Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A type receptor knock out mice.” (ポスター) 第18回日本血管生物医学会学術集会 2010年12月1日 梅田スカイビル(大阪府 大阪市)
37. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama*, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro

- Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. "In-depth analysis of angiogenic morphogenesis through time-lapse imaging and quantification" (口演 および ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 2010年12月8日 神戸ポートピアホテル (兵庫県 神戸市)
38. Yukiko Kurihara*, Yasunobu Uchijima, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiya, Rieko Asai, Koichi Nishiyama, Hiroki Kurihara. "Involvement of non-coding RNA in the Endothelin signaling in branchial arch development" (ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 2010年12月8日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
39. Yasunobu Uchijima*, Yukiko Kurihara, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiya, Hiroki Kurihara. "Transcriptional regulation of non-coding RNA Efv-2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway" (ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 2010年12月8日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
40. 礪波一夫, 栗原由紀子, 内島泰信, 浅野知一郎, 反町洋之, 栗原裕基. 「活性中心を欠失した新規カルパインによる細胞骨格・運動性制御機能の解明」(ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 2010年12月8日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
41. Rieko Asai*, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kokubo, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Yasunobu Uchijima, Yumiko Saga, Sachiko Miyagawa-Tomita and Hiroki Kurihara. "Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium" (シンポジウム・口演) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 平成22年12月10日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
42. Yumiko Kawamura*, Yasunobu Uchijima, Nanao Horike, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Tomoichiro Asano, Tomokazu Amano, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. "Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest" (ポスター) 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同年会 2010年12月9日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
43. Kou Fujisawa*, Yukiko Kurihara, Sakura Kushiya, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Rieko Asai, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. "Endothelin-1-mediated intracellular trafficking of endothelin receptor type A is regulated by the cytoplasmic C-terminus and causes the subtype-specific signaling in craniofacial development." (ポスター) 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月9日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
44. Taro Kitazawa, Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Yumiko Kawamura, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara. "Abnormal craniofacial morphogenesis induced by ectopic expression of Hox genes." (ポスター) 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月10日 神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
45. Koichi Nishiyama*, Satoshi Arima, Yuichiro Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. "Collective endothelial cell movements driving angiogenic morphogenesis" (口演) 第8回心血管幹細胞研究会 2011年1月15日 品川プリンスホテル (東京都 港区)