

201110001A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成 24(2012)年 5 月

別添 1

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成24（2012）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 -----	13
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 -----	19
西山功一	
3. 心血管系の細胞系譜に関する研究 -----	25
富田幸子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	30

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、循環器疾患の病態への関与を解析した。ドキシソルピシン投与による心筋傷害モデルを作成したところ、miR-199a, miR-214 の2つの miRNA の組織傷害に対する保護効果が認められた。(ii) 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。(iii) 血管系における ETAR 発現細胞の分布を解析し、血管平滑筋の他、腎臓における周皮細胞、傍糸球体細胞などでの発現を明らかにした。(iv) 血管新生過程の解析に本研究によるノックインマウスを応用し、タイムラプスイメージングとコンピューター解析により新たな細胞動態を明らかにした。

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 により作成した ETAR-lacZ, ETAR-EGFP マウスを用いて、心血管系における ETAR 発現動態を解析し、病態モデルマウス解析の基盤とするとともに、同じ RMCE のシステムを用いて miR199a+miR214 ノックインマウスを作成し、循環器疾患、特に薬剤誘発性心筋傷害モデルを用いた心筋症の病態への関与を中心に解析した。さらに展開研究として ETAR 発現細胞の発生学的役割の解明や、タイムラプスイメージングとコンピューター解析を用いた新しい血管新生過程の細胞動態と細胞間相互作用機構の解明を進めた。

B. 研究方法

1. 遺伝子改変マウス

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。

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、miR199a+miR214 ノックインマウス雄に ICR を交配させた 2 ヶ月齢から 4 ヶ月齢マウスで、それぞれ同腹同性マウス内で、野生型ドキシソルピシン投与・非投与、ノックインマウスドキシソルピシン投与・非投与の 4 匹一群として以下の実験を試行した。

ドキシソルピシン誘発性急性心筋傷害モデルは、ドキシソルピシン 15mg/kg を、コントロールには生食を一回腹腔内投与した。24 時間後に遺伝子発現を、7 日後に心筋組織を検討した。

遺伝子発現は、左右心室を摘出し、PBS で血球を洗い流し、ISOGEN にて RNA を抽出した。Total RNA 1 μg から cDNA を合成し realtime PCR に供した。P21, PDK4, TXNIP の遺伝子発現を検討した。計 4 群の同腹同性マウスからデータを得た。

心筋組織は、4%パラホルムアルデヒド固定後パラフィン包埋し心短軸切片を作成した。左室上部、左室下部それぞれの隣接切片にて、HE 染色、マッソン-トリクローム染色、ビクトリア染色を行い、心筋の形態や変性、間質・血管周

囲の線維化を比較検討した。さらに、線維化の程度をスコア化した。心筋、血管周囲のそれぞれに、線維化の最も顕著な部位 2 箇所に対し、0, 1, 2 の 3 段階評価し平均をとり、第 1 回目、第 2 回目を合計した。

3. β -ガラクトシダーゼ染色

LacZ 遺伝子発現による β -ガラクトシダーゼの酵素活性は、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-galactoside) を基質とした発色反応により検出した。

4. 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。

5. 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。

6. 蛍光色素ラベリング

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. 組織移植・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、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、(5) と同様に観察した。

心筋培養については、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。

8. ニワトリ初期胚操作

ニワトリ初期胚の心流入路に、胎生 8.25 日の lacZ 発現マウスから摘出した心流入路の組織を同所性に移植し、心臓形成が進んだ後にマウス細胞の寄与を観察した。

9. 細胞増殖の評価

増殖細胞は、BrdU の取り込み (S 期)、リン酸化ヒストン H3 染色 (M 期) により評価した。

10. ERK のリン酸化

抗リン酸化 ERK 抗体、抗 ERK 抗体を用いてウェスタンブロットングを行い、リン酸化 ERK / 全 ERK 比を定量的に評価した。

11. RT-PCR

遺伝子発現について、特異的プライマーを用いてコンベンショナル PCR、定量的リアルタイム PCR の両方の方法で評価した。

12. 大動脈リングアッセイ

マウスより摘出し、周囲の脂肪・結合織を取り除いた大動脈の組織小片を I 型コラーゲンゲル上に静置し、medium-199+5%胎仔ウシ血清+50 ng/ml ヒト型リコンビナント VEGF 存在下で培養した。

13. マウス生体内での網膜血管新生解析

蛍光ラベルした BS-1 レクチンを生後 1 日のマウス心腔内に注射し、網膜新生血管への取り込みを経時的に追跡した。

14. タイムラプスイメージング

大動脈リングアッセイ開始 5~6 日後、蛍光色素 SYTO-16 または SYTO-61 (0.1 µg/ml, Molecular Probes) で内皮細胞をラベルし (内皮細胞が選択的ラベルされることは、細胞カーカーとの二重染色、FACS 解析により証明)、タイムラプス画像を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (オリンパス FluoView FV10i) により 15 分毎に 36 時間にわたって記録した。得られた画像を、FLUOVIEW ソフトウェアを用いてデジタル化し、解析に供した。

細胞のモザイク解析では、培養開始前に EGFP 発現アデノウイルスを大動脈リング標本に感染させた。ウィルス力価は、一部の内皮細胞が感染するように条件を設定した。

15. コンピューター解析

ImageJ、MTrackJ、MATLAB の解析ソフトを用

いて、以下の解析を行った。ラベルされた各細胞をマニュアルでプロットし、その時系列データをピクセル座標として蓄積した。各分枝の伸長方向を軸として各プロットの位置と速度を変換した。そのデータから、細胞の速度、方向性の相関、連続性、先端細胞の伸長動態などをモジュール化し、それぞれを表現するパラメータを独立性の検証を経て数値化し、数理統計手法を用いて解析した。

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。

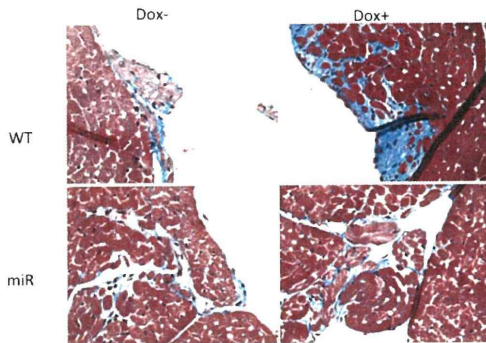
2. ドキソルピシン誘発性心筋傷害モデルの作成

i) 遺伝子発現

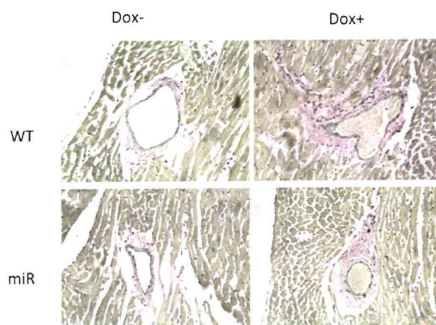
ドキソルピシンにより誘導される遺伝子として、DNA 損傷に伴う p53 活性化の標的遺伝子である p21 が報告されているため、各個体に対しドキソルピシンの効果があることを確認するために p21 の発現をみたところ、ドキソルピシン投与個体で非投与個体の 3-10 倍に上昇していることを確認した。これらのサンプルを用い、酸化ストレスに関わる因子として、ピルビン酸脱水素酵素の転写を阻害し TCA 回路への移行を阻害する PDK4 (Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4) と、酸化ストレス下でアポトーシスを促進する TXNIP (Thioredoxin-interacting

protein) に注目し、これらの発現を検討した。野生型ドキシソルピシン投与でPDK4が上昇している群では miR ノックインドキシソルピシン投与で野生型ドキシソルピシン投与マウスより発現が顕著に低下していた。TXNIP も同様に miR ノックインドキシソルピシン投与で低下した。

ii) 組織所見



上図は、マッソン-トリクローム染色の上下左室肉柱のうち、各群において最も線維化が強い部位を示している。ドキシソルピシン非投与（生食投与）群でも、左室腔側において心筋線維周囲または心筋束周囲の間質に軽度の線維化が見られるが、野生型ドキシソルピシン投与群では左室腔側の間質が強く線維化したのみならず心筋線維自体の線維化変性像が見られる部位があった。一方、miR199a+miR214 ノックインマウスドキシソルピシン投与群では、線維化の程度はほぼドキシソルピシン非投与群レベルにとどまった。



また、上図は、ピクトリア青染色で、検出された血管のうち血管周囲の線維化が一番強いものを示している。野生型、ノックインマウス共、ドキシソルピシン投与群で線維化が強かったが、ノックインマウスドキシソルピシン投与群でやや抑えられていた。

以上の結果をスコア化したところ、

野生型非投与群	0.5
野生型投与群	5
ノックイン非投与群	1
ノックイン投与群	1.5

という結果がえられ、miR199a+miR214 ノックインマウスにおいてはドキシソルピシンによる心線維化が抑制されていると考えられた。

また、ドキシソルピシン投与直前と投与後1週間後の体重変化は、野生型とノックインで、-15% (n=5) と -12% (n=5) で有意差がなかった。

3. 心血管系における ETAR 発現細胞の解析

ETAR-lacZ または ETAR-EGFP ノックインマウスを用いて、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 *Isl1* 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。これらの結果と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。

この特異な細胞動態を証明するため、以下の実験を行った。まず、E8.25 の *Ednra* 陽性心流入路領域に蛍光色素をマイクロインジェクションし、胎外培養を行った結果、標識された細胞群が左心室及び右心房に向かって移動する様子が観察された。さらに、E8.25 *Ednra*-EGFP 陽性領域を野生型胚心流入路に移植した結果、移植先の左心室で EGFP シグナルが認められた。これらの移動は、心筒中央部（心室）領域、心流出路領域の移植では観察されなかった。同様のキメラ実験を、マウス-ニワトリ胚でも試みた。その結果、ニワトリ胚に移植したマウス心流入路組織は生着して左室内へと取り込まれ、心筋細

胞に分化することが細胞特異的マーカーを用いて証明された。

血管系においては、大動脈や脳血管など広く血管平滑筋において ETAR-lacZ の発現が認められた。特に、腎臓では腎形成初期より未分化間葉細胞に発現し、その後血管平滑筋細胞、周皮細胞、レニン分泌細胞である傍糸球体細胞に強い発現が認められた。

4. 血管新生における細胞動態の解析

成獣 ETAR-EGFP マウスより大動脈組織片を摘出し、I 型コラーゲンゲル上で組織培養を行い、出芽による血管新生様の樹枝状構造伸長過程を観察した。CD31 による血管内皮細胞の同定、他の平滑筋マーカーとの共染色から、EGFP は血管平滑筋細胞に選択的に発現することが示された。この過程を血管新生モデルとして血管内皮細胞を選択的に SYTO 蛍光色素でラベルし、タイムラプスイメージングを行うことにより、従来予想されていた以上に細胞が複雑な動態を示すことが明らかになった。特に、内皮細胞は全体としての樹枝状構造を保持しながら常に異なる速度で遊走し、相互の相対的位置関係を常に変えていく混合現象を呈した。また、これまで特定の形質をもつ細胞と考えられていた先端細胞 (tip cell) は恒常的なものではなく、細胞の追い越し現象によって常に入れ替わっていくことが明らかになった。こうした現象は、マウス生体内での網膜血管新生過程で起きていることも、レクチンを用いた内皮細胞ラベリングで明らかになった。

さらに、新たに示された細胞動態の生理的意義や分子機序を明らかにするため、得られたタイムラプス画像から細胞一つ一つの位置情報を時間軸に沿って抽出し、それを基に細胞動態を特徴づけるパラメータを設定し定量評価した。血管新生は、血管の伸長や分岐といった質的に異なる要素 (モジュール) が時空間的に組み合わせることにより血管全体の形態的構造が構築されていると考えることができる。そこで、モジュールの一つである血管伸長の検討を行った。最も代表的な血管新生促進因子である VEGF の作用点に関して検討した結果、VEGF は血管内皮細胞の平均速度の増加や方向性運動の質的向上、さらに先端細胞の遊走距離増加を介して、血管伸長に対して促進的に作用することが示唆された。さらに薬理学的実験から、VEGF によって誘導される血管伸長反応の一部は、Delta-like 4-Notch シグナルを介した内皮細胞間相互作用

により負に制御されること、また内皮細胞と EGFP でラベルされる平滑筋細胞間の相互作用により正に制御されていることが示され、早期血管新生における内皮細胞-平滑筋細胞間相互作用の役割が示唆された。

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

ドキシソルビシンは、トポイソメラーゼ II を阻害し DNA 損傷をおこすため、抗癌剤として用いられているが、使用積算量 500mg/m² 以上で心筋傷害の副作用が出現することがよく知られている。他の文献や、体表面積-体重、ヒト-マウス

換算、予備実験から、ドキシソルピシン 15mg/kg (マウス 30g で 450 μ g) は急性心筋傷害のモデルとして妥当と考えた。

今回の結果から、miR-199a, miR-214 の2つの miRNA が組織傷害に対して保護効果をもつ可能性が示唆された。ドキシソルピシンの全身に対する作用は miR で抑制されていないことから、miR-199a, miR-214 の発現による効果は心筋あるいは血管平滑筋における特異的作用と考えられる。現段階で、miR-199a, miR-214 のどちらが直接病態形成に関与しているかは明らかではなく、今後それぞれ単独の過剰発現マウスの作成を待たなければならないが、これらの miRNA の標的遺伝子として HIF1 α , Sirt1, Ncx1 等が報告されており、これら miRNA の標的遺伝子を含めた病態生理的役割の解明とともに、創薬開発への発展が期待される。

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_f 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。

本研究では同時に、血管系、特に腎臓における ETAR の発現動態を明らかにした。この結果は、腎疾患や高血圧などの病態理解に重要な知見となった。特に、レニン分泌細胞である傍糸球体細胞での発現は従来の報告に一致するものであるが、その強い発現と発生過程での追跡から、

同細胞の分化や病態について新しい展開が期待できると考えられた。

このように、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、心血管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. 血管新生過程の細胞動態と細胞間相互作用

本研究のもう1つの展開として、血管新生のタイムラプスイメージングとコンピューター解析による細胞動態と内皮細胞-平滑筋細胞間の相互作用の意義に関する新たな知見が得られた。近年、血管新生は伸長する分枝の先端に位置して特定の形質をもつ先端細胞が後続の茎細胞と呼ばれる内皮細胞を先導していくと考えられているが、この先端細胞は恒常的な形質を持った細胞ではなく、細胞の追い越し現象によって常に入れ替わっていく可能性が示され、こうした現象がマウス生体内での網膜血管新生過程で起きていることも、レクチンを用いた内皮細胞ラベリングで明らかになった。さらに、Delta-like 4-Notch シグナルを介した内皮細胞間相互作用や内皮細胞-平滑筋細胞間の相互作用がこの過程に関与していることが示され、血管新生過程の細胞動態の理解に新しい視点が賦与された。この知見はまた、本研究における RMCE による遺伝子ノックインとその表現型を解析する上で、データ解釈の枠組みと方法論の両面で貢献すると考えられた。

5. 今後の展望

本研究の結果より、miR-199a, miR-214 の2つの miRNA の組織傷害に対して保護効果をもつ可能性が示唆された。HIF1 α , Sirt1, Ncx1 等のこれら miRNA の標的遺伝子を含め、その病態生理的役割の解明とともに、創薬開発への発展が期待される。

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できる。本年度はこのうち、ETAR-lacZ マウス(資源番号 nbio193)、ETAR-EGFP マウス(資源番号 nbio194)の寄託を行い、リソースとして提供可能にした。

さらに、鳥類胚を用いた異種間移植実験、タイムラプスイメージングによる解析手法など新しい研究展開により、病態解析や創薬開発にも

有用なツールを提供することが期待できる。

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、循環器疾患の病態への関与を解析した。ドキシソルピシン投与による心筋傷害モデルを作成したところ、miR-199a, miR-214 の2つのmiRNA の組織傷害に対する保護効果が認められた。(ii) 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。(iii) 血管系におけるETAR 発現細胞の分布を解析し、血管平滑筋の他、腎臓における周皮細胞、傍糸球体細胞などでの発現を明らかにした。(iv) 血管新生過程の解析に本研究によるノックインマウスを応用し、タイムラプスイメージングとコンピューター解析により新たな細胞動態を明らかにした。これらの成果は、循環器疾患の病態におけるmiRNA の役割を明らかにするとともに、発生学的見地から病態解析に新しい視点をもたらすものであり、miRNA とその標的遺伝子を中心とした治療法の開発への基盤となることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arima S*, Nishiyama K*, Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. (2011). Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development*. 138, 4763-4776. *These authors contributed equally to this work. (査読有)
2. 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*. 11, 371-377. (査読有)
3. 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. (査読有)

4. Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. (2011) Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. *Differentiation* 81:299-306 (査読有)
 5. 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. (査読有)
 6. Kudo Y, Kaneko M, Nakazawa M, Miyagawa-Tomita S. (2011) A case of Cor Triatriatum with an abnormal P wave: The pacemaker action from the specialized tissue in the abnormal septum. *Pediatric Cardiology* 32:1244-148. (査読有)
 7. Kushiyama A, Okubo H, Sakoda H, Kikuchi T, Fujishiro M, Sato H, Kushiyama S, Iwashita M, Nishimura F, Fukushima T, Nakatsu Y, Kamata H, Kawazu S, Higashi Y, Kurihara H, Asano T. (2012). Xanthine Oxidoreductase Is Involved in Macrophage Foam Cell Formation and atherosclerosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 291-298. (査読有)
- ##### 2. 学会発表
1. Ki-Sung Kim, Yuichiro Arima, Rieko Asai, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Koichi Nishiyama, Yukiko Kurihara, Takashi Igarashi, Hiroki Kurihara. 「Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway.」 2011 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research joint meeting 2011年5月1日 Denver Convention Center, (Denver, USA)
 2. 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」 2011 Weinstein Cardiovascular Development Conference 2011年5月6日 ヒルトン シンシナティ ネーデルランド プラザ (米国)
3. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Nakanishi T, Saga Y. 「Hesr2 disrupted mice develop aortic valve disease with advancing age. 」 2011 Weinstein Cardiovascular Development Conference 2011年5月6日 ヒルトン シンシナティ ネーデルランド プラザ (米国)
 4. Imanaka Y, Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Yoshida T, Nakajima Y, Miyagawa-Tomita S 「 Matricellular protein, tenascin-C, may regulate proepi/epicardial cell function during coronary vessel development. 」 2011 Weinstein Cardiovascular Development Conference 2011年5月6日 ヒルトン シンシナティ ネーデルランド プラザ (米国)
 5. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara 「Endothelin receptor type-A expression defines a distinct subpopulation within the heart field and contributes to chamber myocardium formation」 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月19日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県 宜野湾市)
 6. Taro Kitazawa, Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Yumiko Kawamura, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara 「Analysis of Hox genes' functions in craniofacial morphogenesis using recombinase mediated cassette exchange system that induces ectopic expression of Hox genes」 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月20日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県 宜野湾市)
 7. Koichi Nishiyama 「 Collective endothelial cell movement in angiogenic morphogenesis」 The 9th Japan-Korea Joint Symposium on vascular biology (招待講演) 2011年8月25日 ウエスティン朝鮮ホテル釜山(韓国)
 8. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara 「The first heart field subdomain defined by endothelin receptor type-A expression contributes to conduction system development」 ESC Working Group on Developmental Anatomy and Pathology 2011年9月24日 リブリツェ・キャッスル (チェコ共和国)
 9. Koichi Nishiyama, Satoshi Aria, Toshiaki Ko, Yuichiro Arima, Yuji Hakozaki, Kei Sugihara, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「 Id1 modulates sprouting angiogenesis possibly via spatiotemporal regulation of the Notch signal specification」 第84回日本生化学大会 2011年9月22日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)
 10. 河村 悠美子, 内島泰信, 藤澤興, 西山功一, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「Sirt3による酸化ストレス防御機構の初期胚発生における役割」 第84回日本生化学会大会 2011年9月24日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)
 11. 金基成, 有馬勇一郎, 浅井理恵子, 佐藤崇博, 内島泰信, 西山功一, 五十嵐隆, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「エンドセリンシグナルによる咽頭弓動脈リモデリング機構の解明」 第10回心臓血管発生研究会 2011年10月7日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)
 12. 有馬勇一郎, 宮川-富田幸子, 西山功一, 浅井理恵子, 金基成, 小川久雄, 栗原由紀子,

栗原裕基. 「冠動脈形成における神経堤細胞の新しい役割 -マウスからみた神経堤細胞と冠動脈形成-」第10回心臓血管発生研究会 2011年10月7日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)

13. 宮川-富田幸子, 有馬勇一郎, 前田和宏, 栗原裕基. 「冠動脈形成における神経堤細胞の新しい役割 -鳥類からみた神経堤細胞と冠動脈形成-」第10回心臓血管発生研究会 2011年10月7日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)

14. 浅井理恵子, 栗原由紀子, 有馬勇一郎, 金基成, 西山功一, 内島泰信, 中野敦, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. 「In vitro/in vivo 刺激伝導系形成モデル確立の試み」第10回心臓血管発生研究会 2011年10月8日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)

15. 西山功一, 有馬聡, 有馬勇一郎, 金基成, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「Ex vivo における定量的血管新生評価系の開発」第34回日本高血圧学会総会 2011年10月22日 栃木県総合文化センター (栃木県 宇都宮市)

16. Koichi Nishiyama, Satoshi Aria, Toshiaki Ko, Yuichiro Arima, Yuji Hakozaki, Kei Sugihara, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「Dynamic and Heterogeneous collective endothelial cell movement driving angiogenic morphogenesis」The Second Pacific Symposium on Vascular Biology 2011年10月30日 済州新羅ホテル (韓国)

17. Koichi Nishiyama, Satoshi Aria, Hiroki Kurihara. 「Morphogenetic cell movement in sprouting angiogenesis」日蘭二国間交流セミナーFrontiers Angiogenesis: Development and Diseases (招待講演) 2011年11月4日 昭和薬科大学 (東京都 町田市)

18. Yuichiro Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, Koichi Nishiyama, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu

Uchijima, Hisao Ogawa, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「Novel roles of the Endothelin-1 and Endothelin A receptor signaling in coronary artery formation.」日蘭二国間交流セミナーFrontiers Angiogenesis: Development and Diseases 2011年11月5日 昭和薬科大学 (東京都 町田市)

19. Koichi Nishiyama, Satoshi Aria, Toshiaki Ko, Yuichiro Arima, Yuji Hakozaki, Kei Sugihara, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「Collective endothelial cell movement in angiogenic morphogenesis」American Heart Association Scientific Session 2011年11月15日 オーランドコンベンションセンター (米国)

20. Yuichiro Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, Koichi Nishiyama, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu Uchijima, Hisao Ogawa, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A receptor knockout mice.」American Heart Association Scientific Session 2011年11月15日 オーランドコンベンションセンター (米国)

21. Koichi Nishiyama, Hiroki Kurihara. 「Mechanism involving dynamic and heterogeneous endothelial cell movement during angiogenesis」第19回日本血管生物医学会学術集会 (招待講演) 2011年12月9日 東京ステーションコンファレンス (東京都 千代田区)

22. Yuichiro Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, Koichi Nishiyama, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu Uchijima, Hisao Ogawa, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「Neural crest cells contribute to coronary artery development through endothelin signaling.」第19回日本血管生物医学会学術集会 2011年12月10日 東京ステーションコンファレンス (東京都 千代田区)

23. Ki-Sung Kim, Yuichiro Arima, Rieko Asai, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Koichi Nishiyama, Yukiko Kurihara, Takashi Igarashi, Hiroki Kurihara. 「 Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway.」 第 19 回日本血管生物医学会学術集会 2011 年 12 月 10 日 東京ステーションコンファランス (東京都 千代田区)
24. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Hiroki Kurihara 「 Angiogenic morphogenesis driven by collective endothelial cell behavior」 第 34 回分子生物学会年会 (招待講演) 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
25. 栗原由紀子, 内島泰信, 櫛山櫻, 濱崎真夏, 西山 功一, 栗原 裕基「下顎形成におけるエンドセリンシグナルにおける non-coding RNA とパラスペックル蛋白の作用」 第 34 回 日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
26. 宮川-富田 幸子, 有馬 勇一郎, 栗原 裕基 「Novel roles of the neural crest in coronary artery formation through endothelin signaling」 第 34 回 日本分子生物学会 (招待講演) 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
27. 河村悠美子, 内島泰信, 藤澤興, 西山功一, 浅野知一郎, 栗原由紀子, 栗原裕基 「Physiological roles of Sirt3 in mouse preimplantation embryo development (マウス初期胚発生における Sirt3 の機能と生理的役割の解明)」 第 34 回 日本分子生物大会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
28. Taro Kitazawa, Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Yumiko Kawamura, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara 「Hox gene function and possible crosstalk with Dlx genes in craniofacial morphogenesis」 第 34 回 日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
29. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Ki-sung Kim, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara 「The first heart field subdomain defined by endothelin receptor type-A expression contributes to conduction system development」 第 34 回 日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
30. Yuichiro Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, Koichi Nishiyama, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu Uchijima, Hisao Ogawa, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「 Endothelin-1/ Endothelin A receptor signaling are required for proper coronary artery development.」 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
31. 牧野智行, 宮川-富田幸子, 立花誠, 眞貝洋一, 竹内隆. 「ヒストンメチラーゼ G9a および GLP の心筋細胞特異的欠損マウスにおける心臓形態形成異常の解析.」 第 34 回 日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
32. Yumiko Kawamura, Yasunobu Uchijima, Kou Fujisawa, Koichi Nishiyama, Yukiko Kurihara and Hiroki Kurihara. 「Protective role of Sirt3 against p53-dependent developmental arrest induced by oxidative stress in preimplantation embryos」 Keystone Symposia “Sirtuins in metabolism, aging and disease” 2012 年 2 月 13 日 Granlibakken Resort (Tahoe City, California, USA)
33. Taro Kitazawa, Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Yumiko Kawamura, Takahiro Sato, Yasunobu

Uchijima, Hiroki Kurihara 「Hox gene function and possible crosstalk with Dlx genes in craniofacial morphogenesis」 Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2012年3月19・20日 フォーポイント・バイ・シェラトン・ロサンゼルス (米国)

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

34. 西山功一, 栗原裕基 「Ex vivo 血管新生における血管内皮細胞の集団的運動」 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演) 2012年3月26日 山梨大学 (山梨県 甲府市)
35. Yuichirou Arima, Sachiko Miyagawa-Tomita, Koichi Nishiyama, Rieko Asai, Ki-Sung Kim, Yasunobu Uchijima, Hisao Ogawa, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「Novel roles of the neural crest in coronary artery formation through the Endothelin-1/Endothelin A receptor signaling.」 第 76 回日本循環器学会学術集会 2012年3月18日 福岡国際会議場 (福岡県 福岡市)
36. Yukiko Kurihara, Yasunobu Uchijima, Sakura Kushiya, Hiroki Kurihara 「Involvement of non-coding RNA: Efv2 in the Endothelin signaling in branchial arch development」 Keystone Symposia Conference Non-Coding RNAs 2012年4月2日 スノウバード・クリフロッジ (米国)

翻訳

1. 分担翻訳 “Clinical Veterinary Advisor -Dogs and Cats. Mosby” (Elsevier) 「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 発行、1851pages

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

マウス発生工学によるマイクロ RNA ノックインマウスの樹立と病態解析

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

miR-199a, *miR-214* は共通の前駆体から生成され、心肥大、虚血障害などで発現レベルが上昇する miRNA であり、その欠損マウスは著しい成長障害と骨形成異常を示す。この 2 つの miRNA に注目し、リコンビナーゼ媒介カセット交換法 (RMCE) を用いてエンドセリン A 型受容体 (ETAR) 遺伝子座への遺伝子ノックインマウスを作成し、循環器疾患の病態への関与を解析した。*miR199a+miR214* ノックインマウスは野生型同胞マウスに比べ、外見や成育に明らかな差は認められなかった。しかし、ドキシソルビシン投与による心筋傷害モデルを作成したところ、ノックインマウスにおいて心筋層や血管周囲の線維化の軽減が認められ、炎症機転に伴う p21 等の遺伝子誘導も抑制された。この結果より、*miR-199a*, *miR-214* の 2 つの miRNA の組織傷害に対する保護効果が予想された。HIF1 α , Sirt1, Ncx1 等のこれら miRNA の標的遺伝子を含め、その病態生理的役割の解明とともに、創薬開発への発展が期待される。

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、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媒介カセット交換法 (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に研究を進めた。特に、心肥大、虚血障害などで発現レベルが上昇する miRNA であり、その欠損マウスが著しい成長障害と骨形成異常を示す *miR-199a*, *miR-214* の 2 つの miRNA に注目して遺伝子ノックインマウスを作成し、循環器疾患の病態への関与を解析した。

B. 研究方法

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。

マウスは温度 23 \pm 2 $^{\circ}$ 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. ドキソルピシン誘発性心筋傷害モデルの作成

使用したマウスは、miR199a+miR214 ノックインマウス雄に ICR を交配させた 2 ヶ月齢から 4 ヶ月齢マウスで、それぞれ同腹同性マウス内で、野生型ドキソルピシン投与・非投与、ノックインマウスドキソルピシン投与・非投与の 4 匹一群として以下の実験を試行した。

ドキソルピシン誘発性急性心筋傷害モデルは、ドキソルピシン 15mg/kg を、コントロールには生食を一回腹腔内投与した。24 時間後に遺伝子発現を、7 日後に心筋組織を検討した。

遺伝子発現は、左右心室を摘出し、PBS で血球を洗い流し、ISOGEN にて RNA を抽出した。Total RNA 1µg から cDNA を合成し realtime PCR に供した。P21、PDK4、TXNIP の遺伝子発現を検討した。計 4 群の同腹同性マウスからデータを得た。

心筋組織は、4%パラホルムアルデヒド固定後パラフィン包埋し心短軸切片を作成した。左室上部、左室下部それぞれの隣接切片にて、HE 染色、マッソントリクローム染色、ピクトリア染色を行い、心筋の形態や変性、間質・血管周囲の線維化を比較検討した。さらに、線維化の程度をスコア化した。心筋、血管周囲のそれぞれに、線維化の最も顕著な部位 2 箇所に対し、0, 1, 2 の 3 段階評価し平均をとり、第 1 回目、第 2 回目を合計した。

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（頷椎の融合不全など）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、

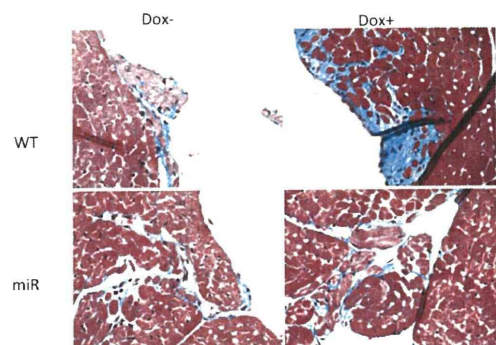
RMCE ノックインシステムによる miRNA の機能的発現が確かめられた。今後、miR199a+miR214 ノックインマウスにおいて、後述の心筋傷害モデル作成などを試み、miR199a, miR214 の病態生理的役割を解析する予定である。

2. 心筋傷害モデル

i) 遺伝子発現

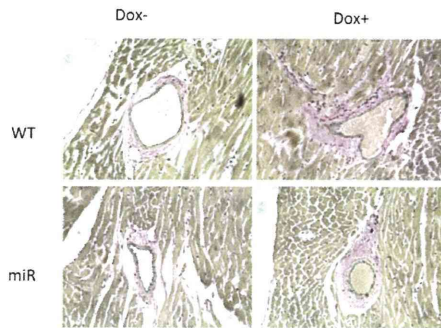
ドキソルピシンにより誘導される遺伝子として、DNA 損傷に伴う p53 活性化の標的遺伝子である p21 が報告されているため、各個体に対しドキソルピシンの効果があることを確認するために p21 の発現をみたところ、ドキソルピシン投与個体で非投与個体の 3-10 倍に上昇していることを確認した。これらのサンプルを用い、酸化ストレスに関わる因子として、ピルビン酸脱水素酵素の転写を阻害し TCA 回路への移行を阻害する PDK4 (Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4) と、酸化ストレス下でアポトーシスを促進する TXNIP (Thioredoxin-interacting protein) に注目し、これらの発現を検討した。野生型ドキソルピシン投与で PDK4 が上昇している群では miR ノックインドキソルピシン投与で野生型ドキソルピシン投与マウスより発現が顕著に低下していた。TXNIP も同様に miR ノックインドキソルピシン投与で低下した。

ii) 組織所見



上図は、マッソントリクローム染色の上下左室肉柱のうち、各群において最も線維化が強い部位を示している。ドキソルピシン非投与（生食投与）群でも、左室腔側において心筋線維周囲または心筋束周囲の間質に軽度の線維化が見られるが、野生型ドキソルピシン投与群では左室腔側の間質が強く線維化したのみならず心筋線維自体の線維化変性像が見られる部位があった。一方、miR199a+miR214 ノックインマウス

ドキソルビシン投与群では、線維化の程度はほぼドキソルビシン非投与群レベルにとどまった。



また、上図は、ビクトリア青染色で、検出された血管のうち血管周囲の線維化が一番強いものを示している。野生型、ノックインマウス共、ドキソルビシン投与群で線維化が強かったが、ノックインマウスドキソルビシン投与群でやや抑えられていた。

以上の結果をスコア化したところ、

野生型非投与群 0.5

野生型投与群 5

ノックイン非投与群 1

ノックイン投与群 1.5

という結果がえられ、miR199a+miR214 ノックインマウスにおいてはドキソルビシンによる心線維化が抑制されていると考えられた。

また、ドキソルビシン投与直前と投与後1週間後の体重変化は、野生型とノックインで、-15% (n=5) と-12% (n=5) で有意差がなかった。

D. 考察

ドキソルビシンは、トポイソメラーゼIIを阻害しDNA損傷をおこすため、抗癌剤として用いられているが、使用積算量500mg/m²以上で心筋傷害の副作用が出現することがよく知られている。他の文献や、体表面積-体重、ヒト-マウス換算、予備実験から、ドキソルビシン15mg/kg (マウス30gで450μg)は急性心筋傷害のモデルとして妥当と考えた。

今回の結果から、miR-199a, miR-214の2つのmiRNAが組織傷害に対して保護効果をもつ可能性が示唆された。ドキソルビシンの全身に対する作用はmiRで抑制されていないことから、miR-199a, miR-214の発現による効果は心筋あるいは血管平滑筋における特異的作用と考えられる。現段階で、miR-199a, miR-214のどちらが直接病態形成に関与しているかは明らかでは

なく、今後それぞれ単独の過剰発現マウスの作成を待たなければならないが、これらのmiRNAの標的遺伝子としてHIF1a, Sirt1, Ncx1等が報告されており、これらmiRNAの標的遺伝子を含めた病態生理的役割の解明とともに、創薬開発への発展が期待される。

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樹立した。さらに、ドキソルビシン腹腔内投与による心筋傷害モデルの作成により、miR-199a, miR-214の2つのmiRNAが組織傷害に対して保護効果をもつ可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. (2011). Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development* 138, 4763-4776.
2. 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.* 11, 371-377.
3. 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.

2. 学会発表

1. Ki-Sung Kim, Yuichiro Arima, Rieko Asai, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Koichi Nishiyama, Yukiko Kurihara, Takashi Igarashi, Hiroki Kurihara.

- 「 Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway.」 2011 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research joint meeting 2011年5月1日 Denver Convention Center, (Denver, USA)
2. 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」 2011 Weinstein Cardiovascular Development Conference 2011年5月6日 ヒルトン シンシナティ ネーデルランド プラザ (米国)
 3. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara 「Endothelin receptor type-A expression defines a distinct subpopulation within the heart field and contributes to chamber myocardium formation」 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月19日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県 宜野湾市)
 4. Taro Kitazawa, Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Yuichiro Arima, Yumiko Kawamura, Takahiro Sato, Yasunobu Uchijima, Hiroki Kurihara 「Analysis of Hox genes' functions in craniofacial morphogenesis using recombinate mediated cassette exchange system that induces ectopic expression of Hox genes」 第44回日本発生生物学会年会 2011年5月20日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県 宜野湾市)
 5. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara 「The first heart field subdomain defined by endothelin receptor type-A expression contributes to conduction system development」 ESC Working Group on Developmental Anatomy and Pathology 2011年9月24日 リブリツェ・キャッスル (チェコ共和国)
 6. Koichi Nishiyama, Satoshi Aria, Toshiaki Ko, Yuichiro Arima, Yuji Hakozaiki, Kei Sugihara, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「Id1 modulates sprouting angiogenesis possibly via spatiotemporal regulation of the Notch signal specification」 第84回日本生化学大会 2011年9月22日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)
 7. 河村 悠美子, 内島泰信, 藤澤興, 西山功一, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「Sirt3による酸化ストレス防御機構の初期胚発生における役割」 第84回日本生化学会大会 2011年9月24日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)
 8. 金基成, 有馬勇一郎, 浅井理恵子, 佐藤崇博, 内島泰信, 西山功一, 五十嵐隆, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「エンドセリンシグナルによる咽頭弓動脈リモデリング機構の解明」 第10回心臓血管発生研究会 2011年10月7日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)
 9. 有馬勇一郎, 宮川-富田幸子, 西山功一, 浅井理恵子, 金基成, 小川久雄, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「冠動脈形成における神経堤細胞の新しい役割 -マウスからみた神経堤細胞と冠動脈形成-」 第10回心臓血管発生研究会 2011年10月7日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)
 10. 浅井理恵子, 栗原由紀子, 有馬勇一郎, 金基成, 西山功一, 内島泰信, 中野敦, 宮川-富田幸子, 栗原裕基. 「In vitro/in vivo 刺激伝導系形成モデル確立の試み.」 第10回心臓血管発生研究会 2011年10月8日 ホテル華の湯 (福島県 郡山市)
 11. 西山功一, 有馬聡, 有馬勇一郎, 金基成, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基. 「Ex vivoにおける定量的血管新生評価系の開発」 第