

20111000/B

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(2009)年度～平成 23(2011)年度
総合研究報告書

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総合研究報告書表紙
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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 栗原 裕基

平成24（2012）年5月

目 次

I. 総合研究報告	
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	1
栗原裕基	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	16
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	19

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（総合）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に関する研究

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

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媒介カセット交換（RMCE）を用いたマウス遺伝学的研究を基盤とし、心筋細胞および血管平滑筋細胞における導入遺伝子発現を通して循環器疾患の病態モデルの作成を試みた。特に、近年さまざまな生理機能や病態形成の新たな担い手であるマイクロRNA（miRNA）に注目し、中でも、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、その欠損マウスが著しい成長障害と骨形成異常を示すmiR-199a, miR-214の遺伝子ノックインマウスを作成し、表現型を解析した。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あるいはmiR-214の心筋傷害に対する保護効果が予想された。さらに、RMCEによりノックインしたマーカー遺伝子の解析などにより、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、血管系では血管平滑筋の他、腎臓における周皮細胞、傍糸球体細胞などでETAR発現が認められることが明らかになった。さらに展開研究として、血管新生機構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血管新生過程における新たな細胞動態を明らかにした。

研究分担者氏名

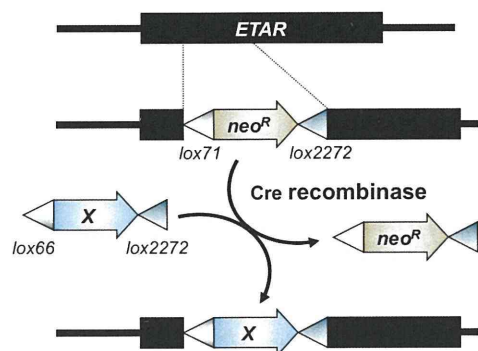
栗原 由紀子 東京大学大学院医学系研究科講師
西山 功一 東京大学大学院医学系研究科助教
富田 幸子 東京女子医科大学医学部助教

Development 135:755, 2008; Sato et al. PNAS 105:18806, 2008) (図1)。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。

A. 研究目的

ヒト疾患の動物モデル作成と病態解析、創薬開発研究などにおいて、今日マウスにおける遺伝子改変技術は中心的な役割を果たしている。中でも、Cre リコンビナーゼ-loxP 系などを用いた組織特異的遺伝子改変は、特定の組織・器官の病態解析を行う上で極めて有用であり、循環器疾患においては心筋細胞や血管細胞を標的とした遺伝子導入、発現が多く用いられている。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、Cre-loxP 系を用いたリコンビナーゼ媒介カセット交換（Recombinase-mediated cassette exchange; RMCE）という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.

図1 RMCEによるETAR遺伝子座への遺伝子導入



一方、近年さまざまな生理機能や病態形成の担い手として、タンパク質へ翻訳されずに機能する非コード

RNA (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マイクロ RNA (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、東大医科研・中岡隆志博士(現在東京女子医大)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してきた (Watanabe et al. Dev Dyn 237:3738, 2008)。さらに、他の研究グループよりこの2つの miRNA は心肥大・腎臓の虚血障害などで発現レベルが上昇することが報告され、循環器疾患の病態生理に深く関与することが考えられた。これらの成果および知見に基づき、本研究では 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。

一方、このマウスを用いて病態解析を進めていく上で、標的とする ETAR 発現細胞の分布や発生学的系譜を明らかにしておくことは重要な基盤となる。本研究では、miR199a+miR214 ノックインマウス作成に先行して樹立した ETAR-lacZ, ETAR-EGFP マウスを用いて、心血管系における ETAR 発現動態を解析した。さらに本プロジェクトの展開研究として 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、RMCE を用いて以下のように作成した。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。

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。

2. 心傷害モデルの作成

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 ヶ月齢マウスを用い、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、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。

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ティングを行い、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 μ g/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 発現アデノウィルスは大動脈リング標本に感染させた。ウィルスカ価は、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。

(倫理面への配慮)

研究代表者グループの実験動物の飼育および実験に関しては、東京大学医学系研究科動物実験倫理委員会において承認を受け、実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に即して動物愛護への配慮を最大限に行った。また、遺伝子組み換え実験は組換え DNA 実験安全委員会において承認を受け、適切な拡散防止措置をとった上で行われた。共同研究者である富田の研究も、東京女子医科大学において研究遂行に関する同様の承認を受けて行われた。

C. 研究結果

1. 遺伝子ノックインマウスの作成

(1) レポーター遺伝子ノックインマウス

RMCE によって外来遺伝子が ETAR 遺伝子座にノックインされ、ETAR 遺伝子プロモーターによる転写制御を受けるようになることを、外来遺伝子として lacZ 遺伝子を用いることによって検証した。Cre 発現アデノウィルス導入を用いた ES 細胞でのスクリーニングでは 50~90% の効率で組み換えが確認された。LacZ 遺伝子への組み換えが起こった ES 細胞から生殖系キメラマウスを作成し、得られた F1 ヘテロ接合体で lacZ の発現を解析した。X-gal にて染色したところ、胎生期において頭部神経堤幹細胞とそれに由来する鰓弓領域の間葉系細胞をはじめ、ETAR を発現する細胞において lacZ 活性発現が認められた。

成獣マウスにおける lacZ の発現は、血管平滑筋細胞の他、心筋細胞、肺の間質細胞、腎臓旁糸球体細胞など、これまで ET の作用が知られている細胞に強く発現し、これらの細胞に特異的に遺伝子を発現させ、個体レベルでその作用を解析することが可能であることが示された。

さらに、同じ手法を用いて、ETAR 遺伝子座に EGFP 遺伝子を導入した。EGFP は lacZ と同様の分布を示し、その発現レベルは先に作成した ETAR プロモーターを用いたトランスジェニックマウスにおける正所性発現より高く、内在性遺伝子発現を正しく反映すると考えられた。胚組織を用いた FACS ソーティングでは EGFP 陽性細胞と陰性細胞がはっきり分離することが示された。

(2) miRNA ノックインマウス

リコンビナラ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ですぐに発育、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. ドキソルビシン誘発性心筋傷害モデルの作成

(1) 遺伝子発現

ドキソルビ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ビシンの効果があることを確認するために心臓における p21 の発現をみたところ、ドキソルビ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。野生型ドキソルビシン投与で PDK4 が上昇している群では miR ノックインドキソルビシン投与で野生型ドキソルビ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ビシン投与で低下した。

(2) 組織所見

図2 ドキソルビシン投与による左室肉柱の線維化

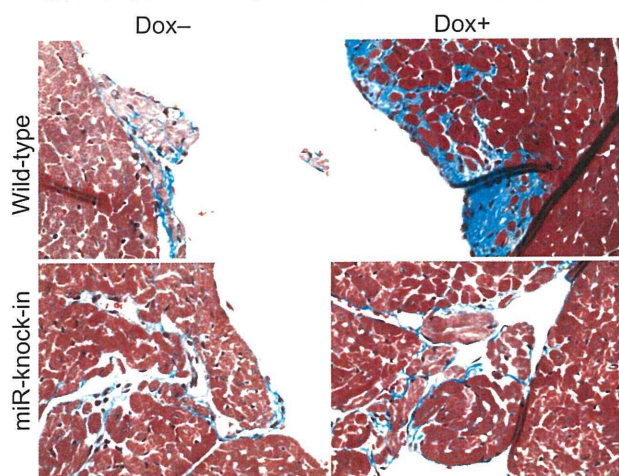


図2は、マッソン-トリクローム染色の上下左室肉

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。ドキソルビシン非投与（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、野生型ドキソルビ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。

図3 ドキソルビシン投与による冠血管周囲の線維化

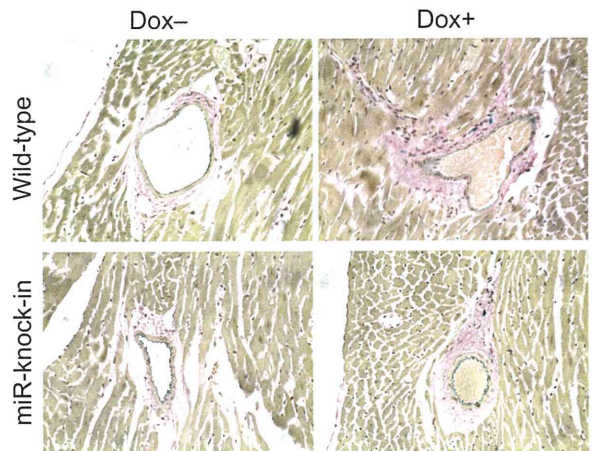


図3は、ビクトリア青染色で、検出された血管のうち血管周囲の線維化が一番強いものを示している。野生型、ノックインマウス共、ドキソルビシン投与群で線維化が強かったが、ノックインマウスドキソルビシン投与群でやや抑えられていた。

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。

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の様子が観察された。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。

心臓形成初期における Edn1/Ednra シグナルの役割を明らかにするため、Ednra ノックアウト胚における発生期の心臓を解析した。その結果、E9.5 Ednra 欠損胚の一部において、心室の低形成が認められた。そこで、BrdU の取り込み、ヒストン H3 のリン酸化を指標に細胞増殖の評価を行ったところ、Ednra-lacZ 陽性細胞群が主に寄与する左心室の心筋において、Ednra 欠損胚で増殖活性の顕著な低下が認められた。この増殖活性の低下が ERK のリン酸化を介しているか検証するため、Ednra 欠損（ホモ接合体）胚・ヘテロ接合体胚・野生型胚から心臓を摘出し Western blotting を行った結果、Ednra アリルの数に応じたリン酸化 ERK の低下が見られた。さらに、左心室マーカーの発現を E9.5 Ednra 欠損（ホモ接合体）胚・ヘテロ接合体胚で比較した結果、Ednra 欠損胚では Tbx5 とその下流遺伝子 Cx40 の発現低下が見られた。また、Ednra 欠損胚左心室では Tbx2 の異所的発現も観察されたことから、エンドセリンシグナルが T-box 遺伝子群の発現調節機構に関与している可能性が考えられた。Tbx5 は心臓と上肢に複合奇形を示す先天性疾患 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。

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。大動脈壁においては ETAR-lacZ 陽性平滑筋細胞と陰性平滑筋細胞が認められ、平滑筋細胞の不均一性と病態との関係などに関する研究に寄与する所見と考えられた。一方、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。これに対し、腎尿細管では ETAR-lacZ の発現は認められず、受容体による ET の作用の違いが細胞レベル

で明確に示された。

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思われる。

2. 心筋傷害モデル

ドキシソルピシンは、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 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 HIF1a, Sirt1, Nex1 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 Kf チャンネルをコードする 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。HIF1a, Sirt1, Nex1 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。

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、心筋症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が提供可能であると考えられた。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。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今後新しい切り口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 ETAR-lacZ, EGFP, 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. 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. (査読有)

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, 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. (査読有)
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, Ogura A. (2009). A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS ONE*. 4:e4943. (査読有)
4. 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. (査読有)
5. 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. (査読有)
6. 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. (査読有)
7. 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. (査読有)
8. 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. (査読有)
9. 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. (査読有)
 10. Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Vincent DS, 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*, 106:495-503Cover Image. (査読有)
 11. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama 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 CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 285, 33018-33027. (査読有)
 12. 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. (2010) Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 57-63. (査読有)
 13. 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, 4138-4147. (査読有)
 14. 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. (2010). Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H431-439. (査読有)
 15. 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)
 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.* 11, 371-377. (査読有)
 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. (査読有)
 18. Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. (2011). Immunolocalization of tenascin C during proximal coronary arteriogenesis: possible role in mural development. *Differentiation*, 81:299-306 (査読有)
 19. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. (2011) Effects of transforming growth factor-β3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *Am J Vet Res* 72:194-202. (査読有)
 20. Kudo Y, Kaneko M, Nakazawa M, 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: 1244-1248. (査読有)
 21. 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. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kokubo, Kazuo Tonami, Yasunobu Uchijima, Yumiko Saga, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara. 「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年5月7-9日 San Francisco (CA, USA)

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, 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 朱鷺メッセ(新潟県 新潟市)
3. 藤澤興, 栗原由紀子, 佐藤崇裕, 榊山櫻, 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 朱鷺メッセ(新潟県 新潟市)
4. 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 年 9 月 10-11 日 東京大学(東京都 文京区)
5. 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 年 10 月 8-9 日 東京大学(東京都 文京区)
6. 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 年 10 月 8-9 日 東京大学(東京都 文京区)
7. 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 年 10 月 8-9 日 東京大学(東京都 文京区)
8. 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 年 10 月 21-24 日 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)
9. 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 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)
10. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 榊山櫻, 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 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)
11. 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 月 8-12 日 Orland (USA)
12. 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 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
13. 内島泰信, 栗原由紀子, 佐藤崇裕, 藤澤興, 榊山櫻, 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 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
14. 藤澤興, 栗原由紀子, 佐藤崇裕, 榊山櫻, 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 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
15. 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 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
16. 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年3月31日-4月1日 奈良県新公会堂(奈良県 奈良市)
17. 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年3月31日-4月1日 奈良県新公会堂(奈良県 奈良市)
 18. 今中恭子, 原万里, 浪方美幸, ポンセ デ レオン バルディビア 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. 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 国立循環器病センター図書館講堂 (大阪府 吹田市)
 19. 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年4月2-4日 第147回日本獣医学会, 総合文化センター (栃木県 宇都宮市)
 20. 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年5月7-9日 San Francisco (CA, USA)
 21. 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年5月7-9日 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年5月7-9日 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 学会 2009年6月27-28日 さいたま市(埼玉県)
 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 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 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 磐梯熱海温泉 (福島県)
 26. 今中-吉田恭子, 原万里, 浪方美幸, レオン バルディビア 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 小樽 (北海道)
 27. Ando K, Yamagishi T, Miyagawata-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年12月5-9日 San Diego (CA, USA)
 28. 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」 Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月13日 Il Ciocco Hotel & Resort (Lucca, Italy)
 29. 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.」 Gordon Research Conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration 2010年4月12日 Il Ciocco Hotel & Resort (Lucca, Italy)
 30. Rieko Asai, Yukiko Kurihara, Kou Fujisawa, Takahiro Sato, Yumiko Kawamura, Hiroki Kokubo, Kazuo Tonami, Koichi Nishiyama, Yasunobu Uchijima, Yumiko Saga, Sachiko Miyagawa-Tomita, Hiroki Kurihara. 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the crescent-forming heart field contributing to

- chamber myocardium」 Weinstein 2010 cardiovascular development conference 2010年5月21日 Royal Tropical Institute (AMSTERDAM, The Netherlands)
31. 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」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)
 32. 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」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)
 33. 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」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)
 34. 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」 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)
 35. 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」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. 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」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. 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.」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)
 38. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Hiroki Kurihara. 「Novel insight into angiogenesis: In-depth analysis through time-lapse imaging and quantification」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)
 39. 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」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)
 40. 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」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. Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Takahiro Sato, Kou Fujisawa, Sakura Kushiyama, Hiroki Kurihara. 「Transcriptional regulation of non-coding RNA Evf-2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway」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)
 42. 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」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)

43. 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」 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)
44. 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」 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)
45. Kou Fujisawa, Yukiko Kurihara, Sakura Kushiyama, 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.」 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)
46. 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.」 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)
47. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Yuichiro Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara. 「Collective endothelial cell movements driving angiogenic morphogenesis」 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)
48. 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 年 5 月 20-22 日, Amsterdam (Netherland)
49. 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 年 5 月 20-22 日, Amsterdam (Netherland)
50. 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 Development Conference, 114, 2010 年 5 月 21 日 Amsterdam (Netherland)
51. 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 年 7 月 6-8 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).
52. 中畷八隅, 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 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)
53. 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)
54. 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)
55. 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)
56. 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)
57. 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)
58. 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)
59. 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 ウェスティン朝鮮ホテル釜山 (韓国)
60. 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)
61. 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)
62. 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)
63. 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)
64. 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)
65. 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)
66. 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)
67. 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)
68. 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)

69. 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)
70. 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)
71. 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)
72. 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)
73. 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)
74. 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)
75. 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)
76. 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)
77. 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)
78. 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)
79. 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)
80. 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)
81. 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)

82. Yuichirou 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)

83. 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)

84. 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)

85. 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)

86. 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)

87. 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)

88. Yukiko Kurihara, Yasunobu Uchijima, Sakura

Kushiyama, Hiroki Kurihara 「Involvement of non-coding RNA: Evf2 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 “Biochemistry:A Short Course” (W. H. Freeman) J. L. Tymoczko, J. M. Berg, L. Stryer 著 入村達郎, 岡山博人, 清水孝雄 監訳 「ストライヤー 基礎生化学」2010 年、東京化学同人発行、720pages
2. 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. 西山功一 「NO, NOS」 pp95-97 血管生物医学事典 (日本血管生物医学学会 編), 朝倉書店 (総ページ 500) 2011
2. 西山功一 「Id」 pp375-377 血管生物医学事典 (日本血管生物医学学会 編), 朝倉書店 (総ページ 500) 2011
3. 藤沢興, 西山功一. 「エンドセリン」 pp112-113 血管生物医学事典 (日本血管生物医学学会 編), 朝倉書店 (総ページ 500) 2011
4. 有馬勇一郎, 西山功一. 「MEF2 ファミリー」 pp378-379 血管生物医学事典 (日本血管生物医学学会 編), 朝倉書店 (総ページ 500) 2011
5. 有馬勇一郎, 栗原裕基. 「壁細胞分化」 pp160-163. 血管生物医学事典 (日本血管生物医学学会 編), 朝倉書店 (総ページ 500) 2011
6. 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
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, <u>Kurihara H.</u>	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice.	<i>Am. J. Respir. Crit. Care. Med.</i>	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, <u>Kurihara H.</u> , Morin-Kensicki E M, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H.	The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass.	<i>Dev. Cell</i>	16	398-410	2009
Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, <u>Kurihara H.</u> , Wakana S, Ogura A.	A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells.	<i>PLoS ONE.</i>	4	e4943	2009
Kawamura Y, <u>Uchijima Y.</u> , Horike N, Tonami K, <u>Nishiyama K.</u> , Amano T, Asano T, <u>Kurihara Y.</u> , <u>Kurihara H.</u>	Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest.	<i>J. Clin. Invest.</i>	120	2817-2828	2010
Asai R, <u>Kurihara Y.</u> , Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, <u>Nishiyama K.</u> , Uchijima Y, <u>Miyagawa-Tomita S.</u> , <u>Kurihara H.</u>	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.	<i>Development.</i>	137	3823-3833	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, <u>Nishiyama K</u> , <u>Kurihara Y</u> , Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, <u>Kurihara H</u> .	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.	<i>J. Comp. Neurol.</i>	18	4702-4722	2010
Heude E, Bouhali K, <u>Kurihara Y</u> , <u>Kurihara H</u> , Couly G, Janvier P, Levi G.	Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i>	107	11441-11446	2010
Vieux-Rochas M, Mantero S, Heude E, Barbieri O, Astigiano S, Couly G, <u>Kurihara H</u> , Levi G, Merlo GR.	Spatio-temporal dynamics of gene expression of the Edn1-Dlx5/6 pathway during development of the lower jaw.	<i>Genesis</i>	48	262-273	2010
Gitton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, <u>Kurihara Y</u> , <u>Kurihara H</u> , Couly G, Levi G.	Evolving maps in craniofacial development.	<i>Semin. Cell. Dev. Biol</i>	21	301-308	2010
Watanabe Y, <u>Miyagawa-Tomita S</u> , Vincent DS, 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.	<i>Circ Res</i>	106	495-503 Cover Image.	2010
Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama 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, <u>Kurihara H</u> , Uchida T, Asano T.	Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity.	<i>J. Biol. Chem</i>	285	33018-33027	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, <u>Kurihara H</u> , Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T.	Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy.	<i>Diabetes Res. Clin. Pract.</i>	87	57-63	2010
Tanaka A, Itoh F, <u>Nishiyama K</u> , Takezawa T, <u>Kurihara H</u> , Itoh S, Kato M.	Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis.	<i>Blood.</i>	115	4138-4147	2010