

Inositol 1,4,5- trisphosphate receptor 2 as a novel marker of vasculature to delineate processes of cardiopulmonary development

研究分担者 山岸敬幸
慶應義塾大学医学部 小児科 教授

研究要旨

イノシトール三リン酸受容体（IP3R）は、様々な細胞に発現する細胞内カルシウムチャネルで、IP3R2型は心血管系に強く発現するサブタイプである。本研究ではIP3R2型のゲノム上にLacZ遺伝子を挿入した遺伝子組み換えマウス（IP3R2-LacZ）を肺動脈発生における平滑筋特異的のマーカースとして確立した。さらに、このIP3R2-LacZマウスを交配した先天性心疾患モデルマウスを用いて、流出路異常を特徴とする先天性心疾患である総動脈幹症の発症機序について、肺動脈基部の発生異常が原因であることを示した。

A. 研究目的

総動脈幹症などの心臓流出路の異常を特徴とする先天性心疾患には、しばしば肺動脈異常が合併して予後に影響する。したがって、肺動脈の正常発生ならびに異常発症の機序の解明が望まれるが、従来有用な肺動脈特異的のマーカースがなく、研究は進んでいない。そこで、今回、肺動脈特異的のマーカースを確立して肺動脈の発生を詳細に解析し、それを利用して総動脈幹症の発症機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

本研究で着目したイノシトール三リン酸受容体（IP3R）は、様々な細胞に発現する細胞内カルシウムチャネルで、IP3R2型は心血管系に強く発現するサブタイプである。IP3R2遺伝子のゲノム上翻訳開始領域にLacZマーカース遺伝子を挿入した遺伝子組み換えマウス（IP3R2-LacZマウス）を用いて、肺動脈の発生を解析した。また、IP3R2-LacZマウスと総動脈幹症のモデル動物であるTbx1発現低下マウスを交配し、心臓流出路の発生を解析した。

C. 研究結果

まず、IP3R2-LacZの胎生期の発現様式を検討で、肺内肺動脈でLacZは中膜の α SMA陽性細胞に発現し、平滑筋細胞に特異的だった。LacZ陽性の肺動脈平滑筋が、胎生13.5から18.5日にかけて中枢から末梢への血管の伸長にしたがって形成される様子が観察された。次に心臓流出路では、LacZは大動脈基部の内膜と中膜、および肺動脈基部の内膜に強く発現し、肺動脈基部の中膜では発現が弱かった。よって、大動脈基部と肺動脈基部を区別する分子マーカースとして利用できると考えられた。そこで、Tbx1発現低下マウスとIP3R2-LacZマウスを交配して胎子を観察したところ、Tbx1発現低下マウスの総動脈幹基部ではLacZが内膜と中膜に全周性に強く発現しており、LacZが弱く発現する肺動脈基部の成分が欠如していることが示唆された。さらに出生直前のTbx1発現低下マウス胎子では、肺容量が小さく、肺動脈は末梢まで形成されるが、肺間質の未熟な細胞の数が増加し、肺上皮の成熟が遅れていた。

D. 考察

以上の結果より、肺動脈の発生様式について、これまで諸説ある中で、内皮マーカースの分析により提唱された“distal angiogenesis 仮説”を支持する結果が得られた。また、Tbx1発現低下マウスの総動脈幹症は、

肺動脈基部心筋・平滑筋層を形成する Tbx1 発現細胞が障害され、肺動脈基部の無ないし低形成により発症すると考えられた。さらに、肺発生を制御する候補遺伝子の発現解析により、Tbx1 発現低下マウスの肺の成熟障害に、増殖因子 Fgf10 の発現異常が関与する可能性が示唆された。

E. 結論

IP3R2-LacZ は肺動脈平滑筋に発現する特異的分子マーカーとして肺動脈の正常発生ならびに発生異常の解析に有用であり、先天性心疾患モデルマウスを用いた疾患表現型の検討ならびに疾患発症機構の解明に応用できることが示された。

F. 研究発表

1. 論文

Ishizaki-Asami R, Uchida K, Tsuchihashi T, Shibata A, Kodo K, Emoto K, Mikoshiba K, Takahashi T, Yamagishi H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 2 as a novel marker of vasculature to delineate processes of cardiopulmonary development. *Dev Biol* 2020;458:237-245.

研究成果の一部は、KOMPAS「慶應発サイエンス」に掲載された。

http://kompas.hosp.keio.ac.jp/contents/medical_info/science/202004.html



Original research article

Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 2 as a novel marker of vasculature to delineate processes of cardiopulmonary development

Reina Ishizaki-Asami^a, Keiko Uchida^{a,b,**}, Takatoshi Tsuchihashi^{a,c}, Akimichi Shibata^{a,d}, Kazuki Kodo^a, Katsura Emoto^e, Katsuhiko Mikoshiba^{f,g,h}, Takao Takahashi^a, Hiroyuki Yamagishi^{a,*}

^a Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan

^b Health Center, Keio University, 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, 223-8521, Japan

^c Department of Pediatrics, Kawasaki Municipal Hospital, 12-1 Shinkawadōri, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa, 210-0013, Japan

^d Department of Pediatrics, Japanese Red Cross Ashikaga Hospital, 284-1 Yobe-cho, Ashikaga, Tochigi, 326-0843, Japan

^e Division of Diagnostic Pathology, Keio University Hospital, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan

^f SIAIS (Shanghai Institute for Advanced Immunochemical Studies), ShanghaiTech University, 393 Middle Huaxia Road, Shanghai, 201210, China

^g Toho University, Faculty of Science, Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan

^h Laboratory for Developmental Neurobiology, Center for Brain Sciences, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Inositol trisphosphate receptor type 2
Pulmonary artery
Lung
Persistent truncus arteriosus
Tbx1

ABSTRACT

Congenital heart diseases (CHDs) involving the outflow tract (OFT), such as persistent truncus arteriosus (PTA), lead to mortality and morbidity with implications not only in the heart, but also in the pulmonary vasculature. The mechanisms of pulmonary artery (PA) development and the etiologies underlying PA disorders associated with CHD remain poorly understood partly because of a specific marker for PA development is nonexistent. The three subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃R1, 2, and 3) are intracellular Ca²⁺ channels that are essential for many tissues and organs. We discovered that IP₃R2 was expressed in the vasculature and heart during development using transgenic mice, in which a LacZ marker gene was knocked into the IP₃R2 locus. Whole-mount and section LacZ staining showed that IP₃R2-LacZ-positive cells were detectable exclusively in the smooth muscle cells, or tunica media, of PA, merging into αSMA-positive cells during development. Furthermore, our analyses suggested that IP₃R2-LacZ positive PA smooth muscle layers gradually elongate from the central PA to the peripheral PAs from E13.5 to E18.5, supporting the distal angiogenesis theory for the development of PA, whereas IP₃R2-LacZ was rarely expressed in smooth muscle cells in the pulmonary trunk. Crossing IP₃R-LacZ mice with mice hypomorphic for Tbx1 alleles revealed that PTA of Tbx1 mutants may result from agenesis or hypoplasia of the pulmonary trunk; thus, the left and right central to peripheral PAs connect directly to the dorsal side of the truncus arteriosus in these mutants. Additionally, we found hypercellular interstitial mesenchyme and delayed maturation of the lung endoderm in the Tbx1 mutant lungs. Our study identifies IP₃R2 as a novel marker for clear visualization of PA during development and can be utilized for studying cardiopulmonary development and disease.

1. Introduction

Congenital heart disease (CHD) is the most common cause of infant deaths resulting from birth defects; 22.0% of infants who died of a birth defect had a heart defect (Benjamin et al., 2019). Pulmonary artery (PA) diseases and airway abnormalities can be present in up to 5–10% of patients born with CHD. The development of PA is an important

determinant of surgical indications and clinical treatment for CHD; however, precise mechanisms of PA development and the etiologies underlying PA diseases with CHD remain poorly understood, partly because a specific marker for PAs is nonexistent.

Lung development has been well studied in mice. It begins at embryonic day 9, or E9.0 and proceeds to the embryonic stage (E9.0–E9.5), pseudoglandular stage (E9.5–E16.5), canalicular stage (E16.5–E17.5),

* Corresponding author. Division of Pediatric Cardiology, Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

** Corresponding author. Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.
E-mail addresses: keiuchid@keio.jp (K. Uchida), hyamag@keio.jp (H. Yamagishi).

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.11.011>

Received 9 August 2019; Received in revised form 14 November 2019; Accepted 19 November 2019

Available online 20 November 2019

0012-1606/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

