

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08469

研究課題名(和文) 心臓の心室筋の分化・成熟のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of maturation and differentiation of the heart cells during development

研究代表者

鯉淵 信孝 (Koibuchi, Nobutaka)

大阪大学・医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：30456131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Hey2は心臓の心室に特異的に発現している転写因子である。申請者を含む内外の研究により、心室筋の分化・成熟を支配しており、心臓の正常な形成に必要な遺伝子の一つであることが明らかとなっている。しかしHey2単独では、心室筋の分化・成熟を保證するマスター遺伝子としての機能はない。つまりHey2の生理活性を調整している他の転写因子群の存在が予想される。本研究でHey2と協調して作用する可能性のある転写因子を見出した。また、その遺伝子の胎生期における心臓での発現パターンを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究により、Hey2遺伝子の変異はブルガタ症候群(元気だった成人が、突然心臓が停止してしまい死にいたる病気で、古くは「ぼっくり病」と呼ばれていた)の発症に強い関連性があることが明らかとされた。それらの研究から、ブルガタ症候群は成人で発症することが多いのだが、実は先天性心疾患の一つであって、すでに胎生期の心臓でHey2に関連した転写因子による遺伝子発現調節機構の異常が起こっており、それが発症原因であるとも指摘されている。本研究の成果により原因不明なブルガタ症候群の発症機序の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Hey2 (hairy and enhancer of split-related with YRPW motif 2) is reported to play potential roles in ventricular maturation during heart development. However, the underlying mechanism is remained unknown. To identify potential mechanisms by which Hey2 affects myocardial development, we performed a systematic analysis of regional myocardial gene expression. We identified the transcriptional factor that is associated with Hey2.

研究分野：発生学

キーワード：心臓 心室 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

心臓は血液を体中に循環させるポンプの役目を果たす重要な器官であり、心臓の機能の破綻は生命の危機に直結する。しかし心臓の形成機構は複雑である。事実、先天性心疾患はもっとも頻度の高い先天性奇形であり、新生児の約1%は心臓に何らかの異常を持って生まれてくる。先天性心疾患の原因遺伝子の多くが転写因子であることから、心臓の発生過程では転写因子による遺伝子発現調節機構が大きな役割をはたしていると考えられている。一方、循環器の3大疾患である不整脈、心不全、心筋梗塞は死亡のリスクの高い心臓の疾患であるだけでなく、たとえ一命をとりとめたとしても心臓組織の損傷の回復はほぼ望めず、再発のリスクを抱えたままの生活を強いられる。近年注目されている抜本的な治療として、幹細胞や iPS 細胞を使った再生医療があるが、その基盤的研究として発生過程の心筋の分化メカニズムの解明のための分子生物学的、遺伝子工学的研究が必要である。特に心筋特異的に発現する転写因子の役割を理解することは最も重要な課題であると考ええる。

Hey2 は helix-loop-helix ドメインを有する転写因子であり、発生過程においては心臓の心室に特異的に発現している。申請者は遺伝子改変マウスを用いて Hey2 の心臓形成に対する役割を検討してきた。Hey2 遺伝子欠損マウスは、心室中核隔欠損、心室の菲薄化などの心室の奇形により生後7日以内に死亡する。さらに、Hey2 遺伝子欠損マウスの心室では形態のみならず、遺伝子発現にも異常があった。発生初期(妊娠12.5日後)の野生型マウスの心室では、後に心房に特異的に発現する遺伝子群(ANP、Cx40、Tbx5 など)も発現しているが、発生が進むに伴ってそれらの遺伝子群の発現は心室で消失していき、心房のみと限定されていく。しかし、Hey2 遺伝子欠損マウスの心室では、心房特異的遺伝子の発現の低下が見られず、心室および心房両方の性質をもった未成熟な細胞となっていた。以上のことは、Hey2 は心室から心房の性質を取り除き、心室筋の正常な分化・成熟に関与していることを示している。

しかしながら、Hey2 単独では、心室筋の正常な分化・成熟を保證するマスター遺伝子としての機能はないと考えられていた。つまり Hey2 の生理活性を調整している他の転写因子群の存在が予想されると考えられていた。

## 2. 研究の目的

本研究の期間内に Hey2 と会合し協調して働く新たな転写因子を同定し、その発現分布、作用機序、心房特異的に発現する遺伝子群に対する転写活性を明らかとする。さらに Hey2 と共に本研究で同定した遺伝子の改変細胞や動物を作成し、発生期の心室の分化にどのような影響が出るのかを検討する。それらの検討により、心室筋の分化・成熟のメカニズムの解明を目指すことである。

## 3. 研究の方法

心室で心房特異的な遺伝子の消失は妊娠13.5日後から始まる、つまり本研究目的の遺伝

子は妊娠 13.5 日後の心室から発現し始めることが予想される。そこで妊娠 12.5 日後、妊娠 14.5 日後の時期の心室から mRNA を抽出し、それらを DNA Chip の解析を行うことによって、妊娠 13.5 日後から上昇している遺伝子の探索を行った。

- (1) DNA Chip のデータをもとに、発現の上昇が特に高い遺伝子に注目し、realtime PCR を行い、実際に遺伝子の上昇があるのかを確認した。
- (2) 上述の realtime PCR で発現の上昇の確認が取れた遺伝子の発現パターンを *n situ hybridization* を行い検討した。
- (3) 胚の心室筋を取り出し、酵素処理により単一細胞にした後、細胞培養を行った。その後、発現が高かった遺伝子を培養細胞に導入して、遺伝子を強発現させた。2 日後にそれらの培養細胞から mRNA を抽出し、房に特異的に発現する遺伝子群 (ANP、Cx40、Tbx5) の発現の変化を検討した。

#### 4 . 研究成果

- (1) DNA Chip のデータから、発現の上昇が特に高い遺伝子に注目し、realtime PCR を行い、実際に遺伝子の上昇があるのかを確認した。その際、妊娠 12.5 日後、妊娠 13.5 日後、妊娠 14.5 日後、妊娠 15.5 日後と様々な時期の心臓の心室から mRNA を抽出し、realtime PCR を行った。その結果、妊娠 13.5 日後の心室から上昇が始まる遺伝子を複数見出した。
- (2) それらの遺伝子の心臓での発現パターンを *in situ hybridization* で検討した。その際、特に心室において心室特異的遺伝子の消失時期および位置の一致がみられるのかという点を重点的に検討を行った。その結果、消失時期および位置の一致がみられる遺伝子が見つかった。
- (3) 上記の検討で見つかった遺伝子を心臓の細胞に導入し、発生期の心室の分化にどのような影響が出るのかを検討した。その結果、遺伝子が導入された細胞では、心房に特異的に発現する遺伝子群 (ANP、Cx40、Tbx5 など) の発現が抑えられることを見つけた。

以上より、Hey2 と会合し協調して働く新たな転写因子を同定することができ、さらにその発現分布および心房特異的に発現する遺伝子群に対する転写活性を明らかにした。それら結果は、さらなる心室筋の分化・成熟のメカニズムの解明につながることを期待されると思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sanada F, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Koibuchi N, Uchida K, Taniyama Y, Yoshimura S, Rakugi H, Morishita R.	4. 巻 7
2. 論文標題 Local Production of Activated Factor X in Atherosclerotic Plaque Induced Vascular Smooth Muscle Cell Senescence.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-17508-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takane K, Hasegawa Y, Lin B, Koibuchi N, Cao C, Yokoo T, Kim-Mitsuyama S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Detrimental Effects of Centrally Administered Angiotensin II are Enhanced in a Mouse Model of Alzheimer Disease Independently of Blood Pressure.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e004897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.116.004897.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kusaka H, Koibuchi N, Hasegawa Y, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cardiovasc Diabetol.	6. 最初と最後の頁 157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Lin B, Hasegawa Y, Takane K, Koibuchi N, Cao C, Kim-Mitsuyama S.	4. 巻 5
2. 論文標題 High-Fat-Diet Intake Enhances Cerebral Amyloid Angiopathy and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, Independently of Metabolic Disorders.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e003154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.115.003154.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 雅裕  (Yamaguchi Masahiro)  (00360660)	鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・准教授    (54101)	