

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21500397

研究課題名（和文） Nkx2-5 遺伝子変異を持つ疾患モデルマウスの評価

研究課題名（英文） The assessment of mice carrying modified Nkx2-5 gene as animal models for cardiovascular disease

研究代表者

荒井 勇二（ARAI YUJI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生物学部・室長

研究者番号：30202724

研究成果の概要（和文）：200 字程度

Nkx2-5 遺伝子は心臓で発現しているホメオボックス遺伝子で、ヒトでは変異に伴う心臓疾患が知られている。マウスの Nkx2-5 遺伝子の完全な破壊は胎生致死となり、ヒトの疾患モデルを再現できない。本研究では Cre リコンビナーゼ依存的な Nkx2-5 遺伝子破壊マウスと Cre 遺伝子を心臓の時期特異的に発現するマウスとの交配により、胎生致死を回避し、房室ブロック、心肥大を伴うヒト疾患モデルを得た。このマウスでは、Nkx2-5 遺伝子の機能低下に伴い、心臓の伝導系の形成不全が起こり、その程度に比例して心肥大の程度の増加が引き起こされていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Human mutation in *Nkx2-5*, a cardiac homeobox gene, predominantly function in a dominant-negative fashion and cause a diverse set of congenital heart malformations that include septal defects, cardiomyopathy, outflow tract defects, hypoplastic left heart, and associated arrhythmias. Mice that harbor a complete global knockout of Nkx2-5 display early embryonic lethality and defects in cardiac looping morphogenesis, consistent with a role for Nkx2-5 in the early stages of cardiogenesis. To delineate the molecular mechanisms that link the loss of Nkx2-5 with cardiac disease phenotypes observed in human, we have produced Cre-recombinase-mediated deletion mice, *Nkx2-5* floxed allele mice, that escape the early, complete lethality found in the global knockout mice. *Nkx2-5* floxed allele mice were crossed with the heart-specific cre recombinase transgenic lines such as myosin light chain-2v cre and  $\alpha$  myosin heavy chain cre. Mice with heart-restricted knockout of Nkx2-5 display no structural effects but have progressive complete heart block and heart enlargement found in some patients with *Nkx2-5* mutations. In these mice, the reduction of Nkx2-5 expression level results in hypoplasia of the conduction system and enlargement of heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝子改変・Nkx2-5・疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

Nkx2-5 は心臓の発生に不可欠なホメオボックス遺伝子である。この遺伝子の発現レベルは重要であり、一つの遺伝子座が不活性となっても心臓の発生に異常をきたすことが明らかにされている。また、この遺伝子は個体発生において最初は心臓に発現するが、その後、鰓弓、脾臓、胃、舌での発現があり、これらの器官形成においても重要な役割を担っている。

Nkx2-5 遺伝子の機能解明のためにノックアウトマウスはすでに作成されている。しかしながら、このホモマウスは9日目に心臓のルーピングが出来なくなり、胎生致死となる。一方、Nkx2-5 遺伝子は成体でも発現があり、このノックアウトマウスでは成体におけるこの遺伝子の役割は明らかにすることが出来なかった。ヒトにおいてはこの遺伝子の異常は心房や心室の中隔欠損、或いは、伝導系の異常により突然死を引き起こすことが明らかにされている。

2. 研究の目的

胎生致死を回避する疾患モデルマウスを作成し、成体の心臓での Nkx2-5 遺伝子の役割をあきらかにすること、その他の Nkx2-5 遺伝子を発現している組織での機能解明、ヒトでの先天的な Nkx2-5 変異により起こ

る心臓異常のモデルとしての有用性について検討する。また、その解析法の含め、新たな方法の開発を行う。

3. 研究の方法

マウスの Nkx2-5 遺伝子を3種類の遺伝子構築 (図1) を用いて改変した。これらの遺伝子改変と心臓機能への影響を明らかにする。また、Cre-loxP を用いた条件付遺伝子破壊マウスについては、時期特異的・空間特異的な Cre 発現マウスとの交配により、Nkx2-5 遺伝子発現組織への影響を調べる。心臓の伝導系ではナトリウム利尿ペプチドが発現していることを利用し、末梢伝導系の形成状況を解析できるシステムを構築する。それと同時にヒトの疾患モデルとしての有用性について検討を行う。

4. 研究成果

Nkx2-5 遺伝子機能解析のために3種類の遺伝子構築 (図1) を用い、マウスの Nkx2-5 遺伝子を改変した。

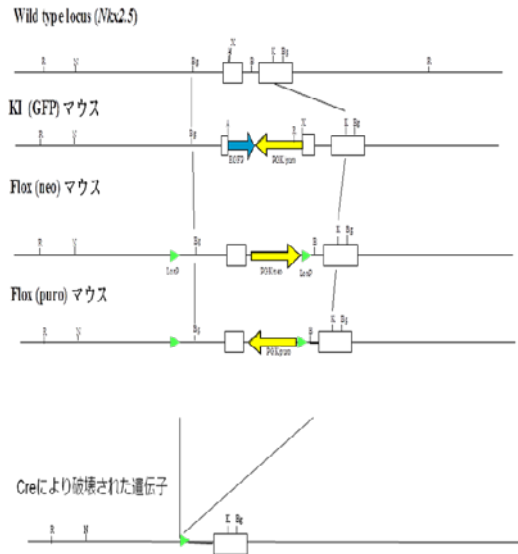


図1. 遺伝子改変用構築とCreにより破壊された遺伝子

ノックイン構築ではGFPは心臓、鰓弓など本来のNkx2-5の発現部位で発現が認められ(図2)、ホモマウスは9.5日から10.5日で心臓形成の際のルーピングができずに胎生致死となった。このマウスはヘテロでは野生型と差は認められず、Nkx2-5遺伝子発現状態、発現細胞の追跡などに有用であると考えられた。



図2. ノックインマウス9.5日胚でのGFPの発現

条件付遺伝子破壊については、本研究の構築とは幾分異なるFlox(neo)の報告はなされている。その報告ではneoを挿入することにより、異常スプライシングが起こり、矮小遺伝子座(hypomorphic allele)に変わり、著しい遺伝子機能の低下が起こり、ホモマウスはノックアウトマウス同様に胎生致死となってしまう成体での機能解明が出来ていな

い。本研究で作成したFlox(neo)でも確かに異常スプライシングも認められ、変異遺伝子は機能低下を起こし、矮小遺伝子座となっていた。しかしながら、その機能低下の程度は報告された変異遺伝子よりも弱いらしく、マウスはすべてが胎生致死とならずに生まれてきたが、その多くは5~6週令で突然死した。突然死の原因は心臓の伝導系に異常が認められ、ヒトの疾患モデルとしても興味深いものであると考えられた。また、ホモマウスでは口蓋周囲の発生異常をきたし不正咬合、脾臓の形成不全が認められた。これは鰓弓、脾臓でのNkx2-5遺伝子発現低下に伴う影響であると考えられる。また、不正咬合の影響と思われる、成長遅延が認められた。

一方、Flox(puro)のホモマウスはメンデルの法則に従って得ることができ、突然死、不正咬合、成長遅延も認められず、Flox(puro)を用いることでNkx2-5遺伝子の成体における機能解明を行えると考えられた。が、脾臓の形成不全はFlox(neo)と同様に認められた。これは上流のloxPの挿入位置に問題があり、転写因子のGATA-1結合配列を破壊しているため、脾臓特異的に発現レベルの低下が認められたためであると考えられた。条件付Nkx2-5遺伝子破壊マウスで遺伝子破壊を行った場合には、心臓の肥大と伝導障害(完全房室ブロック)起こることが明らかになった。完全房室ブロックの原因として伝導系の萎縮が起こっていることが考えられた。

伝導系の形成状態を容易に調べる方法がなかったため、解析系の開発を行った。心臓の伝導系では心房性ナトリウムペプチド(ANP)が発現している。この伝導系内のANPを測定できれば、心室での伝導系の形成状態を定量化できると考えられる。しかしながら、ANPは分泌タンパク質であることや発現量から伝導系内の測定は難しいと考え、ANPのプ

ロモーターの下流にモニター遺伝子を繋ぎ、モニター遺伝子を伝導系特異的に大量に発現するトランスジェニックマウスを作ることによって解決を図った。モニター遺伝子としてβガラクトシダーゼ遺伝子を用い、伝導系特異的にβガラクトシダーゼを発現するトランスジェニックマウス (ANP-lacZ マウス) を作成した (図3)。この ANP-lacZ マウスと種々の Nkx2-5 遺伝子改変マウスとを交配し、それらのマウスのβガラクトシダーゼの全タンパク質に対する比活性を測定したところ、その値は遺伝子型とよく一致していた。また、これらのマウスに於ける伝導系の形成不全の程度は、体重比で見た心臓の肥大の程度と非常に良く相関しており、伝導系の障害と心臓肥大が良く相関していることが明らかになった。ヒトに於いても、不整脈や心筋症を含む心疾患に於いて伝導系の異常が知られており、伝導系の異常から引き起こされる心臓肥大を解明するための良いモデルとなることが明らかとなった。また、ANP-lacZ マウスはモデル動物での伝導系の形成状態を容易に定量化するための有用なマウスと考えられる。

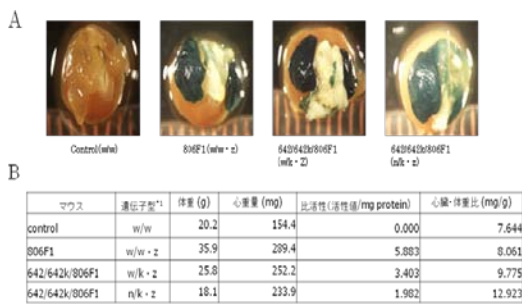


図3. 心房のβ-ガラクトシダーゼ染色と心室のβ-ガラクトシダーゼ比活性及び心臓・体重比。

\*1: w: 野生型 Nkx2.5; n: Flox-neo Nkx2.5; k: 遺伝子破壊 Nkx2.5; z: ANP-lacZ Tg

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

荒井勇二 Nkx2-5 遺伝子改変による疾患モ

デル動物作成 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 8 日 神戸国際展示場 (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

[http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/bio-science/bs\\_005.html](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/bio-science/bs_005.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒井 勇二 (ARAI YUJI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生物学部・室長

研究者番号: 30202724

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: