

平成 23 年 5 月 27 日現在

機関番号 : 24601

研究種目 : 若手研究 B

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790194

研究課題名 (和文) 発生工学を用いた心奇形発症メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Investigation of the mechanisms of congenital heart defects using developmental engineering.

研究代表者

坂部 正英 (Sakabe Masahide)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00525983

研究成果の概要 (和文) :

ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸は催奇形因子として知られている。我々のグループは妊娠マウスの特定期間にレチノイン酸を投与すると、胎仔がヒト大血管転位症に似た表現型を示すことを報告した。しかし、そのメカニズムは不明であった。本研究では遺伝子工学および発生工学を用いた解析により、レチノイン酸処理胚での *Tbx2* の発現が低下し、この発現制御がレチノイン酸シグナルによる直接的な抑制であることを見出した。また、*Tbx2* は心内膜床形成に必須の液性因子である *Tgfβ2* の発現を誘導し、この *Tbx2-Tgfβ2* カスケードの異常がレチノイン酸誘導性大血管転位症を発症させる要因の 1 つであることを示した。

研究成果の概要 (英文) :

A high concentration of maternal retinoic acid (RA), the active derivative of vitamin A, is well known as a teratogenic agent, and induces several developmental abnormalities. Our previous studies have shown that maternal administration of RA to mice within a narrow developmental window induces outflow tract (OFT) septum defect, which closely resembles human transposition of the great arteries (TGA), although the responsible factors and pathogenic mechanisms of TGA induced by RA remained unknown. We herein demonstrate that the expression of *Tbx2* in the OFT myocardium is responsive to RA and its down-regulation is the main cause of abnormal OFT septation. We found that RA could directly down-regulate *Tbx2* expression through a functional retinoic acid response element (RARE) in the *Tbx2* promoter region, which is also required for the initiation of the *Tbx2* transcription during OFT development. *Tgfβ2* expression was also down-regulated in the RA treated OFT region and up-regulated by *Tbx2* in a culture system. Moreover, defective EMT caused by an excess RA was rescued by the addition of *Tgfβ2* using an organ culture system. These data suggest that RA signaling participates in the *Tbx2* transcriptional mechanism during OFT development, and the *Tbx2-Tgfβ2* cascade is a key pathway in the RA-induced TGA phenotype.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：先天異常学・奇形学

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 先天性心疾患に関わる心内膜床形成とその形成メカニズム

現在、先天性心疾患は、生産児の約 0.5～1%に発症するといわれており、その多くが心房・心室中隔欠損や弁の形成異常による疾患である。心臓の発生過程において、房室管と流出路に形成される心内膜床は、心臓弁や中隔の原基となり、この心内膜床の形成不全により、房室中隔欠損や大血管転位などの先天性心疾患が引き起こされると考えられている。したがって、先天性心疾患の予防や治療戦略の開発には心内膜床形成における分子メカニズムを明らかにすることが重要である。

これまでの研究により、心内膜床は房室管と流出路の心臓内皮細胞が間葉細胞に形質転換して形成される一対の隆起であることが知られている。この内皮-間葉形質転換(EMT)は心臓内皮細胞が心筋細胞由来の液性因子により活性化されることで誘発されることが知られている。近年、この液性因子のひとつが骨形成因子(BMP)であり、内皮細胞由来の形質転換成長因子(TGFβ)と協調的に作用していることが明らかにされた。しかし、これらの成長因子以外にも様々な遺伝子が心内膜床に発現し、内皮-間葉形質転換に関わっていることが判明しており、心内膜床形成における内皮-間葉形質転換を制御する分子メカニズムには複雑なシグナル伝達カスケードが存在していることが示唆されている(Sakabe et al., 2005)。

### 2) 心内膜床形成不全と大血管転位

上述のように、心臓弁や中隔の原基である心内膜床の形成不全は、様々な先天性心疾患を引き起こす原因となるが、そのうちのひとつに大血管転位症がある。大血管転位は、右心室から大動脈が、左心室から肺動脈が起始する形態を持ち、大動脈と肺動脈が入れ替わった関係を持つ。これまでに大血管転位の発

生学的根拠を説明するために多くの試みがなされてきたが、現在でもその原因はまだ不明である。近年の報告では、東京女子医大のグループが、ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸が心臓形成の催奇形因子であることに注目し、ある特定の時期の妊娠マウスにレチノイン酸を投与することで、胎児が大血管転位を発症するモデルを開発した(Yasui et al., 1995)。また、このマウス胚において、流出路心内膜床の内皮-間葉形質転換が阻害されていたことから、大血管転位は心内膜床の低形成により発症することが強く示唆されている(Nakajima et al., 1996)。しかしながら、レチノイン酸が心内膜床形成不全を引き起こすメカニズムはまだ不明である。

## 2. 研究の目的

妊娠マウスに過剰なレチノイン酸を投与すると、心内膜床形成が低形成になり、大血管転位が引き起こされる。したがって、i) 大血管転位を引き起こす原因遺伝子の発現は、レチノイン酸の制御を受けること、ii) この原因遺伝子は心内膜床形成に関与することが考えられる。そこで、本研究では、レチノイン酸による大血管転位発症の発生学的分子メカニズムを遺伝子発現制御に焦点をあてて解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

生物の発生過程において、レチノイン酸は多くの遺伝子の発現を制御していることが報告されており、重要な形態形成因子として知られている。しかし、妊娠マウスへのレチノイン酸過剰投与は胎児に奇形を誘発することから、催奇形因子としても知られている。本研究では、レチノイン酸を用いた大血管転位モデルを使用し、大血管転位発症のメカニズムを遺伝子発現制御に焦点をあてて解析する。

本研究で行う方法、及び研究の流れについて以下に示す。

① 正常マウス胚および大血管転位マウス

胚を用いたマイクロアレイ解析

②In situ hybridization およびレポーターマウスを用いた候補遺伝子の発現変化の確認

③候補遺伝子のプロモーター解析 (in vitro, in vivo 実験)

④3次元流出路培養モデルを用いた機能回復実験

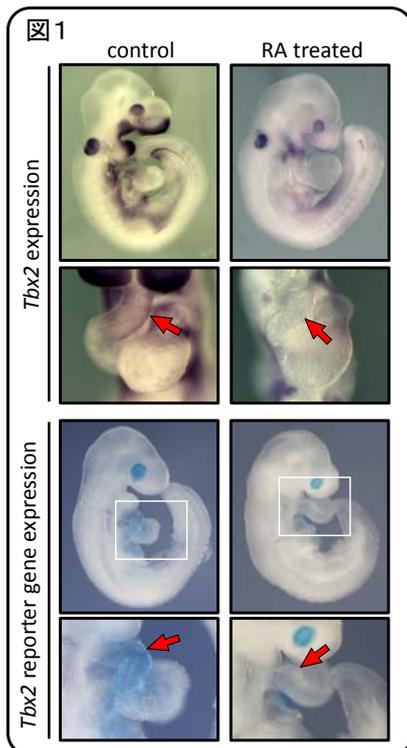
#### 4. 研究成果

①大血管転位マウスを用いたマイクロアレイ解析

大血管転位発症の原因遺伝子を探るために、レチノイン酸によって誘導された大血管転位マウス胚を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、心内膜床形成に重要とされる T-box 遺伝子の減少が認められた。中でも、Tbx2 の発現低下が著しかったため、以降の実験は Tbx2 の発現および作用について検討を行った。

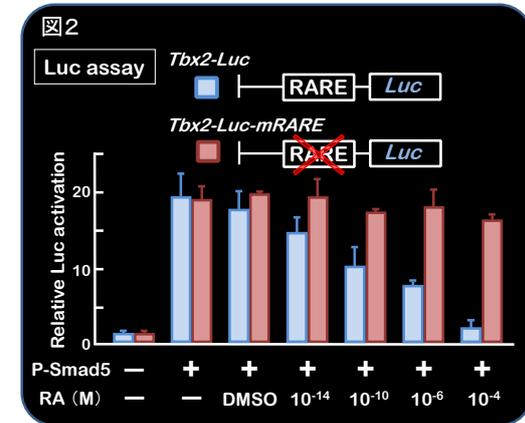
②In situ hybridization およびレポーターマウスを用いた Tbx2 発現変化の検討

マイクロアレイの結果より、レチノイン酸処理したマウスでは Tbx2 の発現が低下していることが示唆された。この現象を明らかにするために、in situ hybridization およびレポーターマウスを用いた Tbx2 発現解析を行った。その結果、野生型マウスでは流出路領域に Tbx2 の発現および転写活性が認められたのに対し、レチノイン酸処理マウスでは、その発現が認められなかった (図1)。



③Tbx2 のプロモーター解析

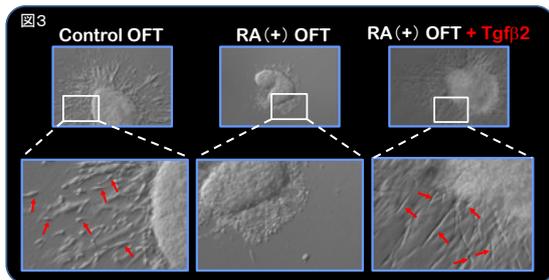
上述の遺伝子発現解析の結果より、流出路における Tbx2 の発現は、レチノイン酸処理によって抑制されることが示唆された。そこで、この発現抑制がレチノイン酸シグナルによって直接抑制されているのかを検討するために、in silico にて Tbx2 プロモーター解析を行った。その結果、Tbx2 プロモーター領域にはレチノイン酸応答に必須である RARE ドメインが存在することが分かった。次に、この RARE ドメインが機能的であるかを調べるために、Luciferase (Luc) assay を用いた解析を行った。その結果、Tbx2 の転写活性は、レチノイン酸によって阻害され、RARE ドメインに変異を入れたプロモーターでは、レチノイン酸による転写活性阻害を受けなかった (図2)。このことから、レチノイン酸シグナルは直接的に Tbx2 の発現を抑制していることが明らかになった。



④3次元流出路培養モデルを用いた機能回復実験

これまでの実験により、流出路領域における Tbx2 の発現がレチノイン酸によって抑制され、この現象が流出路心内膜床形成を阻害している原因であることが示唆された。しかし、Tbx2 は心筋に発現する転写調節因子であるため、内皮細胞で起きる EMT を制御するには、心筋から分泌される液性因子を介する必要がある。そこで、流出路心筋に発現する液性因子の発現を調べたところ、Tgfβ2 の発現が低下していることがわかった。この Tgfβ2 の発現は Tbx2 によって制御されていることを Luc assay で確認したのち、3次元流出路培養モデルを用いて、Tgfβ2 の機能回復実験を行った。その結果、レチノイン酸処理した流出路外植片では EMT が認められなかったのに対し、Tgfβ2 を添加した外植片では EMT を起こした間葉細胞が認められた (図3)。したがって、Tbx2-Tgfβ2 カスケードは心内膜床形成に重要であり、このカスケードの異常

が TGA を引き起こすことが示唆された。



## 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)

Sakabe M., Nakajima Y., Kokubo H., Saga Y. High levels of maternal retinoic acid induce the transposition of great arteries (TGA) by suppressing the Tbx2-Tgfβ2 pathway during outflow cushion formation. (*Development* 誌に投稿・改訂中)

[学会発表] (計 4 件)

1. 坂部正英, 中島裕司, 小久保博樹, 相賀裕美子. T-box transcription factor Tbx2 is a key factor in the pathogenesis of congenital heart diseases including transposition of great

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab2/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

arteries. 第 33 回日本分子生物学会 ワークショップ. 神戸, 12 月 10 日, 2010.

2. Sakabe M., Nakajima Y, Kokubo H, Saga Y. Ectopic retinoic acid signaling induces transposition of great arteries (TGA) via suppressing Tbx2 expression during outflow cushion formation. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism CVEM 2010, Nara, March 31-April 1, 2010.
3. 坂部正英, 中島裕司, 小久保博樹, 相賀裕美子. Ectopic retinoic acid signaling induces transposition of great arteries (TGA) via suppressing Tbx2 expression during outflow cushion formation. 第 32 回日本分子生物学会, 横浜, 12 月 9~12 日, 2009.
4. 坂部正英, 中島裕司, 小久保博樹, 相賀裕美子. レチノイン酸が引き起こす大血管転位発症メカニズムの解明. 第 8 回心臓血管発生研究会, 福島, 7 月 24~25 日, 2009.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

坂部 正英 (Sakabe Masahide)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00525983

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: