

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390211

研究課題名（和文） 心臓流出路を形成する細胞の発生分化と相互作用を制御する分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying development and interaction of progenitor cells essential for cardiac outflow tract morphogenesis

研究代表者

山岸 敬幸 (YAMAGISHI HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40255500

研究成果の概要（和文）：

心臓流出路の発生には、おもに二次心臓領域と心臓神経堤由来の 2 種類の心臓前駆細胞の働きが必須であるが、これらの細胞の相互作用によって正常な流出路が形成される機序はいまだ明確でない。私たちは、二次心臓領域に発現し、心臓神経堤細胞の遊走に關与する神経血管誘導因子・Sema3C の発現制御機構を明らかにすることにより、流出路発生における両細胞間相互作用に關与する分子機構を解明した。Sema3C の enhancer に lacZ 遺伝子を連結・導入した transgenic マウスの解析と ChIP および luciferase assay を組み合わせ、Sema3C の上流直接活性化因子として Foxc1/c2 を、上流抑制因子として Tbx1 を特定した。遺伝子改変マウスの解析によって、Tbx1 の発現低下により Sema3C が神経堤細胞に異所性に発現し、その遊走を障害することが示唆された。さらに両細胞間相互作用を担う候補タンパクの検討により、Tbx1 の Sema3C 抑制機構は、心臓神経堤細胞において分泌因子 Fgf8 を介することが推定された。

研究成果の概要（英文）：

Two progenitor cell lineages, the cardiac neural crest cells (cNCCs) and the second heart field (SHF), play key roles in development of the cardiac outflow tract (OFT), and their interaction is essential for establishment of completely separated pulmonary and systemic circulation in vertebrates. However, a detail of their interaction was not clarified yet. Neurovascular guiding molecule, Semaphorin 3C (Sema3C) is one of the candidate factors which is essential for interaction between cNCCs and the SHF during development of the OFT. In pharyngeal arch region, Tbx1 negatively regulate Sema3C expression in cNCCs via Fgf8 signaling. Foxc1/c2 activate Sema3C expression in the OFT and pharyngeal mesoderm and orchestrate it with negative regulation by Tbx1. Loss of Fgf8 activity in pharyngeal region leads to an ectopic activation of Sema3C in cNCCs resulting in their migration defect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器学

## 1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は、出生 1000 人につき 5~10 人におこる最も頻度の高い先天異常の一つであり、心臓発生の異常に起因する。高等動物の心臓発生は、時間的、空間的に秩序だった複雑な過程によって成立する。最近 10 年間の心臓発生研究の成果として、心臓の各領域の発生にはいくつかの由来の異なる前駆細胞が協調的に働き、転写因子、増殖因子などをコードする多くの遺伝子が関与することが判明してきた。特に心臓流出路と大血管の発生には、側板中胚葉細胞以外に心臓神経堤細胞と二次心臓領域細胞と呼ばれる心臓前駆細胞が関与することが判明した (Waldo et al. Development 2001; Kelly et al. Dev Cell 2001)。原始心筒が looping する頃、その背側にある咽頭弓臓側中胚葉に由来する二次心臓領域細胞が心臓へ流入し、流出路心筋・平滑筋に分化する。さらに、神経管 (外胚葉) 背側に起源する間葉系細胞である心臓神経堤細胞が流出路まで移動・分布し、流出路中隔が形成される。私たちは、転写因子 Tbx1 が二次心臓領域に発現し、Fox 転写因子の制御を受け、線維芽細胞増殖因子 Fgf8/10 を介して、心臓流出路の発生に機能することなどを解明してきた (Yamagishi et al. Genes Dev 2003; Yamagishi & Srivastava Trends Mol Med 2003; Hu, Yamagishi et al. Development 2004; Maeda, Yamagishi et al. Dev Dyn 2006)。TBX1 は、心臓流出路異常を高率に合併する 22q11.2 微細欠失症候群の主要な疾患原因遺伝子である。私たちが樹立した Tbx1 発現低下マウスでは、総動脈幹症、大動脈弓離断症などの 22q11.2 症候群と同様の心臓流出路および大血管の異常が認められる。

さらに最近、私たちは心臓流出路異常をきたすヒトにおける新規疾患原因遺伝子として、転写因子 GATA6 を同定した (Kodo K et al. Proc Natl Acad Sci USA 2009)。心臓神経堤細胞で Gata6 の機能を喪失したマウスでは心臓流出路異常をきたすことが報告されており、Gata6 が心臓神経堤細胞の発生を制御する可能性が示唆される (Lepore JJ, et al. J Clin Invest. 2006)。二次心臓領域細胞を制御する TBX1 と心臓神経堤細胞を制御する GATA6 の遺伝子異常がヒトで共通の流出路異常を発症すること、また加えて、過去の多くの動物実験で二次心臓領域細胞の発生異常を有するノックアウトマウスと心臓神経堤細胞の発生異常を有するノックマウスに認められる心臓流出路形態異常の表現型が酷似することから、二次心臓領域細胞と心臓神経堤細胞間に相互作用が存在し、正常な流出路の発生を制御すると考えられる。

さらに、心臓神経堤細胞の発生過程を制御する細胞間シグナル伝達の候補として、多数

の分子のネットワークにより発生に関与する semaphorin-plexin シグナル系がある。このシグナル系に属する分泌因子である semaphorin3C (Sema3C) と、心臓神経堤細胞表面に発現する受容体 plexinA2 (Plxna2) のノックアウトマウスは、いずれも心臓流出路と大血管の発生異常を起こすことが報告された (Feiner L, et al. Development 2001; Brown CB, et al. Development. 2001)。

## 2. 研究の目的

心臓流出路発生において、二次心臓領域細胞の発生を制御する TBX1 と心臓神経堤細胞の発生を制御する GATA6 の下流に共通して介在する分子機構を同定し、両細胞間相互作用を解明することを目的とする。これまでの独自の研究成果から得た「Tbx1 と Gata6 の下流に semaphorin-plexin シグナルが共通の分子機構として存在し、二次心臓領域・心臓神経堤細胞間の相互作用を介して心臓流出路が正常に発生する」という仮説を検証する。

これまでに semaphorin-plexin シグナルを介する二次心臓領域および心臓神経堤細胞間の相互作用の詳細なメカニズムや、相互作用の異常が心臓流出路の表現型に与える影響を検討した報告はほとんどない。そこで私たちは、ヒト心臓流出路発生異常の病因遺伝子として GATA6 および TBX1 という 2 つの転写因子に着目し、その semaphorin-plexin シグナルの調節に関与する新たな共通の分子機構を同定することにより、二次心臓領域および心臓神経堤細胞間相互作用の解明を目指すことに着想した。本研究は、研究代表者が最近約 10 年間継続してきた独自に得た心臓流出路発生の研究成果に基づき行う独創的な研究である。

## 3. 研究の方法

1) Sema3C 心臓流出路特異的発現制御領域の特定: transgenic マウスを用いた検討で、Sema3C の心臓流出路特異的発現を制御する領域を、絞り込んで、重要な発現制御エレメントを特定する。

2) Sema3C 心臓流出路特異的発現制御領域の時間的・空間的解析: 特定された発現制御領域に lacZ レポーター遺伝子を導入した transgenic マウスを応用し、流出路発生における lacZ 遺伝子発現を X-gal 染色を用いて解析し、lacZ 遺伝子が発現する細胞を空間的に特定する。Sema3C のダイナミックな発現が、流出路発生のどの時期にどの前駆細胞に認められるかを、時間的・空間的に明らかにする。

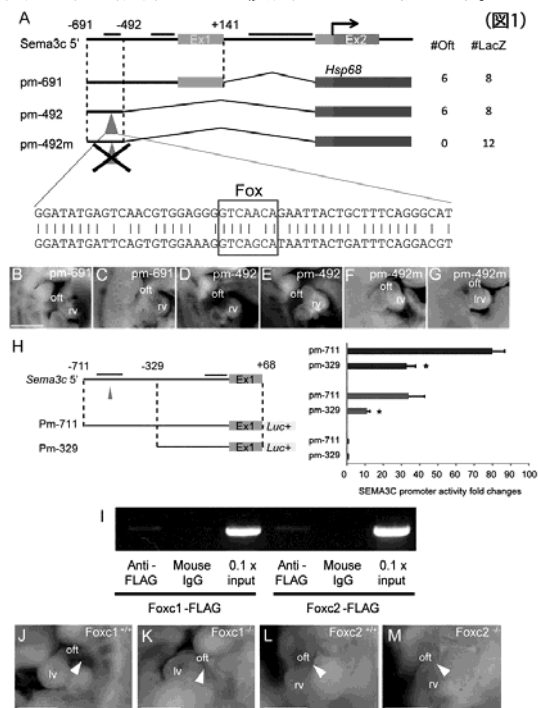
3) Sema3C 心臓流出路特異的発現を制御する因子の特定: 特定された発現制御領域を VISTA データベースで解析し、Sema3C の心臓流出路特異的発現制御領域に存在する、種を越えて保存された転写因子結合配列を検索

する。Sema3C の心臓流出路発生におけるダイナミックな発現は、時間的空間的に協調した複数の転写因子群とその結合配列の制御を受けると推測される。抽出された転写因子および結合配列について、転写活性を luciferase assay により、DNA 結合能を EMSA および ChIP assay により解析する。

4) Tbx1 による Sema3C 制御機構の検討：先天性心臓流出路異常の原因遺伝子として最も頻度の高い TBX1 により、Sema3C のダイナミックな発現が制御を受けるかどうかを検討する。上記 Sema3C 発現 transgenic マウスと Tbx1 発現低下マウスを交配し、Sema3C のダイナミックな発現が Tbx1 の発現低下により変化するかどうか、また Tbx1 発現低下マウスの心臓流出路異常（総動脈幹症）にどのように関与するかを検討する。さらに Tbx1 の Sema3C 発現制御が直接的か間接的か、Tbx1 の下流の候補となる分泌タンパクの検討により明らかにする。

#### 4. 研究成果

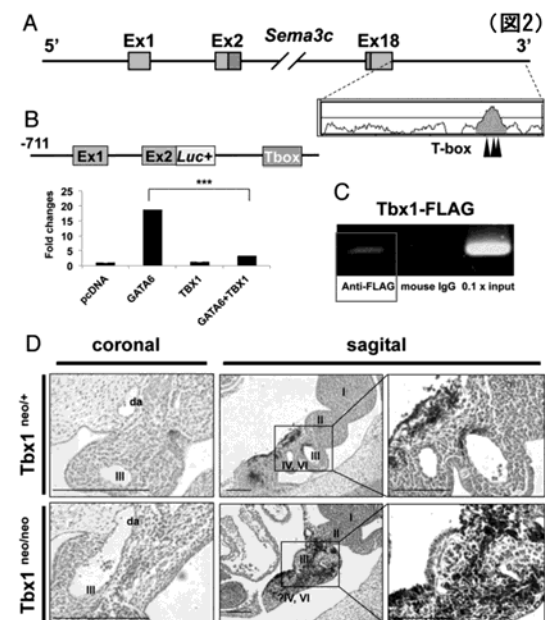
Sema3C のゲノム遺伝子制御領域の解析により、Sema3C を制御する最有力候補として、Sema3C ゲノム上流（5' 側）約-500bp 付近に、種を越えて保存された Forkhead (Fox) 転写因子群の結合配列が検出された（図 1A）。



Transgenic マウスによる検討では、この結合配列を含む-492bp から-691bp の領域および上記 Fox 結合配列が Sema3C の心臓流出路における発現に必須であることが示唆された（図 1A-G）。luciferase assay（図 1H）および ChIP assay（図 1I）により、Fox 転写因子群の中で、Foxc1 および Foxc2 が上記 Fox

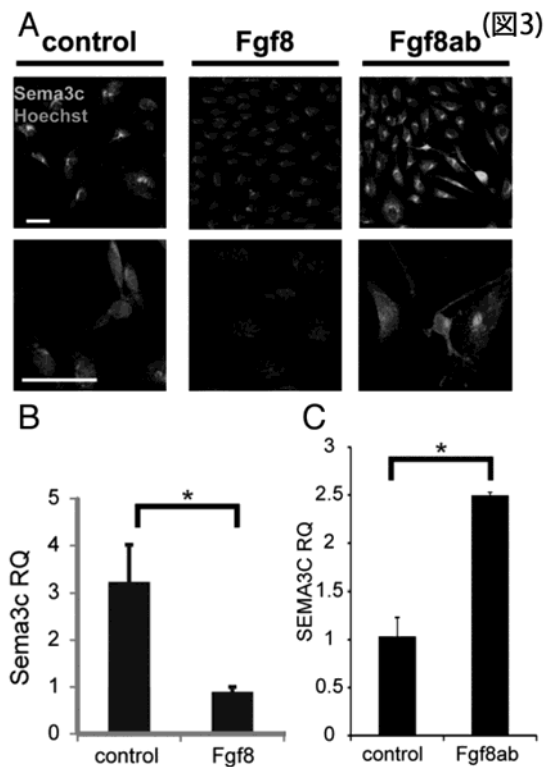
結合配列に結合して転写を活性化した。さらに、Foxc1 および Foxc2 のノックアウトマウスの心臓流出路において、Sema3C の発現低下が全胚 in situ hybridization (ISH) 解析（図 1J-M）により認められた。以上の結果より、Foxc1 および Foxc2 が心臓流出路における Sema3C の発現を制御する転写因子として特定された。

一方、Sema3C の下流（3' UTR 領域）には、種を越えて保存された T-box 転写因子結合配列が検出され（図 2A）、この T-box 結合配列と、私たちが以前報告した GATA 結合配列（Kodo K, et al. PNAS 2009）を含む Sema3C ゲノムを用いた luciferase assay では、興味深いことに、Tbx1 が Gata6 による Sema3C の転写活性化を抑制した（図 2B）。また、ChIP assay では、Tbx1 が上記 T-box 結合配列に結合することが示唆された（図 2C）。さらに、上記 Sema3C 発現制御領域に lacZ レポーターを挿入した transgenic マウスを用いた in vivo の検討では、Tbx1 の発現が正常のマウス（図 2D, Tbx1<sup>neo/+</sup>）に比して、Tbx1 の発現が低下したマウス（図 2D, Tbx1<sup>neo/neo</sup>）において、lacZ の発現が異所性に亢進していた。以上の結果はすべて、Tbx1 が Sema3C の発現を抑制的に制御するという仮説に合致する。さらに組織学的には、Sema3C-lacZ 遺伝子の発現は、Tbx1 発現低下マウス（Tbx1<sup>neo/neo</sup>）の二次心臓領域由来および心臓神経堤由来の両細胞群において異所性に亢進していることが示唆された（図 2D）。



Tbx1 は二次心臓領域に発現するが、心臓神経堤には発現しない転写因子であるため（Garg, Yamagishi et al. Dev Biol 1999）、Tbx1 発現低下マウスの心臓神経堤細胞で Sema3C が過剰発現する分子メカニズムにお

いて、Tbx1 の下流標的因子として二次心臓領域で発現し、分泌されて近傍に遊走してきた心臓神経堤細胞に作用するシグナル伝達分子が存在すると考えられた。私たちは以前、Tbx1 の下流で分泌因子 Fgf8 が機能することを報告したが (Hu, Yamagishi, et al. Development 2004)、その分子経路の機能の詳細は未だ明らかではなかった。そこで、Tbx1 の下流で Sema3C の心臓神経堤細胞での発現を抑制する候補タンパクとして Fgf8 に着目した。胎生 10.5 日前後のマウス胚および HHstage18-22 前後のニワトリ胚より摘出して培養した心臓神経堤細胞を用いた実験系で、Fgf8 を添加ないし抗 Fgf8 抗体 (Fgf8ab) により抑制した場合の Sema3C の発現を、免疫組織化学法と定量的 PCR 法で解析した。その結果、Fgf8 の添加により培養心臓神経堤細胞における Sema3C の発現は抑制され (図 3A, B)、抗 Fgf8 抗体による Fgf8 の抑制により培養心臓神経堤細胞における Sema3C の発現は亢進した (図 3A, C)。



以上より、心臓流出路形成において二次心臓領域では、Tbx1 が発現して Sema3C の発現を抑制し、その周辺の心臓神経堤細胞に対しては、Tbx1 の下流標的因子である Fgf8 が二次心臓領域から分泌され、心臓神経堤細胞を未分化、遊走状態に維持する。一方、流出路近位では、Gata6 および Foxc1/c2 により Sema3C の発現が活性化され、遊走してきた心臓神経堤細胞を流出路近位へと誘導する機序が明らかになった。

## 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 8 件)

1. Takagaki Y, Yamagishi H, Matsuoka R. Factors involved in signal transduction during vertebrate myogenesis. *International Review of Molecular Biology* 2012;296:187-272. (査読無)
2. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Ishihara K, Oda M, Makino S, Fukuda K, Takahashi T, Matsuoka R, Nakanishi T, Yamagishi H. Genetic analysis of essential cardiac transcription factors in 256 patients with non-syndromic congenital heart defects. *Circ J* 2012;76(7):1703-1711. (査読有)
3. Maeda J, Yamagishi H, Furutani Y, Kamisago M, Waragai T, Oana S, Kajino H, Matsuura H, Mori K, Matsuoka R, Nakanishi T. The impact of cardiac surgery in patients with trisomy 18 and trisomy 13 in Japan. *Am J Med Genet A* 2011;155A(11):2641-2646. (査読有)
4. Nakazawa M, Uchida K, Aramaki M, Kodo K, Yamagishi C, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are essential for the development of the second heart field. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 58-66. (査読有)
5. Tsuchihashi T, Maeda J, Shin CH, Ivey KN, Black BL, Olson EN, Yamagishi H, Srivastava D. Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis. *Dev Biol* 2011;351:62-69 (査読有)
6. Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK, Bagchi IC. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science* 2011;331:912-916 (査読有)
7. Uchida K, Aramaki M, Nakazawa M, Yamagishi C, Makino S, Fukuda K, Nakamura T, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H. Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis. *PLoS One* 2010;5(9). pii: e12500 (査読有)

8. Fukushima H, Kosaki K, Sato R, Yagihashi T, Gatayama R, Kodo K, Hayashi T, Nakazawa M, Tsuchihashi T, Maeda J, Kojima Y, Yamagishi H, Takahashi T. Mechanisms underlying early development of pulmonary vascular obstructive disease in Down syndrome: An imbalance in biosynthesis of thromboxane A2 and prostacyclin. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1919-1924 (査読有)
- [学会発表] (計 21 件)
1. 山岸敬幸「小児循環器医のための発生学と臨床遺伝」第 7 回愛媛発達心臓病研究会 2012 年 12 月 1 日 松山
  2. 山岸敬幸「先天性心疾患の心エコー図に役立たい臨床心臓発生学」第 52 回東京心エコー図研究会 2012 年 11 月 24 日 東京
  3. 山岸敬幸「胎児心スクリーニングに役立つ発生学の知識」第 50 回神奈川胎児エコー研究会 2012 年 11 月 13 日 東京
  4. 山岸敬幸「先天性心疾患を科学する 臨床心臓発生学のススメ」日本小児科学会 栃木県地方会 2012 年 7 月 14 日 宇都宮
  5. 山岸敬幸「基礎・心臓の発生 房室中隔の発生」第 48 回日本小児循環器学会学術集会・教育セッション 2012 年 7 月 7 日 京都
  6. 山岸敬幸「先天性心疾患の発症分子機構解明と臨床心臓発生学の発展」第 48 回日本小児循環器学会『高尾賞』受賞記念講演 2012 年 7 月 6 日 京都
  7. 山岸敬幸「成人先天性心疾患の基礎知識・先天性心疾患と遺伝」第 6 回成人先天性心疾患セミナー 2012 年 6 月 9 日 東京
  8. 山岸敬幸「臨床心臓発生学の進歩」第 21 回京都小児循環器病カンファレンス 2012 年 6 月 2 日 京都
  9. 山岸敬幸「世界に発信する小児循環器の基礎研究 -臨床心臓発生学のすゝめ-」The 6th CSR Research Seminar 2012 年 2 月 10 日 奈良
  10. 山岸敬幸「先天性心疾患診療のための発生学・遺伝学の基本と新たな流れ」第 5 回鹿児島小児循環器研究会学術集会 2011 年 8 月 27 日 鹿児島
  11. 山岸敬幸「世界をリードする臨床心臓発生学研究」第 94 回慈恵医大小児医学研究会 2011 年 7 月 16 日 東京
  12. 山岸敬幸「基礎発生・神経堤細胞と先天性心疾患」第 47 回日本小児循環器学会・教育セッション 2011 年 7 月 8 日 福岡
  13. 山岸敬幸「先天性心疾患の遺伝子研究」第 73 回東京心臓の会 2011 年 6 月 11 日 東京
  14. 山岸敬幸「成人先天性心疾患の診療に必要な遺伝の知識」第 4 回成人先天性心疾患セミナー 2011 年 5 月 14 日 東京
  15. Yamagishi H. Developmental origins of syndromic and non-syndromic cardiac outflow tract defects. Pediatric Academic Society (PAS/ASPR) 2011・Topic symposium: Molecular Pathogenesis of Cardiovascular Diseases of Childhood 2011 年 5 月 1 日 Denver, USA
  16. 山岸敬幸「先天性心疾患成因にアプローチするための臨床心臓発生学」第 49 回山梨小児循環器懇話会 2011 年 3 月 4 日 山梨
  17. 山岸敬幸「先天性心疾患の成因と遺伝カウンセリング」第 187 回大阪小児科学会 2010 年 9 月 26 日 大阪
  18. 山岸敬幸「心室中隔欠損の臨床と発生」第 9 回心臓血管発生研究会・教育セッション 2010 年 7 月 10 日 郡山
  19. Yamagishi H. Cardiovascular morphogenesis and development of the systemic and pulmonary circulation. The 7th Scientific Symposium 2010 年 7 月 4 日 東京
  20. 山岸敬幸「こどもの心臓病のために学ぶ、発生と遺伝の初歩」第 113 回日本小児科学会学術集会・教育セミナー 2010 年 4 月 23 日 岩手
  21. 山岸敬幸「先天性心疾患の分子遺伝学的解明」第 113 回日本小児科学会学術集・分野別シンポジウム 2010 年 4 月 23 日 岩手

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山岸 敬幸 (YAMAGISHI HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40255500

### (2) 研究分担者

内田 敬子 (UCHIDA KEIKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50286522

山岸 千尋 (YAMAGISHI CHIHIRO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：10296618

土橋 隆俊 (TSUCHIHASHI TAKATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：10286528

古道 一樹 (KODO KAZUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10338105

牧野 伸司 (MAKINO SHINJI)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：20306707

湯浅 慎介 (YUASA SHINSUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90398628

### (3) 連携研究者

なし