

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461631

研究課題名(和文) 心臓流出路および大動脈弓発生異常に関与する遺伝子と環境因子の影響

研究課題名(英文) The genetic and environmental effect on defects of developing cardiac outflow tract and aortic arch

研究代表者

前田 潤 (Maeda, Jun)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00255506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：心臓流出路発生に必須の転写因子Tbx1の発現を低下させたTbx1neo/neoマウスは、ヒト22q11.2欠失症候群同様、総動脈幹症(PTA)を呈する。Tbx1neo/neo胎子を妊娠した母マウスに、栄養素である葉酸を通常量投与した(C0)群と多量投与した(FA)群で、胎子の心表現型を比較したところ、C0胎子は全例重症型PTAを呈したが、FA胎子では軽症型が25%認められた。心臓流出路に遊走する神経堤細胞数は、C0胎子では減少していたが、FA胎子ではその減少の程度が軽度だった。このモデルマウスによる検討から、遺伝的要因で発症するPTAの重症度が、環境的要因により軽症化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tbx1 is an essential transcription factor required for development of the cardiac outflow tract and aortic arch. Our genetically engineered Tbx1 hypomorphic (Tbx1neo/neo) mice display a severe congenital heart defect, persistent truncus arteriosus (PTA), reminiscent of 22q11.2 deletion syndrome in human. We compared cardiovascular phenotype of Tbx1neo/neo embryos from pregnant mice fed with usual diet (C0) and with folic acid rich diet (FA). All of C0 embryos showed severe form of PTA, meanwhile 25 percent of FA embryos showed milder form of PTA. The number of migrated neural crest cells were reduced in developing cardiac outflow tract of C0 embryos compared with wild type, whereas the migration of neural crest cells was restored in FA embryos. These results suggest that PTA in Tbx1neo/neo embryos results from genetic background can be modified by nutrition and the environmental adjustment during pregnancy may rescue the cardiovascular phenotype.

研究分野：小児循環器学

キーワード：心臓流出路 先天性心疾患 遺伝子 環境因子

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患の成因には、メンデル遺伝病や染色体異常などの遺伝的要因が約8%、母体の風疹感染、全身性疾患、薬剤などの催奇形因子や環境的要因が約2%あり、残りの約90%が成因不明で多因子遺伝とされている。多くの染色体・遺伝子異常症候群において、同一の遺伝的異常を認めてもその表現型が多岐にわたることが知られている(遺伝的異質性)。これらの先天異常では、遺伝的因子と環境的因子の相互作用により疾患の最終表現型が決定されると考えられる。

近年の心臓発生学の進歩により、胎生期の心臓は側板中胚葉の一次心臓領域(First heart field: FHF)、臓側中胚葉の二次心臓領域(Second heart field: SHF)、外胚葉由来の神経堤細胞(Neural crest cell: NCC)など多種類の由来の異なる前駆細胞により形成されることが解明されてきた。SHFは右心室および流出路の形成に参与する。T-box型転写因子をコードする遺伝子*Tbx1*はSHFに発現し、そのノックアウト(*Tbx1*^{-/-})マウスは22q11DSに高率に合併する総動脈幹症(PTA)を認める。また、*Tbx1*は、PTAや大動脈弓異常を特徴とする染色体異常である22q11.2欠失症候群(22q11DS)の主要な責任遺伝子である。研究代表者らは、*Tbx1*遺伝子操作(*Tbx1*^{neo/neo})マウスを作製し、*Tbx1*の胎生期における発現を段階的に低下させるシステムを独自に開発した。*Tbx1*^{neo/neo}マウスでは*Tbx1*の発現量が正常の約20%に低下している。*Tbx1*蛋白の発現が0%である*Tbx1*^{-/-}マウスでは、22q11DSと同様のPTAや大動脈弓異常および口蓋裂・骨格系の異常を呈し、生後早期に死亡する。*Tbx1*^{neo/neo}マウスも生後早期に死亡するが、*Tbx1*^{-/-}マウスと異なり、口蓋裂は認められない。先天性心疾患については、*Tbx1*^{-/-}マウスと同様のPTAが高率に認められるが、詳細な病型については検討されていない。

流出路および大血管の発生には上述のSHFとNCCが重要で、細胞系譜解析法によりSHFは右心室および流出路を、NCCは大動脈肺動脈中隔を形成することが解明されている。NCCに特異的に発現する遺伝子をノックアウトすると、大動脈肺動脈中隔形成が障害され、*Tbx1*^{-/-}マウスに類似したPTAを発症する。葉酸のレセプターである*Folr1*をノックアウトしたマウスではNCCの遊走障害によりPTAを発症するが、妊娠母マウスに葉酸を過剰摂取させると、NCCの遊走が改善し表現型が軽症化する。葉酸は、ヒトでも先天性心疾患のリスクを減らすことが示唆されている。

Tbx1^{-/-}マウスと異なり、*Tbx1*の発現低下の程度を操作することのできる*Tbx1*^{neo/neo}は、遺伝子異常と環境因子の影響を検討するのに有用な動物モデルであると考え、本研究を考

想した。すなわちこの*Tbx1*^{neo/neo}マウス胎仔を妊娠した母マウスに対して、葉酸摂取量を増加させることにより、胎仔のPTAの表現型を変化させることが可能か検討した。心血管表現型の軽症化が認められれば、その機構を解明することにより、先天性心疾患に対する発症予防法開発の端緒となり得る。

2. 研究の目的

研究代表者らが独自に研究してきた*Tbx1*遺伝子改変マウスを利用して、通常より多量の葉酸を含有する餌を母体に投与して得られる*Tbx1*^{neo/neo}マウス胎仔と、通常量の葉酸を含有する餌を投与して得られる*Tbx1*^{neo/neo}マウス胎仔の心血管表現型を、形態学的及び分子生物学的に比較検討することを目的とする。本研究では、栄養素という環境的要因に着目し、遺伝的因子を有するモデルマウスの胎内環境への干渉による表現型の変化を観察することにより、疾患表現型決定における遺伝的因子と環境的因子との相互作用を*in vivo*で検証することができる。さらに、これらのモデルマウスの表現型を発生初期から解析することにより、先天性心疾患の発症における遺伝的因子と環境的因子の関係を解明し、環境調整によって疾患表現型を軽症化するメカニズムを明らかにすることも、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) *Tbx1*^{neo/neo}胎仔の心血管表現型の経時的観察

遺伝子型*Tbx1*^{neo/+}のヘテロ接合マウス同士を交配し、ホモ接合(*Tbx1*^{neo/neo})胎仔を心臓流出路が形成される胎生12.5日、13.5日、15.5日および出生直前の胎生18.5日に帝王切開で摘出する。同時に採取する卵黄嚢より抽出したDNAを使用し、Neo cassetteを検出する方法でPCR法を用いて核型を検査し、ホモ接合であるか否かを確認する。野生型胎仔では胎生12.0日以降、大動脈肺動脈中隔により大動脈嚢が遠位部から2本の大血管に分離され、大動脈、肺動脈が形成される。また、胎生13.0日頃までに、右背側大動脈が消退し、通常の左大動脈弓が完成する。*Tbx1*^{neo/neo}胎仔で、これらの過程が障害され、*Tbx1*^{-/-}マウスやヒト22q11DSに認められるような、PTAや右側大動脈弓などの円錐動脈幹異常、大動脈弓異常がどの程度認められるが、胎仔の心大血管をさらに切離し、全胚を観察した後、組織切片を作製して組織学的検討を行う。

(2) *Tbx1*発現低下に対する環境因子の干渉が表現型におよぼす影響

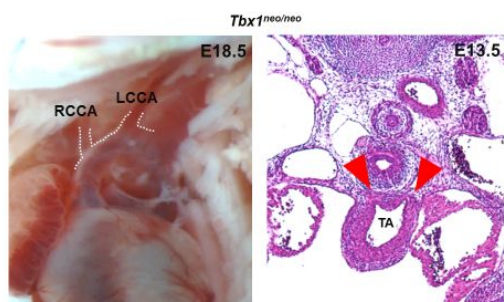
葉酸の過剰摂取が*Tbx1*^{neo/neo}胎仔に対して、

どのような影響を与えるか観察するため、通常の 10 倍量の葉酸を含有する餌を用いて妊娠母ヘテロ接合 ($Tbx1^{neo/+}$) マウスを飼育し、父ヘテロ接合 ($Tbx1^{neo/+}$) マウスと交配させて得られる $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔の表現型の変化を解析する。 $Tbx1^{neo/+}$ マウス同士を交配し、膈栓を認めた日の午前を胎生 0.5 日とし、通常量 (20mg/kg) の葉酸を含有する餌 (AIN-93G オリエンタル酵母) を与える妊娠母マウスと、隔離して通常の 10 倍量の葉酸を含有する葉酸過剰餌 (200mg/kg オリエンタル酵母) を与える妊娠母マウスに分けて、胎仔の表現型を比較する。(1)と同様に、心臓流出路が形成される胎生 13.5 日、15.5 日および出生直前の胎生 18.5 日の胎仔を帝王切開で採取し、全胚および組織切片で表現型を観察する。

4. 研究成果

(1) $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔の心血管表現型の経時的観察

胎生 18.5 日の $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔の観察では、そのすべてにおいて、左右肺動脈が総動脈幹より独立して分岐する PTA (Van Praagh A2 型) を認めた。心臓流出路が形成される胎生 12.5 日の $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔では流出路近位部から遠位部にかけて、円錐動脈幹を大動脈・肺動脈に分割する円錐中隔隆起の形成は不十分であったが、分割の前段階である内腔のらせん構造は認められた。流出路遠位部よりさらに遠位では動脈幹中隔隆起が低形成となり、らせん構造も認められなかった (図 1.)。 $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔における PTA は、円錐動脈幹中隔隆起、特に遠位の動脈幹中隔隆起の発達不十分で、大動脈、肺動脈分割が起こらないために生じた表現型と考えられた。



RCCA: 右総頸動脈 LCCA: 左総頸動脈 TA: 総動脈幹
赤矢頭: 肺動脈分岐部

図 1. $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔の心血管表現型

大動脈弓の形態は様々で、胎生 13.5 日から 15.5 日までの横断組織切片の観察では、通常の左大動脈弓は 51%、病的な右大動脈弓は 38% の胎仔に認められた。野生型では大動脈嚢内のらせん状の円錐動脈幹隆起による動脈中隔形成により血流のねじれが生じ、正常の左大動脈弓が形成されると考えられている

が、PTA には中隔形成がなく血流のねじれを生じない。したがって、PTA では総動脈幹を通過する血流の方向により、左右大動脈弓の多様性が生じると推測された。胎生 13.0 日の横断切片において流出路から大動脈弓の形態の観察では、総動脈幹弁から上行大動脈がどちらの方向に向かうかによって、大動脈弓の左右形態が決定されるように観察された。すなわち上行大動脈の向う方向により血流の左右差が生じ、それが大動脈弓の最終表現型を決定すると考え、胎仔ドプラエコーを用いた血流評価を試みたが、困難であった。横断組織切片にて、心臓流出路と総動脈幹のなす角度と、形成された大動脈弓の方向についても解析したが、明らかな結論を得ることはできず、今後の検討課題である。

(2) $Tbx1$ 発現低下に対する環境因子の干渉が表現型におよぼす影響

前述のように、通常餌を投与した妊娠母 ($Tbx1^{neo/+}$) マウスの $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔に認められた PTA は、全例が総動脈幹から 2 本の肺動脈が独立して分岐する Van Praagh 分類 A2 型 (重症型) であった。母体に葉酸過剰餌を投与した群では、総動脈幹から主肺動脈が分岐し、その後左右肺動脈に分岐する Van Praagh 分類 A1 型 (軽症型) が、胎生 15.5 日では 60%、胎生 18.5 日では 25% の胎仔に認められた。すなわち $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔妊娠母マウスに葉酸過剰餌を与えて得られた胎仔 (FA 胎仔) は、通常餌を投与した $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔妊娠母マウスの胎仔 (CO 胎仔) と比較して、PTA が同様に認められたが、大血管異常の重症度が軽症化した (図 2.)

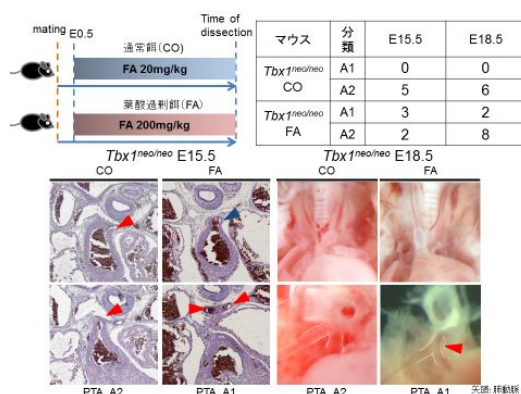


図 2. 葉酸による $Tbx1^{neo/neo}$ 胎仔の心血管表現型の変化

各々の胎仔の HE 染色組織切片の観察では、CO 胎仔の心臓流出路近位で神経堤細胞数は野生型胎仔より減少していたが、FA 胎仔では CO 胎仔より神経堤細胞数の増加が認められた (図 3.)。心臓流出路に遊走する神経堤細胞をさらに可視化するために、神経堤細胞の遊走に必須の神経血管誘導因子 *Sema3c* のエンハンサー領域に *LacZ* を挿入した遺伝子操作マウス (*Sema3c-LacZ*) を $Tbx1^{neo/+}$ マウス

スと交配し、得られた *Tbx1^{neo/neo}-Sema3C-LacZ* 胎仔を LacZ 染色して、神経堤細胞を青色に標識した。胎生 13.5 日の胎仔では、野生型、FA、NL のいずれも動脈幹部に青色染色細胞が少数認められ、野生型、FA、NL 胎仔間で明らかな染色細胞数の差は認められなかった。胎生 13.5 日胎仔では、PTA が存在しても神経堤細胞がすでに心臓流出路に遊走し、間葉系細胞に分化していることを示唆する所見であった。今後の課題として、より早期の胎生 11.5 日の胎仔で同様の実験を行い、FA 胎仔において NL 胎仔より遊走神経堤細胞数が多いか否かについて、研究を継続する必要がある。

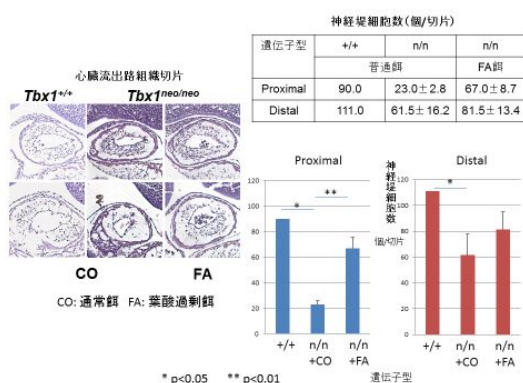


図3. 葉酸投与下の *Tbx1^{neo/neo}* 胎仔心臓流出路への神経堤細胞遊走

以上の研究成果は、先天性心疾患の発症、重症化に遺伝的要因に加え、環境的要因（栄養素）が関与することを示唆する。今後、母体環境を安定に保つことにより先天性心疾患の発症を抑制できる可能性、あるいは胎児期に発見された先天性心疾患に対して、母体への介入によりその重症度を軽減できる可能性が考えられ、さらに研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Maeda J, Kosaki K, Shiono J, Kouno K, Aeba R, Yamagishi H, Variable severity of cardiovascular phenotypes in patients with early-onset form of Marfan syndrome harboring *FBN1* mutations in exons 24-32, *Heart Vessels*, 査読有, 2016, [Epub ahead of print], 7 pages, DOI 10.1007/s00380-016-0793-2

2. Fujita M, Sakabe M, Ioka T, Watanabe Y, Kinugasa-Katayama Y, Tsuchihashi T, Utset MF, Yamagishi H, Nakagawa O, Pharyngeal arch artery defects and lethal malformations of the aortic arch and its branches in mice deficient for the *Hrt1/Hey1* transcription factor, *Mech. Dev*, 査読有, 139, 2016, 65-73, DOI 10.1016/j.mod.2015.11.002.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 土橋隆俊、前田 潤、石崎怜奈、柴田映道、内田敬子、山岸敬幸、心臓流出路異常の表現型に関する遺伝子と環境因子の相互作用の検討、第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会、2015 年 7 月 16 日、ホテル日航東京（東京都港区）

〔図書〕(計 5 件)

1. Shibata A, Uchida K, Maeda J, Yamagishi H, Springer, NY, Pulmonary arterial hypertension in patients with heterotaxy/polysplenia syndrome, In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H (eds), *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease -From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-* 2016, 81-82, DOI 10.1007/978-4-431-54628-3_9

2. Yamagishi H, Kodo K, Maeda J, Uchida K, Tsuchihashi T, Shibata A, Ishizaki R, Yamagishi C, Srivastava D, Springer, NY, A history and interaction of outflow progenitor cells implicated in “Takao syndrome”, In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H (eds), *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease -From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-* 2016, 201-209, DOI 10.1007/978-4-431-54628-3_26

3. Tsuchihashi T, Ishizaki R, Maeda J, Shibata A, Uchida K, Srivastava D, Yamagishi H, Springer, NY, Modification of cardiac phenotype in *Tbx1* hypomorphic mice, In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H (eds), *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease -From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-* 2016, 215-217, DOI 10.1007/978-4-431-54628-3_28

4. Uchida K, Nakazawa M, Yamagishi C, Mikoshiba K, Yamagishi H, Springer, NY, Inositol trisphosphate receptors in the vascular development, In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H (eds), *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease -From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-* 2016, 237-239, DOI 10.1007/978-4-431-54628-3_32

5. Yamagishi H, Springer, NY, Current genetics in congenital heart diseases –perspective, In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H (eds), Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease -From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology, 2016, 353-354

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 潤 (MAEDA, JUN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00255506

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

山岸 敬幸 (YAMAGISHI, HIROYUKI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：40255500