

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03398

研究課題名(和文) 胸部大血管および心室筋形成における細胞分化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cell differentiation during development of great vessels and ventricles

研究代表者

渡邊 裕介 (Watanabe, Yusuke)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：20562333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎生期の咽頭弓動脈内皮細胞でNotch-Rbpjシグナル伝達経路によって転写因子Hey1遺伝子が発現誘導されており、Hey1が第4咽頭弓動脈の発生を制御することで大動脈弓および右鎖骨下動脈の形成に貢献していることを明らかにした。
また、胎生期心室筋で転写因子Tbx20およびGata1によって転写因子Hey2遺伝子が発現誘導されており、右心室筋でのHey2が転写因子Tbx2の発現を抑制し、Tbx2が転写因子Mycnの発現を抑制することで右心室および三尖弁の形成を制御する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により胸部大血管形成を制御する咽頭弓動脈内皮細胞での分子経路、心室筋特異的な転写活性化の制御機構、右心室および三尖弁形成を制御する分子経路が明らかとなった。これらの知見は循環器の各領域が形成される分子機構の解明に貢献するものであると共に、大動脈弓離断症・右心室低形成・三尖弁狭窄など高頻度に発症している先天性心疾患の病因の理解にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we reveal that expression of the transcription factor Hey1 is induced by the Notch-Rbpj signaling pathway in endothelial cells of the pharyngeal arch artery during embryonic development and that Hey1 contributes to the formation of the aortic arch and right subclavian artery by regulating the development of the fourth pharyngeal arch artery. In addition, we reveal that Tbx20 and Gata transcription factors induce Hey2 expression in embryonic ventricles through a distal enhancer of the Hey2 gene. Furthermore, we show that Hey2 represses the expression of the transcription factor Tbx2 in the right ventricle and that Tbx2 represses the expression of the transcription factor Mycn, and this transcriptional pathway is involved in the formation of the right ventricle and tricuspid valves.

研究分野：発生生物学

キーワード：心臓 胸部大血管 発生 細胞分化 転写制御

1. 研究開始当初の背景

胎児期における心血管系の正常な構築は、個体の血液循環にとって不可欠な要素である。大動脈弓、左右の総頸動脈および鎖骨下動脈といった胸部大血管は胎仔期の第3・4・6咽頭弓動脈が発生と共にリモデリングされることにより構築され、心臓からの血液を全身に送り出す構造として重要な機能を担っている。特に、大動脈弓離断症が認められる22q11.2欠失症候群のモデルマウスを用いた研究は盛んに行われ、原因遺伝子の1つである転写因子Tbx1を中心とした経路が第4咽頭弓動脈の形成不全に起因するを取り巻く神経堤細胞の遊走・増殖・細胞死を制御し、血管平滑筋の分化・形成を担う機構が必須であることが明らかになっている。研究代表者および分担者、研究協力者らは、Hey1欠損マウスが22q11.2欠失症候群と同様の胸部大血管異常を示すことを報告した(Fujita M et al., Mech Dev 2016)。しかしながら、Hey1欠損マウス胚では咽頭弓における神経堤細胞の挙動は正常である一方、第4咽頭弓動脈の内皮細胞によって形成される管腔構造の異常が観察されており、胸部大血管形成における内皮細胞発生の重要性を示唆している。このことから、胎生期の咽頭弓動脈発生においてHey1が機能している細胞種と、Hey1発現を制御する上流因子を同定することにより、胸部大血管形成を制御する新たな分子経路の理解に繋がると考えた。

全身に血液を供給する臓器としての心臓は、拍動によって血液を全身および肺へと供給し、酸素や栄養の循環にとって必須の役割を担っている。先行研究から、心臓形成に関与する多くの因子が同定されてきた一方、胎生期の心室筋での特異的な転写制御機構については未知な点が多く残されていた。Hey2欠損マウスでは先天性心疾患でも認められる右心室低形成、三尖弁形成不全、心室中隔欠損により出生後に致死となる(Donovan et al., Curr Biol 2002)。研究代表者らは、Hey2の下流で機能している因子を同定することで、上記の心臓構造異常の原因究明に繋がると考えた。また、心室筋に発現するHey2遺伝子の遠位領域に心室筋特異的な転写活性を示すエンハンサー(Hey2エンハンサー)を同定したことから、Hey2エンハンサーの活性を制御する分子機構を明らかにすることで、心室筋での分子ネットワークの解明に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)胸部大血管形成を制御するHey1に着目し、咽頭弓動脈発生における内皮細胞での分子経路を解明することを目的とした。これまでに詳細に解析されてきたTbx1経路による神経堤細胞の挙動制御による胸部大血管形成とは異なり、Hey1欠損マウスでは内皮細胞発生の異常が起因となって胸部大血管形成異常が生じており、咽頭弓動脈内皮細胞発生を制御する分子機構の解析を行うことにより、胸部大血管の形成と構築異常を考察する上で重要な知見が得られると考えられた。並行して、(2)心臓形成を制御するHey2に着目し、胎生期心室筋における分子経路を解明することを目的とした。Hey2欠損マウスで認められる心臓構造異常がどのような遺伝子発現の変化に伴って生じているのかを明らかにすることで、心臓発生を制御する新たな分子経路を同定できると考えられた。また、研究代表者らが同定したHey2エンハンサーの解析からは、心室筋特異的な転写を制御する上流因子の解明が可能であると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 咽頭弓動脈発生における内皮細胞での分子経路の解明

Hey1欠損マウスで認められる第4咽頭弓動脈の内皮管腔構造異常に起因する大動脈弓離断や右大動脈弓などの胸部大血管形成異常が、どの細胞種でのHey1欠損によるものかを解析した。Tek-Creにより内皮細胞特異的にHey1を欠損したコンディショナルノックアウト(cKO)マウス、Tagln-Creによる平滑筋細胞特異的にHey1を欠損したcKOマウスを作製し、咽頭弓動脈および胸部大血管の表現型を解析した。

Hey1遺伝子の内皮細胞での発現を制御する転写調節領域を同定するため、ヒストン修飾情報をもとに選定したエンハンサー候補領域にLacZまたはEGFPレポーターを繋いだトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、内皮細胞でのエンハンサー活性を評価した。またエンハンサー領域にルシフェラーゼレポーターを繋いだコンストラクトを293T細胞に導入し、エンハンサー活性を制御する候補因子の機能を解析した。さらにRbpjノックアウト(KO)マウスにおけるエンハンサー活性を評価した。

(2) 胎生期心室筋における分子経路の解明

Hey2欠損マウスで認められる右心室低形成、三尖弁形成不全、心室中隔欠損が、どの心臓内領域のHey2欠損によるものかを解析した。Mef2c-AHF-Creにより二次心臓形成領域由来の組織(流出路・右心室)特異的にHey2を欠損したコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、胎生期および出生直後の心臓表現型を解析した。Hey2は流出路では発現していないため、Hey2;Mef2c-AHF-Cre cKOマウスでは右心室のHey2発現が消失する。また、Hey2;Mef2c-AHF-Cre cKOマウス胎生12.5日の右心室サンプルを用いたRNA-seq解析を行い下流因子を同定した。さらにCRISPR/Cas9法によりTbx2 KOマウスを作製し、Mycn遺伝子発現について評価した。

Hey2 遺伝子の心室筋細胞での発現を制御するエンハンサーの欠失および変異体を作製し、LacZ レポーターを繋いだトランスジェニック (Tg) マウスにて胎生期心臓でのエンハンサー活性を評価した。またエンハンサー領域にルシフェラーゼレポーターを繋いだコンストラクトを293T 細胞に導入し、エンハンサー活性を制御する候補因子の機能を解析した。さらにCRISPR/Cas9 法により Hey2 エンハンサー KO マウス、Tbx20 KO マウスを作製し、Hey2 遺伝子発現および Hey2 エンハンサー活性について評価した。

4. 研究成果

(1) 咽頭弓動脈発生における内皮細胞での分子経路の解明

内皮細胞で Hey1 を欠損した Hey1; Tek-Cre cKO マウスでは大動脈弓離断や右大動脈弓などの胸部大血管異常が認められた (図 1)。一方、平滑筋細胞で Hey1 を欠損した Hey1; Tagln-Cre cKO マウスでは異常は認められなかった。また、胎生 10.5 ~ 11.5 日の Hey1; Tek-Cre cKO マウスでは第 4 咽頭弓動脈の内皮管腔構造形成が異常となっていた。異常となった第 4 咽頭弓動脈では内皮細胞マーカー (Pecam1, Nrp1, Gja5 など) や神経堤細胞マーカー (AP2a, Crabp1) の発現は確認できたが、平滑筋細胞マーカーである Acta2 の発現は消失していた (図 1)。以上から、内皮細胞で発現する Hey1 が第 4 咽頭弓動脈の管腔構造形成および平滑筋細胞分化を制御しており、そのことが胸部大血管形成に必須であることが明らかとなった。

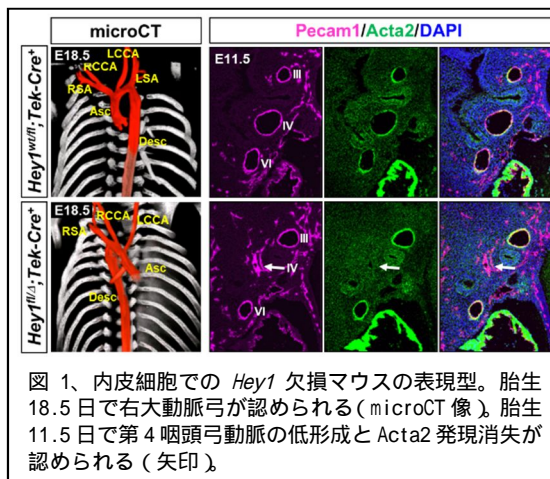


図 1、内皮細胞での Hey1 欠損マウスの表現型。胎生 18.5 日で右大動脈弓が認められる (microCT 像)。胎生 11.5 日で第 4 咽頭弓動脈の低形成と Acta2 発現消失が認められる (矢印)。

LacZ レポーターを用いた Tg マウス解析により、Hey1 遺伝子-18k 領域に動脈内皮細胞での発現を制御するエンハンサー (Hey1 内皮エンハンサー) を同定した。その一方、Hey1 遺伝子近傍領域は内皮細胞での転写活性を示さなかった。ルシフェラーゼレポーター解析からは Hey1 内皮エンハンサーは Notch-Rbpj シグナル伝達経路により活性化されることが示された。また、Rbpj 結合配列に変異をもつ Hey1 内皮エンハンサーおよび Rbpj KO マウス胚ではエンハンサー活性が消失した (図 2)。以上から、Notch/Rbpj シグナル伝達経路が動脈内皮細胞での Hey1 遺伝子発現に必須であることが明らかとなった。

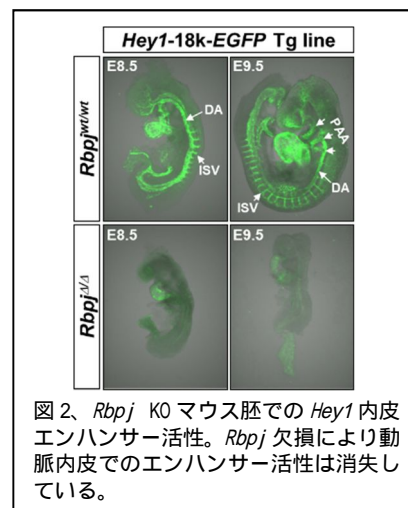


図 2、Rbpj KO マウス胚での Hey1 内皮エンハンサー活性。Rbpj 欠損により動脈内皮でのエンハンサー活性は消失している。

およびの結果から、動脈内皮細胞で発現する Hey1 遺伝子の胸部大血管形成における重要性和転写制御機構の一端を明らかにした。本研究実績は JBC 誌に投稿し受理された (Watanabe et al., 2021. 筆頭および責任著者)。

(2) 胎生期心室筋における分子経路の解明

右心室で Hey2 を欠損した Hey2; Mef2c-AHF-Cre cKO マウスでは右心室低形成・三尖弁形成不全・心室中隔欠損といった Hey2 KO マウスで認められる心臓異常が全て生じた。Hey2 cKO マウス右心室での RNA-seq 解析では発現上昇が特に大きい遺伝子として転写因子 Tbx2 が得られ、in situ hybridization により正常心臓では Tbx2 は右心室では発現していないが、Hey2 cKO 心臓では異所的に発現が誘導されていることを確認した。Tbx2 KO マウスの心臓では細胞増殖を活性化する転写因子 Mycn 発現が上昇していた。一方、Hey2 cKO マウス右心室では Mycn 発現と細胞増殖が減少していた。以上から、Hey2-Tbx2-Mycn という転写因子の抑制的な制御経路が胎生期右心室の形成に重要であることが示唆された。

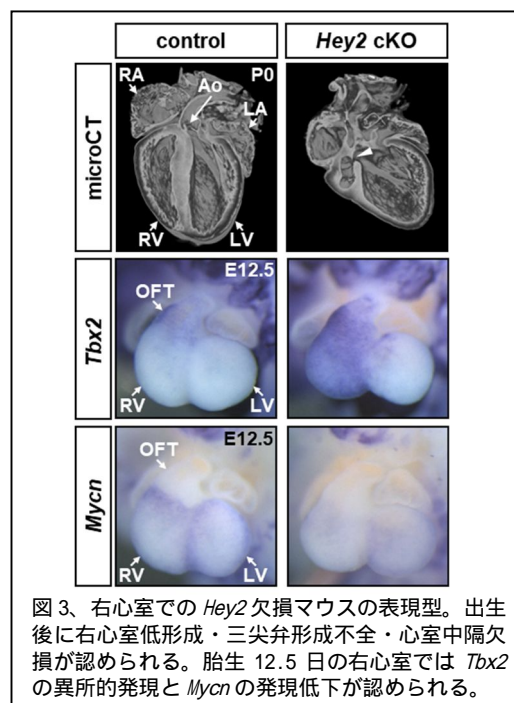


図 3、右心室での Hey2 欠損マウスの表現型。出生後に右心室低形成・三尖弁形成不全・心室中隔欠損が認められる。胎生 12.5 日の右心室では Tbx2 の異所的発現と Mycn の発現低下が認められる。

Hey2 エンハンサー領域の KO マウス胚では、心室筋特異的に内在性の Hey2 発現が減少した (図 4A)。また LacZ レポーターを用いた Tg マウス解析により、Hey2 エンハンサー内の Tbx および Gata 結合配列の欠失または変異によりエンハンサー活性が消失することが示された (図 4B)。さらに、

Tbx20 KO マウス胚心臓では *Hey2* 発現および *Hey2* エンハンサー活性が消失した(図 4B)。ルシフェラーゼレポーター解析からは *Tbx20* および *Gata4* が協調的に *Hey2* エンハンサーを活性化させることが示された。以上から、胎生期心室筋での *Hey2* エンハンサー活性には *Tbx20* および *Gata* 因子が必須であることが明らかとなった。

およびの結果から、胎生期心室筋での *Tbx20* & *Gata*-*Hey2*-*Tbx2*-*Mycn* の転写因子カスケードが心臓形態形成を制御することを明らかにした。本研究実績は *Dev Biol* 誌および *Dev Growth Differ* 誌に投稿し受理された (Ihara et al., 2020. 責任著者、Seya et al., 2021. 責任著者)。

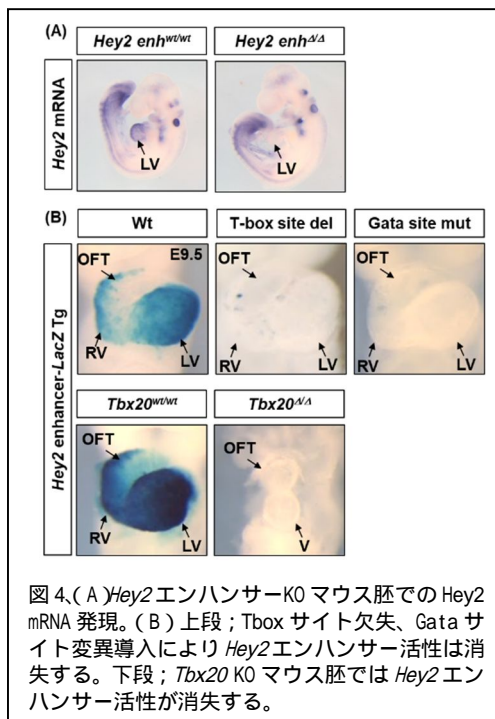


図 4.(A) *Hey2* エンハンサー KO マウス胚での *Hey2* mRNA 発現。(B) 上段; *Tbx20* サイト欠失、*Gata* サイト変異導入により *Hey2* エンハンサー活性は消失する。下段; *Tbx20* KO マウス胚では *Hey2* エンハンサー活性が消失する。

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 0件）

1. 著者名 Watanabe Y, Seya D, Ihara D, Ishii S, Uemoto T, Kubo A, Arai Y, Isomoto Y, Nakano A, Abe T, Shigeta M, Kawamura T, Saito Y, Ogura T, Nakagawa O.	4. 巻 295(51)
2. 論文標題 Importance of endothelial Hey1 expression for thoracic great vessel development and its distal enhancer for Notch-dependent endothelial transcription.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 17632-17645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seya D, Ihara D, Shirai M, Kawamura T, Watanabe Y, Nakagawa O.	4. 巻 63(1)
2. 論文標題 A role of Hey2 transcription factor for right ventricle development through regulation of Tbx2-Mycn pathway during cardiac morphogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 82-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12707.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyoshi Takekazu, Hisamitsu Takashi, Ishibashi-Ueda Hatsue, Ikemura Kenji, Ikeda Tomoaki, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Watanabe Yusuke, Nakagawa Osamu, Hosoda Hiroshi	4. 巻 302
2. 論文標題 Maternal administration of tadalafil improves fetal ventricular systolic function in a Hey2 knockout mouse model of fetal heart failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 110 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2019.12.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ihara Dai, Watanabe Yusuke, Seya Daiki, Arai Yuji, Isomoto Yoshie, Nakano Atsushi, Kubo Atsushi, Ogura Toshihiko, Kawamura Teruhisa, Nakagawa Osamu	4. 巻 461
2. 論文標題 Expression of Hey2 transcription factor in the early embryonic ventricles is controlled through a distal enhancer by Tbx20 and Gata transcription factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 124 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊裕介、瀬谷大貴、井原大、田中裕樹、川村晃久、中川修
2. 発表標題 胎生期心室筋におけるHey2転写因子の機能と発現制御機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke WATANABE, Daiki SEYA, Dai IHARA, Yuki TANAKA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA.
2. 発表標題 Importance and transcriptional regulation of Hey2 transcription factor in embryonic ventricles
3. 学会等名 第24回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦崎明宏、渡邊裕介、原田恭弘、田中亨、劉孟佳、中川修
2. 発表標題 BMP-ALK1シグナル伝達系の新規下流遺伝子群の発現制御と機能解析
3. 学会等名 第6回日本HHT研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru TANAKA, Norika LIU, Shoko TAMURA, Daiki SEYA, Yusuke WATANABE, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Significance of Hey transcription factors in endothelial cell differentiation and embryonic vascular development
3. 学会等名 NAVBO Vascular Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田恭弘、田中亨、足立淳、若林真樹、石濱泰、渡邊裕介、川村晃久、中川修
2. 発表標題 胎生期血管形成におけるリン酸化酵素遺伝子SGK1の上皮特異的発現機構と下流シグナル伝達様式の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井原大、渡邊裕介、瀬谷大貴、磯本祥恵、荒井勇二、中野厚史、川村晃久、中川修
2. 発表標題 GataおよびT-box因子は胎生期心室筋におけるHey2遺伝子の転写を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬谷大貴、井原大、川村晃久、渡邊裕介、中川修
2. 発表標題 右心室および心室中隔におけるHey2発現は心臓形態形成に必須である
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke WATANABE, Dai IHARA, Daiki SEYA, Yoshie ISOMOTO, Yuji ARAI, Atsushi NAKANO, Atsushi KUBO, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Function and transcriptional regulation of Hey transcription factors during cardiovascular development
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦崎明宏、田中亨、原田恭弘、劉孟佳、川村晃久、渡邊裕介、中川修
2. 発表標題 胚発生における心血管シグナル伝達系と環境因子の相互関係
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉孟佳、片山由美、渡邊裕介、荒井勇二、磯本祥恵、中野厚史、上村-鎌田麻実、福嶋葉子、久保田義顕、植村明嘉、金井克晃、中川修
2. 発表標題 胎生期血管内皮遺伝子Tmem100の転写制御機構と血管形成における意義
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/yrwatanabe
--

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	小柴 和子 (Koshiba Kazuko) (30467005)	東洋大学・生命科学部・教授 (32663)	

6. 研究組織 (つづき)

	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	中川 修 (Nakagawa Osamu) (40283593)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	
研究分担者	浦崎 明宏 (Urasaki Akihiro) (40550083)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
研究分担者	L A M R I L Y N D A (Lamri Lynda) (90883984)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動 研究員 (84404)	
研究分担者	能丸 寛子 (Nomaru Hiroko) (30885538)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級 研究員 (84404)	
研究分担者	原田 恭弘 (Harada Yukihiro) (70911402)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リ サーチフェロー (84404)	
研究分担者	垣花 優希 (Kakihana Yuki) (40910534)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リ サーチフェロー (84404)	
研究分担者	橋本 大輝 (Hashimoto Daiki) (40911342)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リ サーチフェロー (84404)	
研究分担者	劉 孟佳 (Liu Norika) (50826922)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動 研究員 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	瀬谷 大貴 (Seya Daiki) (30806021)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動 研究員 (84404)	
研究分担者	田中 亨 (Tanaka Toru) (50806065)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動 研究員 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関