

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08352

研究課題名（和文）NodalおよびTbx20異常の先天性心疾患・肺動脈疾患発症における関与

研究課題名（英文）The genetic role of Nodal and Tbx20 in congenital heart and lung defects

研究代表者

前田 潤（Maeda, Jun）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）

研究者番号：00255506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：複雑型先天性心疾患の家族例に同定されたNODALおよびTBX20遺伝子バリエーションの病的意義を明らかにするために、遺伝子操作マウスを用いた検討を行った。NodalおよびTbx20ヘテロノックアウトマウス（ヘテロマウス）は生存したが、Tbx20ヘテロマウス、Nodal/Tbx20ダブルヘテロマウスは高率に心室中隔欠損を合併し、ダブルヘテロマウスの生後10日の生存率は有意に低かった。Tbx20ヘテロマウスでは、Nodalの下流標的分子であるPitx2の発現が減少していた。NODALおよびTBX20は協調的に心臓発生に関与し、両者の機能低下は心疾患をより重症化させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、複雑型先天性心疾患の家族例におけるシグナル分子NODAL、転写因子TBX20の遺伝子異常を同定し、それらを端緒に分子遺伝学的検討を行った。遺伝子操作マウスを用いて、Nodal、Tbx20が心臓発生において共通の分子経路をもち、両者の異常が合併することで先天性心疾患を重症化させる可能性を示した。Tbx20は先天性心疾患の中で最も頻度が高い心室中隔欠損の発症に関与していることが判明し、その分子機構解明により、欠損の発生ならびに自然閉鎖の機序が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We previously identified genetic variants of the signaling molecule, NODAL, and the transcription factor, TBX20 in a pedigree with complex heart defects. To delineate the pathogenesis of these variants, we took the genetic approach using genetically engineered mice. Although both heterozygous Nodal knockout mice and heterozygous Tbx20 knockout mice survived after birth and were fertile, the survival rate of double heterozygous knockout mice for Nodal and Tbx20 was significantly decreased at ten days after birth. Most of Tbx20 knockout mice showed ventricular septal defects and decreased the expression level of the transcription factor, Pitx2, which is the downstream target of Nodal in the developmental pathway. Taken together, NODAL and TBX20 may play an essential role in cardiac development in a synergistic fashion and loss of function of both genes may result in more severe heart defects.

研究分野：小児循環器学

キーワード：先天性心疾患 NODAL TBX20

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内臓錯位症候群とは、体の左右軸の発生異常により、胸腹部の臓器がランダムな位置に形成される幅広いスペクトラムを有する症候群である。出生約1万人に1人の割合で発症し、胸腹部内臓の位置異常に加え、高頻度に複雑型先天性心疾患(単心室または一側心室低形成、大血管位置異常、肺動脈閉鎖、総肺静脈還流異常など)を合併する。同症候群のうち、特に本来左側に位置する内臓の形成が障害される右側相同型では、脾臓が形成されないことから無脾症候群と呼ばれ、単心室、肺動脈閉鎖を合併する頻度が高い。これらの症例は、一心室修復となる Fontan 型手術が必須であり、最終修復まで複数回の心臓手術が必要となる。これまでのヒトにおける遺伝子変異解析の報告から、*NODAL* および *NODAL* シグナル経路に關与する遺伝子の異常が内臓錯位症候群の有力な原因の一つと考えられているが¹⁾、詳細な分子機構は不明である。

Nodal のホモ接合ノックアウトマウス (*Nodal* ホモマウス) は、胎生 6.5 日頃の前腸陥入期に発生が停止し、原始線条において、外胚葉から内胚葉、心臓原基である中胚葉が形成されず胎生早期に致死となる²⁾。一方、*Nodal* ヘテロ接合ノックアウトマウス (*Nodal* ヘテロマウス) は、外見上正常で妊孕性を有する。したがって、従来のマウスの解析では、*Nodal* の左右軸形成における機能およびヒト内臓錯位症候群の発症への關与については、未解明である。

私たちは、両親が表現型正常で、児に無脾症候群を含む複雑型先天性心疾患が多発する家族例(図1)を経験し、この家系における疾患原因遺伝子を特定するために、次世代シーケンサーを用いて、約200個の心臓血管発生に關与する遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、有力な候補として同胞間に共通する *NODAL* と *TBX20* のアミノ酸置換を伴うヘテロ接合性バリエーションを同定した(表)。 *in silico* 解析により、*NODAL* のバリエーションは機能低下が示唆された。*TBX20* バリエーションの機能障害は予測されなかったが、活性化ドメインに存在し、近傍のバリエーションに病的な表現型が報告されていることから³⁾、心疾患の成因への關与が示唆された。父親に *NODAL*、母親に *TBX20* のヘテロ接合性バリエーションが各々認められており、

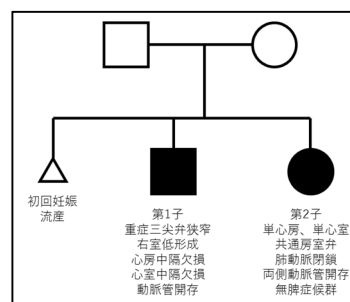


図1. 複雑性先天性心疾患の家系例

遺伝子バリエーション	第1子	第2子	父	母
<i>NODAL</i>	○	○	○	×
<i>TBX20</i>	○	○	×	○

表. 家系における遺伝子バリエーション

本家系の先天性心疾患は、児のゲノムの中で複数の遺伝的素因が集積した多因子遺伝形式により生じた可能性が考えられた。先天性心疾患のほとんどは多因子遺伝が原因と考えられているが、これまでヒトで複数の遺伝子のバリエーションの組み合わせによって先天性心疾患が発症することを示す明確な報告はない。

今回、バリエーションが検出された *TBX20* は、心臓発生初期から発現する転写因子の一つである。過去に *Tbx20* ノックアウトマウスの報告があるが、ホモ接合性ノックアウトマウス (*Tbx20* ホモマウス) では早期に心臓発生が停止し、胎生 10.5 日頃に胎生致死となるため⁴⁻⁶⁾、その役割の詳細は不明である。左室緻密化障害を有する家系において *TBX20* の変異が発見され、TGF- β シグナルの異常を介して左室緻密化障害を発症する機序が解明された⁷⁾。また、*Tbx20* ヘテロ接合性ノックアウトマウス (*Tbx20* ヘテロマウス) の心表現型について詳細な報告はなく、大部分で異常がないことが示唆されるが、一部は成獣において拡張型心筋症の初期所見が認められ、*Tbx20/Nkx2.5* ダブルヘテロ接合性ノックアウトマウスでは、心房中隔欠損を生じ心筋症が重症化する⁴⁾。以上の所見から、*TBX20* が他の心臓関連遺伝子と遺伝子相互作用を持ち、先天性心疾患の発症の modifier 遺伝子となることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*NODAL* を含む複数の遺伝子異常が同時に起こることにより、内臓錯位症候群に特徴的な複雑型先天性心疾患の発症機序について解明することである。複雑型先天性心疾患の家系例で同定された *NODAL* および *TBX20* 遺伝子バリエーションの機能解析により表現型におよぼす影響を検討するため、*Nodal* ヘテロマウスと *Tbx20* ヘテロマウスを交配し、*Nodal/Tbx20* ダブルヘテロ接合性ノックアウトマウス(ダブルヘテロマウス)を作製し、胚の心臓血管発生および心血管表現型を解析する。また、私たちが確立した肺動脈標識遺伝子改変マウスを利用して、*Nodal* シグナルの異常が肺動脈発生におよぼす影響を可視化して検討する。*NODAL* を含む分子経路はある程度解明されているため、同定された *NODAL* 遺伝子バリエーションがその下流シグナルに及ぼす影響を、培養細胞を用いた機能解析実験で明らかにする。また、*Tbx20* ヘテロマウスの心表現型についても検討し、ダブルヘテロマウスの表現型と比較する。

3. 研究の方法

(1) *Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスの心大血管表現型解析

Nodal ヘテロマウス、*Tbx20* ヘテロマウスは各々成獣まで成長し、妊孕性があるため、交配により *Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスを作製し、出生後ダブルヘテロマウスの心大血管表現型の解析を行った。また、ダブルヘテロマウスの胎生致死の可能性を考え、胎生後期の胎仔の表現型解析も行った。ダブルヘテロマウスにおける肺血管形態の可視化を目的として、*Tbx20* ヘテロマウスと、肺血管内皮細胞を標識する *IP3R2-lacZ* レポーターマウスを交配し、*Tbx20/IP3R2-lacZ* ヘテロ接合性マウス(*Tbx20-lacZ* ヘテロマウス)を得た。この *Tbx20-lacZ* ヘテロマウスと *Nodal* ヘテロマウスを交配して得た、*Nodal/Tbx20/IP3R2-lacZ* ダブルヘテロレポーターマウスの心肺組織を β -gal 染色することにより、*Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスの肺血管を可視化して、形態を評価した。また、ダブルヘテロマウス心臓組織切片を用いた免疫組織化学染色(TUNEL 法、PH3 法)を行って、アポトーシス活性や細胞増殖能を野生型マウスと比較した。

(2) *Tbx20* ヘテロマウスの心大血管表現型解析

先に述べたように、*Tbx20* ヘテロマウスの成獣で拡張型心筋症を呈することがあるため、出生直前および出生後の心大血管表現型の解析を行った。さらに *Tbx1* ヘテロマウスにおいて、*Nodal* の制御を受ける *Pitx2* の発現量を定量的 PCR 法で測定した。

(3) *NODAL* バリエーションの *in vitro* 機能解析

レポーター解析

患者家系で同定された *NODAL* 遺伝子バリエーションを発現するプラスミドを、*NODAL* の下流シグナルのレポーターとして用いられている SBE4-ルシフェラーゼ、*NODAL* の共役受容体である *CRIPTO* 発現プラスミドとともに培養細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定、野生型 *NODAL* を導入した場合と比較した。同様に家系で同定された *TBX20* 遺伝子バリエーション、*TBX20* のレポーターである *NPPA*-ルシフェラーゼを発現するプラスミドを培養細胞にトランスフェクションして、ルシフェラーゼ活性を測定、野生型 *TBX20* を導入した場合と比較した。

蛋白解析

NODAL により促進される *Smad2* および *Smad3* のリン酸化を定量するため、同定された *NODAL* バリエーションを、*NODAL*、*CRIPTO* とともに、培養細胞にトランスフェクションし、リン酸化された p-*Smad2*、p-*Smad3* を抽出し、野生型 *NODAL* を導入した場合と比較した。また、共役因子である *GDF1* を加えた場合で同様の比較を行った。*GDF1* を導入した培養細胞で、p-*Smad2*、

p-Smad3 の細胞内局在を、抗体を用いた免疫組織化学染色で確認した。

4. 研究成果

(1) *Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスの心大血管表現型解析

生後 1 週間で、計 110 匹の幼獣の遺伝型解析を行い、ダブルヘテロマウスの出現頻度は 18/110 匹 (16%)、野生型の出現頻度は 26/110 匹 (24%) で、有意にダブルヘテロマウスの頻度が少なく ($p=0.032$)、胎内死亡が示唆された。ダブルヘテロマウス胎子を胎生 18.5 日に採取し、表現型を解析し、外観上は野生型と同じであったが、6 匹中 5 匹 (83%) の胎仔で心室中隔欠損を認めた (図 2)。先に述べた家系であった無脾症候群や、複雑心疾患は認められなかった。生後 8 週間から 1 年のダブルヘテロマウスの観察では、心室中隔欠損は認められなかった。*Nodal/Tbx20/IP3R2-lacZ* ダブルヘテロレポーターマウスの β -gal 染色では、野生型に比べて肺血管の密度が高い所見が得られた (図 3)。また、ダブルヘテロマウス心臓組織では、心室中隔にアポトーシスを認めた。野生型の心室中隔にはアポトーシスを認めなかった。(図 4)。ダブルヘテロマウス、野生型の間で、細胞増殖度に有意な差を認めなかった。



図 2. *Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスの心室中隔欠損 (矢印)

(2) *Tbx20* ヘテロマウスの心大血管表現型解析

胎生 18.5 日の *Tbx1* ヘテロマウス 5 匹中 3 匹 (60%) に心室中隔欠損を認め、生後 8 週以降の *Tbx1* ヘテロマウス 3 匹には認められなかった。*Nodal* ヘテロマウスや野生型マウスでは心室中隔欠損は認められなかった。*Tbx20* ヘテロマウスでは、野生型に比し、*Nodal* の制御をうける *Pitx2* の発現が低下し、*Tbx1* ホモマウスでは低下はより著明であった。

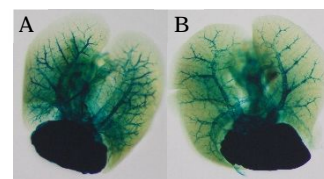


図 3. 肺動脈形態 A *Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウス B 野生型マウス

(3) *NODAL* バリエントの *in vitro* 機能解析

患者家系で同定された *NODAL*、*TBX20* 遺伝子のバリエントを導入

した培養細胞では、野生型に比較して、ルシフェラーゼ活性が有意に低下しており、これらのバリエントは機能低下をもたらすと考えられた (図 5)。また、*NODAL* バリエントの共役受容体、共役因子によるシグナル増強効果や、*NODAL* の制御を受ける *Smad2*、*Smad3* のリン酸化の程度は野生型と有意な差を認めなかったが、*NODAL* バリエントにおける p-*Smad2*、

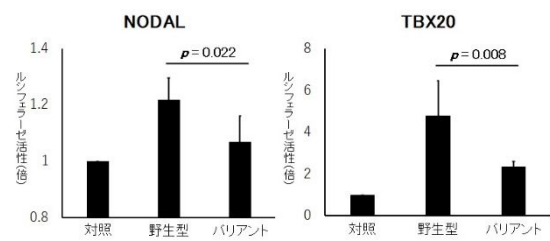


図 5. *NODAL*、*TBX20* のルシフェラーゼアッセイ

p-*Smad3* の核内移行は、野生型と比較してより低下している傾向が認められた (図 6)。

以上の所見から、*Nodal* および *Tbx20* の機能低下により先天性心疾患、特に心室中隔欠損を生じ、心不全により胎内死亡をきたす、*Nodal* および *Tbx20* の機能低下は肺血管の過剰な増生を招き、心室中隔欠損などを介する左右短絡の増加や肺高血圧の原因となる、*Tbx20* の機能低下は、胎仔の心室中隔の心筋細胞のアポトーシスを引き起こし、心室中隔欠損を生じる、*Nodal* の標的分子である *Pitx2* は、*Tbx20* の制御も受け、*Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスではより *Pitx2* の機能低

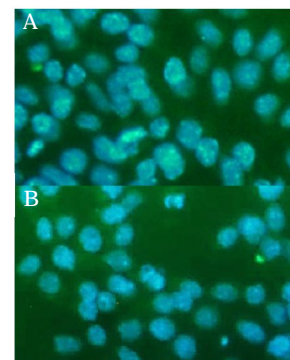


図 6. p-smad2、p-smad3 の核内移行 (蛍光緑色) A 野生型 B *Nodal* バリエント

下が起こり、心疾患が重症化する可能性が考えられた。また、*Tbx20* ヘテロマウスに合併した心室中隔欠損の頻度が出生後に低下したことから、心室中隔欠損により、出生直前または直後に心不全で死亡する可能性のほか、ヒトでしばしば認められる出生後の自然閉鎖の可能性も考えられた。*Nodal/Tbx20* ダブルヘテロマウスでは、提示した家族例に認められたような腹部内臓錯位、複雑心疾患は再現されず、器官発生における種による遺伝的感受性の差が示唆された。今後、心室中隔発生における TBX20 の関与をより明らかにすることで、現在不明である心室中隔欠損の発生や自然閉鎖の分子的機序が解明されることが期待される。

<引用文献>

- 1) 山岸敬幸. 左右軸の決定と内臓錯位症候群. 日小児循環器会誌 2018; 34: 99-104
- 2) Zhou X et al. Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. Nature 1993; 11: 543-547
- 3) Qian L et al. Transcription factor neuromancer/TBX20 is required for cardiac function in Drosophila with implications for human heart disease. PNAS 2008; 108: 19833-19888
- 4) Stennard FA et al. Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. Development 2005; 132: 2451-2462
- 5) Cai CL et al. T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. Development 2005; 132: 2475-2487
- 6) Singh MK et al. Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. Development 2005; 132: 2697-2707
- 7) Kodo K et al. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF- β signalling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy. Nature Cell Biology 2016; 18: 1031-1042

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	内田 敬子 (Uchida Keiko) (50286522)	慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・准教授 (32612)	

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