

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17318

研究課題名(和文)胎生期の心臓房室弁・中隔形成における心室筋転写因子カスケードの意義

研究課題名(英文)Ventricular transcription factor cascade in the formation of atrioventricular valve and septum during embryonic heart development.

研究代表者

瀬谷 大貴 (Seya, Daiki)

東京慈恵会医科大学・医学部・ポスドクトラルフェロー

研究者番号：30806021

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)：本研究では、Hey2とその上流-下流転写因子カスケードによって制御される心臓形態形成機構と、その破綻によって生ずる形態異常メカニズムの解明を目指した。研究代表者らは、Mef2c-AHF-Creマウス系統を用いて右心室および心室中隔筋に特異的なHey2コンディショナルノックアウト(cK0)マウスを樹立し、Hey2がTbx2依存性のMycn発現抑制を緩和することで胎生期の右心室発生に重要な役割を担っていることを証明した。また、Hey2自身の発現を制御する上流機構の解析において心室筋Hey2発現に必須である遠位エンハンサーを同定し、GataおよびTbx20によって活性化を受けていることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性心疾患は新生児の1%に認められる発症頻度の高い疾患であり、胎生期心臓形成の分子基盤を明らかにすることは、その病因究明や、新規治療薬の開発につながる重要な課題である。Hey2 K0マウスで観察される心臓形態異常(心室中隔欠損、三尖弁閉鎖および右心室低形成)は、ヒト先天性心疾患にも認める典型的な構造異常であり、本研究結果は、これらの疾患の病因として右心室心筋での遺伝子発現の調節異常が関与していることを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the significance of Hey2 and the upstream/downstream transcription factor cascade in cardiac morphogenesis and the mechanisms of morphological abnormalities, such as ventricular septal defect, dysplastic tricuspid valve and hypoplastic right ventricle, caused by the Hey2 gene deletion. We generated Hey2 conditional knockout (cK0) mice specific to the myocardium of the right ventricle and ventricular septum using the Mef2c-AHF-Cre mouse strain and demonstrated that Hey2 played an important role in right ventricular development, at least in part, through mitigating the Tbx2-dependent inhibition of Mycn expression. In the analyses of the upstream transcriptional regulation of Hey2 expression, we identified a distal Hey2 enhancer that was activated by Gata and Tbx20 and was essential for Hey2 expression in the ventricular myocardium.

研究分野：循環器医科学

キーワード：先天性心疾患 転写調節因子 発現制御 ノックアウトマウス 形態形成 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

Hey2 は、胎生期の心室心筋および心内膜で発現する塩基性ヘリックスループヘリックス (bHLH) 転写調節因子である (Nakagawa et al. Dev Biol 1999)。Hey2 遺伝子のノックアウト (KO) マウスは心室中隔欠損 (VSD)、三尖弁閉鎖 (TA)、および右心室低形成を併発して生後早期に死亡する (Donovan et al. Curr Biol 2002, Xin et al. PNAS 2007)。先行研究では、Hey2 KO マウスの心室心筋において心房特異的遺伝子の異所性発現が誘導されること (Koibuchi et al. Circ Res 2007, Xin et al. PNAS 2007)、Hey2 が自身の DNA 結合だけでなく、他の転写因子との複合体形成によって下流遺伝子の転写を制御していることが明らかになっているが (Kathiriyai et al. J Biol Chem 2004, Stefanovic et al. Nat Commun 2014)、Hey2 が制御する遺伝子発現と心臓形態異常の相関については、いまだ不明な点が多い。研究代表者らは予備実験において、Mef2c-AHF-Cre マウス系統 (Verzi et al. Dev Biol 2005) を用いて右心室および心室中隔筋に特異的な Hey2 コンディショナル KO マウスを作製し、Hey2 KO マウスに認める心臓形態異常がすべて再現されることを見出した。さらに所属研究グループでは、最近実施した Hey2 発現の上流転写制御機構の解析において Hey2 遺伝子の 210kb 上流に存在する遠位エンハンサーを同定し、この遠位エンハンサーが心室筋での Hey2 発現に重要である可能性が考えられた (研究開始当初は未発表、Ihara et al. Dev Biol 2020)。

2. 研究の目的

本研究では「Hey2 とその上流-下流転写因子カスケード」によって制御される正常な心臓形態形成機構と、その破綻によって生ずる心室中隔、三尖弁および右心室形態異常のメカニズムについて明らかにする。

3. 研究の方法

課題 1. 領域特異的 Hey2 コンディショナル KO (cKO) マウスの心臓表現型の評価

右心室および心室中隔筋に特異的な Hey2 cKO (以下単に「Hey2 cKO」と称する。) マウスで VSD、TA および右心室低形成が生ずる過程を正しく理解するために、Hey2 cKO マウス胚 (胎生 (E) 12.5-E17.5 日) において心臓形態の変化を経時的に観察した。さらに microCT イメージングならびに組織切片作製によって Hey2 cKO マウス (生後 0 日) 心臓の表現型を詳細に評価した。

課題 2. 遺伝子発現解析に基づく Hey2 機能の理解 : Hey2-Tbx2 経路による右心室形成の制御

Hey2 cKO マウスの心臓において異常調節される遺伝子を同定するために、Hey2 cKO マウス胚 (E12.5 日) の右心室心筋を用いて RNA-seq 解析を実施した。発現変動が検出された複数の候補遺伝子について定量 PCR 解析ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションを実施して、これらの遺伝子の心室心筋での発現量および発現様式を比較した。さらに Hey2 cKO および KO マウス胚の心室内の各領域 (右心室、左心室および心室中隔) における S 期細胞数の割合を EdU incorporation assay によって測定し、右心室低形成と心筋細胞増殖の関連性について検討した。

課題 3. Hey2 心室発現を制御する上流シグナル機構の理解 : Tbx20-Hey2 経路の重要性

所属研究グループで同定した Hey2 心室筋エンハンサーの転写活性をさらに検証するために、この DNA 領域を CRISPR/Cas9 ゲノム編集によって欠かさせた (Hey2 心室筋エンハンサー欠失) マウスを作製し、当該マウスにおいて Hey2 遺伝子発現を確認した。さらに HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによって Hey2 心室筋エンハンサーの活性化因子を探索した。また Tbx20 KO マウス胚の心臓において Hey2 心室筋エンハンサー活性を確認した。

4. 研究成果

課題 1. 領域特異的 Hey2 欠失マウスの心臓表現型の評価

Hey2 cKO マウスの表現型解析によって胎生期心臓の右心室心筋における Hey2 発現の重要性が示された。Hey2 cKO マウス心臓の microCT 画像ならびに組織切片では、VSD(14 例中 9 例)、TA(14 例中 8 例)および右心室低形成(14 例中 14 例)が明瞭に示された。心臓弁や乳頭筋などの他の心臓内構造には明らかな異常は認めなかった。観察したすべての個体において右心室低形成を認めたが、TA および VSD は一部の個体のみであったことから、Hey2 cKO マウス胚での右心室低形成は TA に起因したものではなく、Hey2 発現は本質的に右心室の発生に必須である可能性が高いと考えられた。R26R-LacZ レポーターマウスを用いて Mef2c-AHF-Cre 発現細胞系譜(LacZ 陽性細胞)の心臓における分布(E12.5 日)を確認したが、正常と Hey2 cKO 個体の間で LacZ 陽性細胞の分布パターンに違いはなかった。

Hey2 cKO マウス胚の心臓形態観察において、E12.5 日では正常マウスと同様に両心室はどちらも球形をしており、明らかな異常は認めなかった。正常マウス胚の両心室は E13.5 日から頂底軸に沿って伸長し始めるが、Hey2 cKO マウス胚の心臓では右心室は球形のままほとんど伸長せず(左心室は伸長)、右心室低形成をきたすことが明らかになった。

課題 2. 遺伝子発現解析に基づく Hey2 機能の理解 : Hey2-Tbx2 経路による右心室形成の制御

Hey2 cKO マウス胚(E12.5 日)の右心室心筋における RNA-seq 解析によって、68 遺伝子に 1.5 倍以上の発現変動が検出された。Hey2 cKO 胚の右心室心筋で発現が増加した遺伝子のうち Tbx2、Ntn4 および Cldn11 について、また発現が減少した遺伝子のうち Tnnt1、Tnni2 について定量 PCR 解析を実施した。これら遺伝子の発現量の違いは、RNA-Seq と定量 PCR 解析の間で高い再現性が見られた。T-box 因子 Tbx2 は正常心臓では非心室心筋(流出路および房室管)で限局的に発現する(Harrelson et al. Development 2004, Abrahams et al. IUBMB life 2010)。我々の in situ ハイブリダイゼーションにおいても、正常胚(E12.5 および E14.5 日)での Tbx2 発現は流出路のみ認め、心房・心室心筋には認めなかった。一方、Hey2 cKO および KO マウス胚では、いずれも右心室心筋において Tbx2 発現が異所性に誘導された。

トランスジェニック(Tg)マウスを用いた先行研究において、Tbx2 を心臓で過剰発現させると、Mycn 発現が抑制され、心筋細胞の増殖が低下すると報告されていた(Dupays et al. Dev Biol 2009)。我々は Hey2 cKO および KO マウス胚の右心室での Tbx2 の過剰発現が、右心室心筋細胞の増殖に影響を与えているのではないかと推察し、定量 PCR 解析ならびに in situ ハイブリダイゼーションによって Hey2 cKO および KO マウス胚心臓での Mycn 発現を確認した。Hey2 cKO および KO マウス胚(E14.5 日)の右心室では、Mycn の mRNA 量がいずれも著明に減少していた。また CRISPR/Cas9 ゲノム編集によって Tbx2 KO マウスを作製して、Tbx2 依存的な Mycn 発現の制御を検証したところ、Tbx2 KO 胚(E9.5 日)心臓では Mycn の mRNA 量が有意に増加することが示された。さらに EdU incorporation assay では、Hey2 cKO および KO マウス胚(E14.5 日)の右心室および心室中隔では S 期細胞の割合がいずれも有意に減少しており、これらの心室内領域において心筋細胞の分裂頻度が低下していることが明らかになった。

胎生期心臓における心筋細胞分化のマーカーであるナトリウム利尿ペプチド ANP および BNP の mRNA 量を定量 PCR 解析によって測定した。Hey2 cKO および KO マウス胚(E14.5 日)のいずれにおいても、ANP の mRNA 量は右心室において著明に減少していたが、対照的に左心室では明らかに増加していた。BNP の mRNA 量は右心室では変化せず、左心室でのみ明らかに増加していた。Tbx2 は ANP 遺伝子の転写を抑制することが知られており(Habets et al. Genes Dev 2002)、Hey2 cKO および KO マウス胚右心室での ANP mRNA 量の減少は、当該マウス胚の右心室において Tbx2 発現が異所性に誘導されたことによるものと推察された。一方、Hey2 cKO および KO マウス胚の左心室において ANP および BNP の mRNA 量が増加する理由については今後の検討が必要である。

課題 3. Hey2 心室発現を制御する上流シグナル機構の理解 : Tbx20-Hey2 経路の重要性

Hey2 心室筋エンハンサーの意義をさらに検証するために、Hey2 心室筋エンハンサー欠失マウス胚における Hey2 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって確認した。Hey2 心室筋エンハンサー欠失マウス胚(E9.5 日)では、心室筋での Hey2 発現が消失した。また心室筋エンハンサー上の Gata4 および T-box 因子の DNA 結合モチーフ(塩基配列)に、点変異もしくは欠失変異を導入した LacZ レポーター-Tg マウスにおいて Hey2 心室筋エンハンサーの活性を確認したところ、これらのマウスでは Hey2 心室筋エンハンサーの活性が著明に低下した。さらに HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは、Gata4 および Tbx20 が Hey2 心室筋エンハンサー活性を相乗的に上昇させることが示された。

T-box 因子 Tbx20 に着目して、Tbx20 KO マウス胚で Hey2 心室筋エンハンサー活性を確認したところ、Tbx20 KO マウス胚(E8.5 および E9.5 日)心臓では Hey2 心室筋エンハンサー活性が完全に消失した。

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 4件）

1. 著者名 Seya Daiki, Xu Yuqing, Mukunoki Toshifumi, Tsujita Kenichi, Nakagawa Osamu, Arima Yuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Sample Preparation for Computed Tomography-based Three-dimensional Visualization of Murine Hind-limb Vessels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of visualized experiments : JoVE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/63009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Seya Daiki, Ihara Dai, Shirai Manabu, Kawamura Teruhisa, Watanabe Yusuke, Nakagawa Osamu	4. 巻 63
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 Development, Growth & Differentiation	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Yusuke, Seya Daiki, Ihara Dai, Ishii Shuhei, Uemoto Taiki, Kubo Atsushi, Arai Yuji, Isomoto Yoshie, Nakano Atsushi, Abe Takaya, Shigeta Mayo, Kawamura Teruhisa, Saito Yoshihiko, Ogura Toshihiko, Nakagawa Osamu	4. 巻 295
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 Journal of Biological Chemistry	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀬谷大貴、赤池徹、岩瀬晃康、栗原裕基、南沢享
2. 発表標題 Changes in the transcriptional profile of rat pulmonary veins before and after birth
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬谷大貴、赤池徹、南沢享
2. 発表標題 周産期におけるラット肺静脈の転写プロファイルの検討
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 / 第27回日本小児肺循環研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬谷大貴、赤池徹、南沢享
2. 発表標題 Transcriptional profiles of the rat pulmonary vein during a perinatal period
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術大会 / 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021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 Hey2 expression in the right ventricle and interventricular septum is essential for cardiac morphogenesis
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------