

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370084

研究課題名 (和文) TBX5 による転写制御の新展開

研究課題名 (英文) New aspects of transcriptional control by Tbx5

研究代表者

小椋 利彦 (OGURA TOSHIHIKO)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

研究成果の概要 (和文)：

心臓は、遺伝子の働きによって初期発生がコントロールされ、拍動する心臓が形成される (genetic program)。しかし、一旦拍動する心臓が形成されると、拍動、血流がその後の心臓発生に大きく影響すると考えられている (epigenetic program)。これは、遺伝子が形態や機能を作り出す順経路とは逆に、機能 (拍動や心拍) に起因する力刺激が遺伝子発現を変えて心臓発生を調節する逆経路が存在することを意味している。この双方向の調節関係が成り立つことで、心臓をはじめとするさまざまな器官形態の合目的性、恒常性が維持されると考えられる。本研究は、力刺激と遺伝子発現を結びつける分子実体を明らかにすることで、いまだ未解決のシグナル伝達経路の一端を解明することを目的とする。

研究成果の概要 (英文)

In the early stages of cardiac development, the genetic program regulates differentiation of cardiomyocytes and the initial morphogenesis of heart tube. However, once heartbeat commences, physical forces generated by heartbeat and/or blood circulation become an epigenetic factor that control several aspects of heart development.

In this project, we have identified MKL2 as a robust co-activator for Tbx5, one of the key regulators of cardiogenesis. Interestingly, MKL2 shuttles between cytoplasm and nucleus, in a mechanical stimulus-dependent way. In zebrafish heart, MKL2 is in the cytoplasm when heartbeat is arrested, whereas it is in the nucleus in the presence of heartbeat, indicating that Tbx5 is active in the beating cardiomyocyte. In addition, pressure-overload to the left ventricle of mouse hearts also induces nuclear shuttling of Tbx5, highlighting MKL2 as a transducer of mechanical signals.

To expand our knowledge on physical forces, we have identified several transcription factors that shuttle into nucleus in response to stretch and shear stresses. In addition, we also found that several miRNAs are induced in developing heart by physical forces (For example, expression of miR-21 is turned off when heartbeat is arrested, yet is rapidly and strongly induced by heartbeat.).

In this project, we discovered several key force-dependent regulators of cardiogenesis, which will open a new way to explore a novel signal transduction system that is essential for development and homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：TBX、MKL2、機械的刺激、心拍、血流

1. 研究開始当初の背景

心臓は、GATA4、Nkx-2.5、Tbx5 等を中心とした遺伝子の働きによってその初期発生がコントロールされ、拍動する心臓が形成される。しかし、一旦拍動する心臓が形成されると、拍動、血流がその後の心臓発生に大きく影響すると考えられている。このような知見は、主にゼブラフィッシュで研究されてきており、例えば、ビーズを心臓内に挿入して血流を乱すと、looping、心房心室境界部の弁形成に異常が起る (Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. Nature, 421, 172-177, 2003)。また、Troponin に突然変異をもち、心拍を起こさない変異体 silent heart でも、このような発生異常が観察され、とくに心内膜床、心内膜床に由来する房室弁の奇形が頻発する (Early myocardial function affects endocardial cushion development in zebrafish. PloS Biol. 2, E129, 2004)。同様の現象は、マウスにおいても報告されている (Targeted disruption of the cardiac triponin T gene vauses sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo. Dev. Biol. 322, 65-73, 2008)。

このような研究の多くは、胚が透明で、しかも発生初期には心拍が停止していても経皮的に酸素を吸収して発生するゼブラフィッシュを用いて研究され、ヒトの先天性心疾患のモデルとして期待されている。とくに、ヒトの先天性心疾患の患者には、一卵性双生児での発症に差があり、また、遺伝子異常を持たないケースが多く、その原因の多くは、遺伝子要因以外に求められる。したがって、モデルとして実験が容易なゼブラフィッシュをモデルとして詳細に解析し、その知見をヒトなどの高等ほ乳動物の応用するのが現時点で急務であり、また唯

一検証可能な系であると考えられる。

2. 研究の目的

動物と植物の最大の違いは、動くこと、運動することである。運動は、組織に対する機械的刺激として働き、この物理的刺激は遺伝子発現などの生化学的な反応を引き起こす。運動は筋肥大や全身の代謝改善を起こすし、心拍増大、心肥大を起こす。とくに心臓は、遺伝子の働きによって初期発生がコントロールされ、拍動する心臓が形成される (genetic program)。しかし、一旦拍動する心臓が形成されると、拍動、血流がその後の心臓発生に大きく影響すると考えられている (epigenetic program)。ヒトの先天性心疾患の患者には、遺伝子異常を持たないケースが多く、その原因は、genetic program の異常というより、epigenetic program の破綻が主因と考えられる。この研究をさらに発展させるため、Tbx5 が転写活性化因子として機能する上で必須と考えられる co-activator の単離を行ない、複数の候補遺伝子を同定した。そのひとつ MKL2 は、Tbx5 と協調的に働いて下流標的遺伝子である ANF (Atrial Natriuretic Factor, Nppa) 遺伝子の転写を強力に活性化することを見いだした。ANF は、循環血液量の増大に起因する心筋への機械的刺激 (hemodynamic stress、伸展刺激) によって分泌される利尿ホルモンで、循環血液量の恒常性の維持に中心的な役割を果たす因子である。また、循環動態の破綻を意味する心不全の臨床的な指標でもある。このことは、Tbx5 が MKL2 と協調して機械的刺激受容伝達系に関与し、循環動態の恒常性維持、その破綻としての心不全発症にも関与していることを示唆している。

本研究は、このような視点に立って、Tbx5 の転写因子としての性質を詳細に解析し、これから派生する心臓の機械的刺激の受容と反応系の解明を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) MKL2 の細胞内局在が心拍／血流、機械的力学刺激に依存しているか？

心臓特異的なプロモーターに MKL2-EGFP 融合遺伝子を接続し、ゼブラフィッシュ受精卵に導入する。胚発生を進め、BDM などの薬剤で心拍／血流を止め、EGFP シグナルを検出することによって MKL2 の心筋細胞内局在を観察する。また、マウス MKL2 遺伝子の exon10 に b-gal 遺伝子が挿入された個体を得たので、TAC (Transverse Aortic Coarctation) によって左室に圧負荷を加え、心筋の細胞質分画、核分画を調整し、b-gal 抗体で western blotting を行って、マウス MKL2 蛋白質の挙動を観察する。

加えて、MKL2-EGFP 融合遺伝子を発現する培養細胞に、伸展刺激印加装置で力学刺激を加え、MKL2 の挙動をみる。

#### (2) 心臓形態のパラメーターの中で、心拍／血流依存的なものは何か？

発生過程のゼブラフィッシュの心臓を用い、細胞分裂頻度、細胞分裂方向、心筋細胞の形態 (極性)、心臓全体の形態を定量的に解析し、心拍／血流依存的な発生現象を見つけ出す。

#### (3) MKL2 が活性化する転写因子

MKL2 が転写活性化する因子に SRF があるが、本研究ではこれ以外に Tbx5 を同定した。MKL2 KO マウスの表現型、ゼブラフィッシュでの mk12 ノックダウンの表現型から、MKL2 が影響する転写因子は、他にもあることが示唆される。表現型の解析から推測される転写因子を使い、培養細胞を用いた luciferase assay を行い、MKL2 が活性化する転写因子を同定する。

#### (4) 心拍／血流、機械的力学刺激によって誘導される遺伝子、miRNA の同定とその発生過程での意義

発生過程の胚を用いて各種遺伝子の発現パターンを網羅的に記載してデータベースが、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルで作られている。これらのデータベースから、心臓の中でも機械的刺激が強い部分 (例えば、形成途中の房室弁)、力刺激が加わる組織 (例えば、骨、骨格筋) に限局して発現する遺伝子を見つけ、whole mount in situ hybridization 法を用いて、発現パターンを検証し、心拍を止めた後の発現消失を指標として心拍／血流依存的な遺伝子を同定する。検索は、miRNA の発現パターンも含む。

#### (5) 培養細胞に機械的力学刺激を負荷する

### 技術開発

東北大学工学部との共同研究で、培養細胞を伸展する装置、血流を模したせん断応力を細胞に負荷する装置を作製する。

### 4. 研究成果

#### (1) MKL2 の細胞内局在が心拍／血流、機械的力学刺激に依存しているか？

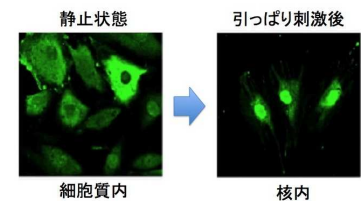
ゼブラフィッシュに発現させた MKL2 は、心拍心筋細胞では核内に局在することが確認された。しかし、心拍を BDM によって止めると、MKL2 は細胞質に移行した。このことは、MKL2 が心拍に依存して細胞内局在を変えることを意味している。

また、マウスでは大動脈結紮 (TAC) による左心室圧負荷によっても核移行

を示す (左図)。また、圧負荷がからない右室では核内の MKL2 量に変化は認められない。

In vitro の検証として、培養細胞に伸展刺激を加えて MKL2 の細胞内局在を検証した。

その結果、伸展によって MKL2 が核内に移行することが示された (右図)。このこと



は、MKL2 の細胞内局在を規定する因子が、細胞にかかる力学刺激であると推察できる。また、Tbx5 の転写因子としての活性は、細胞／組織への力刺激が重要であり、また胎仔／成体心臓においては心拍、血圧などの力学的要因が関与していることがわかった。

#### (2) 心臓形態のパラメーターの中で、心拍／血流依存的なものは何か？

ゼブラフィッシュを用い、心拍している心臓、心停止している心臓で、細胞分裂頻度、細胞分裂方向、心筋細胞の形態 (極性)、心臓全体の形態を計測した。その結果、呈ししている心臓では、分裂頻度が低下し、心筋細胞は丸くなることがわかった。一方、正常に拍動しながら発生している心臓では、心筋細胞は拍動方向に長く伸びていることが確認された。これは心臓の極性を持った形態が心拍に依存していることを示している。

興味深いことに、心室心筋細胞の分裂方向は、血流に直行する分裂軸 (心拍

と同じ方向)を持つことがわかった。心拍を止めると分裂頻度は低下するが、それでも分裂する細胞が認められ、そのような分裂細胞の分裂方向はランダムとなった。これに対し、心房心筋細胞は拍動していても、停止していてもランダムな方向に分裂することが明らかとなった。この事実は、心筋細胞の分裂方向が、心拍や血流が生む力学刺激の方向によって規定されることを意味している。また、心室と心房の心筋細胞では、力学刺激に対する反応に違いがあることもわかった。

### (3) MKL2 が活性化する転写因子

複数の転写因子を発現ベクターに組み込み、種々のレポーター-luciferaseコンストラクトと共導入して、MKL2が活性化する転写因子を2つ同定した。これらの転写因子は、心筋細胞のエネルギー代謝を調節すると報告されているものであった。このことは、血圧上昇、循環血液量の増大等の力学刺激負荷が、MKL2の核内シヤトルを誘導し、エネルギー代謝を活性化して心拍に必要なATPを産生させることを意味している。すなわち、MKL2は循環動態への適応をエネルギー産生の基盤から支えていると言える。同時に、MKL2を用いた研究から、心不全末期に起こる代謝シフト(脂質代謝から糖代謝へ)、ATP不足による拍動不全を治療する方法を見いだすことができるかもしれない。現在、その詳細を検討中である。

### (4) 心拍/血流、機械的力学刺激によって誘導される遺伝子、miRNA の同定とその発生過程での意義

力依存的な発現を示すmiRNAを探索し、複数同定した。とくに、miR-143、miR-21はゼブラフィッシュの心臓において、それぞれ大動脈管、房室弁に局限して発現するが、両者とも心拍/血流を止めると発現が消失し、再開させると速やかに発現が回復することがわかった。また、それぞれのmiRNAの機能阻害を行うと、大動脈の形態異常や房室弁の完全欠損が起こることがわかり、血流が心臓発生に影響する一端を明らかにすることができた。

また、miR-143、miR-21のプロモーター/エンハンサー部位にはSRF結合部位が存在し、MKL2と協調して発現誘導することも確かめた。また、このようなプロモーター/エンハンサーを用いて力刺激に対する遺伝子発現を可視化することも可能となった。とくに、miR-21は心筋切除や尾ヒレ切除による組織再生誘導時にも発現誘導される。miR-21の標的として、pdc4、sprouty、ptenなどを同定したが、このことから、組織損傷、座滅といった力学刺激がmiR-21の発現誘導を介して細胞増殖、apoptosisを調節して再生を引き起こす可能性を指摘できる。機械的刺激と再生誘導は、今後、重要なテーマであると思

われる。

### (5) 培養細胞に機械的力学刺激を負荷する技術開発

ステッピングモーターなどを組み合わせて細胞を伸展する機器を試作した。伸展機能は通常の実験に充分で、しかも、1台数千円で作製することができる。しかも、伸展に用いるシリコン皿の形状を自由に選べることから、今後の力学刺激実験にきわめて有効なシステムである。

この伸展システムを用いて、C2C12細胞を2日間伸展刺激を加えながら培養すると、網目模様の筋管パターンが自律的に形成されることがわかった。培養液に、分化誘導因子を加えること無く、C2C12細胞を骨格筋細胞に分化させることができる。しかも、筋管形成が自発的に起こる。

今後、ES、iPS細胞等、さまざまな細胞を伸展し、分化と自発的パターン形成を解析することが可能となった。

## 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7件) 以下査読あり

1; Heartbeat regulates cardiogenesis by suppressing retinoic acid signaling via expression of *miR-143*. Kota Y. Miyasaka, Yasuyuki S. Kida, Toshihiro Banjo, Yosuke Ueki, Kazuaki Nagayama, Takeo Matsumoto, Masaaki Sato, Toshihiko Ogura **Mechanism of Development** 128, 18-28, 2011

2; Tanaka J, Harada H, Ito K, Ogura T, Nakamura H (2010) Gene manipulation of chick embryos in vitro, EC culture, and long survival in transplanted eggs. **Dev Growth Differ** 52, 629-634.

3; Expression and proliferation-promoting role of Diversin in the neuronally committed precursor cells migrating in the adult mouse brain. Makiko Ikeda, Yuki Hirota, Masanori Sakaguchi, Osamu Yamada, Yasuyuki S. Kida, Toshihiko Ogura, Takanobu Otsuka, Hideyuki Okano, Kazunobu Sawamoto **Stem Cells** 28, 2017-2026, 2010

4; Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by

non-muscle myosin II. Yuki Hirota, Alice Meunier, Shihhui Huang, Togo Shimozawa, Osamu Yamada, Yasuyuki S Kida, Masashi Inoue, Tsubasa Ito, Hiroko Kato, Masanori Sakaguchi, Takehiko Sunabori, Masa-aki Nakaya, Shigenori Nonaka, Toshihiko Ogura, Hideo Higuchi, Hideyuki Okano, Nathalie Spassky, and Kazunobu Sawamoto **Development** 137, 3037-3046 (2010)

5; Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. Takumi Ito, Hideki Ando, Takayuki Suzuki, Toshihiko Ogura, Kentaro Hotta, Yoshimasa Imamura, Yuki Yamaguchi, Hiroshi Handa **Science** 327, 1345-1350 (2010)

6, Tracing retinal fiber trajectory with a method of transposon-mediated genomic integration in chick embryo. Hidekiyo Harada, Yoshiko Takahashi, Koich Kawakami, Toshihiko Ogura, Harukazu Nakamura **Development, Growth & Differentiation** 50, 697 (2008)

7, Congenic method in the chick limb buds by electroporation. Takayuki Suzuki, Toshihiko Ogura **Development, Growth & Differentiation** 50, 459 (2008)

[学会発表] (計 8 件)

1) 武田孟、八幡慎太郎、清水正宏、宮本浩一郎、宮坂恒太、浅野豪文、吉信達夫、八尾寛、小椋利彦、石黒章夫  
機械刺激応答を活用した筋細胞アクチュエータの自己組織的創成  
第 11 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2010) 2010 年 12 月 23 日 仙台

2) 武田孟、八幡慎太郎、清水正宏、宮本浩一郎、宮坂恒太、浅野豪文、吉信達夫、八尾寛、小椋利彦、石黒章夫  
機械刺激応答を活用した筋細胞アクチュエータの高効率生成  
第 28 回 日本ロボット学会 学術講演会 2010 年 9 月 22 日 名古屋

3) 武田孟、八幡慎太郎、清水正宏、宮本浩一郎、宮坂恒太、吉信達夫、小椋利彦、石黒章夫  
機械刺激応答を活用した筋細胞マイクロアクチュエータの開発  
ROBOMECH2010 講演会 2010 年 6 月 14 日 旭川

4) 小椋利彦, Physical force generated by cells and sensed by cells, 2nd Joint Meeting of the SFB and JSDB 2010 - From Cells to Organs. Pasteur Institute 2010 年 5 月 28 日 Paris

5) 小椋利彦, 分生生物学会ワークショップ 2W8 細胞による機械的ストレス感知の分子機構 2009 年 12 月 10 日 横浜

6) 小椋利彦, Physical force generated by cells and sensed by cells, 日本機械学会 基調講演 2009 年 9 月 14 日 盛岡

7) 小椋利彦, Physical force generated by cells and sensed by cells, 岩手小児科医会 2009 年 7 月 25 日 盛岡

8) 小椋利彦, Physical force generated by cells and sensed by cells, 日本細胞生物学会シンポジウム 2009 年 6 月 2 日 名古屋

[図書] (計 4 件)

1: Electroporation into the limb: beyond misexpression Takayuki Suzuki & Toshihiko Ogura Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, Springer, p85-p97(2009)

2 ; サリドマイド催奇性の原因因子の発見  
伊藤拓水、安藤秀樹、鈴木孝幸、小椋利彦、山口雄輝、半田宏. 実験医学 vol. 28, vol. 13 (8月号), 2115-2118 (2010)

3 ; メカニカルストレスと転写制御 宮坂恒太、木田泰之、小椋利彦. 生化学第 81 巻、第 6 号、pp. 494 - 501 (2009)

4 ; 細胞動態に伴うメカニカルストレスによる転写制御 木田泰之 小椋利彦 実験医学 第 26 巻、第 14 号 2204-2209 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/devn/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小椋 利彦 (OGURA TOSHIHIKO)  
東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：