

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06203

研究課題名(和文) 心臓発生におけるPitx2遺伝子の極性をもった発現の役割

研究課題名(英文) Role of left atrium-restricted expression of Pitx2 in mouse heart development

研究代表者

小柴 和子 (Koshiba-Takeuchi, Kazuko)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30467005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Pitx2の極性をもった発現が中隔形成や心臓機能に与える影響を明らかにするために、Pitx2を心臓全体に発現するマウス(Pitx2異所性発現マウス)を作出し、解析を行った。Pitx2異所性発現マウスは胎生12.5日目頃に致死となり、房室管の形成に顕著な異常が認められた。また、心房中隔の形成不全や右心房の個性が阻害される表現型が認められた。シングルセルRNA-seqを行い、細胞種ごとにPitx2異所性発現心臓において発現が変化している遺伝子の探索を行った結果、心筋で洞房結節マーカー遺伝子の発現が減少していること、さらには細胞外基質の分解や合成に関わる因子の発現が大きく変化していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pitx2は体軸の左右性形成に重要な転写因子であり、左側の側板中胚葉での発現が左心房特異的な発現へと維持される。Pitx2を機能阻害すると、心臓の低形成、房室管の異常、流出路の異常などが引き起こされることが報告されている。さらに、近年、不整脈との関連も明らかになっている。これまで、心臓発生におけるPitx2の機能解析は主に機能阻害を用いて行われており、過剰発現による解析はほとんど行われてこなかった。本研究から得られた成果は、心臓発生にはPitx2の適正な発現が重要であることを示し、また房室管形成に関与する新たな分子メカニズムの提唱につながる。

研究成果の概要(英文)：To understand the significance of left atrium-restricted expression of Pitx2 in mouse heart development, we generated mice in which Pitx2 is expressed throughout the heart. Pitx2-overexpressed mice were lethal at around embryonic day 12.5, and the formation of the atrioventricular canal was significantly altered. In addition, an atrial septal defect and impaired right atrial identity were caused. We performed single-cell RNA-sequencing to clarify the genes responsible for the phenotypes of Pitx2-overexpressing hearts in different cell types. As a result, we found that the expression of sinus node marker genes was reduced and the genes involved in extracellular matrix degradation and synthesis were altered in the myocardium.

研究分野：心臓発生

キーワード：心臓 発生 転写因子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の2心房2心室の心臓は、肺を呼吸器官とする陸上生活に適した構造であり、心房中隔、心室中隔を獲得することにより、静脈血と動脈血を完全に分けることのできる2重循環系(double circulation system)を構築した。鰓を呼吸器とする魚類では心臓に中隔は存在せず心臓には静脈血が流れる単循環系(single circulation system)である。哺乳類の心臓発生においても、発生初期には心臓に中隔は存在しない。マウスでは受精後10-11日目で心房と心室に中隔が形成されるが、中隔形成に異常が生じるとヒトでは中隔欠損症を引き起こす。先天性心疾患は新生児の100人中1人に認められる非常に発症頻度の高い疾患であるが、そのうちの60%以上を心房と心室の中隔欠損が占めている。欠損の程度に差こそあれ、中隔形成は非常に異常の起こりやすい発生過程であり、また合併症も生じやすい。従って、中隔形成メカニズムを知ることは脊椎動物がどのように陸上生活に適した血液循環システムを発達させていったかを知るだけでなく、心臓中隔欠損症の発症原因を知ることにもつながる。また、心房は左右の違いが明確であり、右心房には心臓を動かすための電気信号を作り出す洞房結節(ペースメーカー)が存在する。心房に極性をもって発現する因子は、心房中隔形成に加えて、心房の左右の特性の決定に関与していることも考えられる。本研究は心房に極性をもって発現する因子に着目することにより、心房中隔形成機構および心房の左右性形成と右心房特異的な構造の形成機構をも明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

これまで心房中隔形成に関わる研究は、マウスの心房に発現している因子や、ヒトの心房中隔欠損症で原因遺伝子が分かっているものを中心に行われてきた。これらの解析により、心房中隔形成に関わる因子の断片的な情報は得られているが、それらをつなげて説明できるような状態には至っていない。我々はこれまでの研究において、心室中隔形成に関わる因子を進化化学的な側面から明らかにしてきた。進化的に心室中隔が獲得されたと考えられる爬虫類の心臓発生に着目し、*Tbx5*の左心室への局在が心室中隔の獲得に伴って観察されること、またマウスを用いた解析で*Tbx5*の左心室への極性を乱すと心室中隔形成が異常になることから、*Tbx5*の極性をもった発現が心室中隔形成に重要であることを見出した。また、*Tbx5*陽性細胞の系譜追跡実験から、心筒形成前の*Tbx5*の発現境界に心室中隔が形成されることを明らかにした。我々は、同様のメカニズムが心房中隔形成にもはたらいていると考え、左心房に極性をもって発現する*Pitx2*に着目した。*Pitx2*が右心房を含む心臓全体に発現するマウスを作出し、*Pitx2*の異所的な発現が心臓形成にどのような異常を引き起こすかを、心房中隔の発生とともに、右心房の特性形成に着目して解析を進める。本研究に用いる*Pitx2*異所性発現マウスでは、*Pitx2*とともに*EGFP*も同一細胞に発現する。この特徴を利用して、シングルセルRNA-seqを行い、*Pitx2*を過剰に発現している細胞を*EGFP*の発現を指標にして抽出することにより、*Pitx2*の過剰発現が各細胞種にもたらす影響について調べる。それによって、心臓発生における*Pitx2*の役割を細胞種ごとに明らかにし、細胞種間の相互作用について検証することにより、*Pitx2*の機能の包括的理解につなげる。

3. 研究の方法

Pitx2 の極性をもった発現が心臓発生に与える影響について調べるために、我々は Cre 依存的に *Pitx2* を過剰に発現できるマウス *CAG-CAT-Pitx2-IRES-EGFP* を作出した。この遺伝子改変マウスは Cre 存在下で組換えを起こし、*CAT* カセットが除去されることにより、*Pitx2* と *EGFP* を同時に発現できるマウスである。心臓特異的に Cre を発現するマウス (*Nkx2.5-Cre*) と掛け合わせることで、右心房を含めた心臓全体に *Pitx2* を異所的に発現するマウス (*Pitx2* 異所性発現マウス) を作出し、形態学的、分子生物学的解析を行った。*Pitx2* の異所性発現に伴う心臓形態異常がどのような分子メカニズムによって引き起こされるのか細胞種ごとに明らかにするために、シングルセル RNA-seq を行った。

4. 研究成果

Pitx2 異所性発現マウスは、胎生 12.5 日目頃に致死となり、心房中隔、房室管およびその内部の心内膜床の形成に顕著な異常が認められた。このような心臓の形態異常が、どのような遺伝子の発現変化によって引き起こされるのか明らかにするために、シングルセル RNA-seq を行い、細胞種ごとに *Pitx2* 異所性発現心臓において発現が変化している遺伝子の探索を行った。今回使用した *Pitx2* 異所性発現マウスは、*Pitx2* と同時に *EGFP* を発現することから、*EGFP* 陽性細胞の分布を調べたところ、心筋に集中して存在していることが分かった。心筋で発現変動する遺伝子について、GO 解析を行うと、代謝系、サルコメア形成遺伝子が発現上昇し、心臓発生、Wnt シグナル抑制に関連する遺伝子の発現が減少していることが分かった。さらに、*EGFP* 陽性心筋と陰性心筋で変動する遺伝子を調べたところ、*EGFP* 陽性心筋において洞房結節マーカー遺伝子の発現が減少することが分かった。そこで、*Pitx2* 異所性発現マウスにおける洞房結節の形状について 3D イメージを作製して調べると、*Nkx2.5-Cre* マウスに比べ、そのサイズが縮小していることが明らかになった。また、内皮細胞では、細胞外基質関連因子が発現変動していた。これら因子の発現変動によって、細胞外基質の異常な蓄積が生じ、*Pitx2* 異所性発現マウスで認められた房室管や心内膜床の形態異常を引き起こしたことが考えられた。次いで、シグナル分子を介した心内膜と心筋の相互作用に着目し、発現変化しているリガンドや受容体について解析をすすめたところ、*Pitx2* 異所性発現心筋では *Angpt1* の発現減少と *Vegfa* の発現亢進が認められた。これらのことから、これらリガンドが内皮に作用して、細胞外基質の合成に作用したことが考えられた。

本研究から、*Pitx2* が過剰に発現した心筋と内皮との相互作用によって細胞外基質の過剰な産生が起こり、それによって心内膜床の形態異常が引き起こされ、心房中隔の欠損が生じたことが示唆された。また、本来、*Pitx2* がほとんど発現していない右心房に *Pitx2* が異所的に発現することにより、右心房の特徴的な構造である洞房結節の形態が異常になったことから、右心房の個性形成にも影響を与えたことが考えられた。しかし、今回発現変動が認められた遺伝子群がどのような制御を受けているかはまだ不明である。今後は、これら遺伝子上流解析を行うことにより、*Pitx2* が発現制御に直接関与している可能性について検証することを計画している。また、進化的な心房中隔の獲得との関連についても調べて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katano Wataru, Mori Shunta, Sasaki Shun, Tajika Yuki, Tomita Koichi, Takeuchi Jun K., Koshiba-Takeuchi Kazuko	4. 巻 150
2. 論文標題 Sall1 and Sall4 cooperatively interact with Myocd and SRF to promote cardiomyocyte proliferation by regulating CDK and cyclin genes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.201913	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 Sutrisno Aldy Anindyawan, Katano Wataru, Kawamura Hayata, Tajika Yuki, Koshiba Takeuchi Kazuko	4. 巻 65
2. 論文標題 Combined method of whole mount and block face imaging: Acquisition of data of gene expression pattern from conventional in situ hybridization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 56-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12827	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9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片野亘、森俊太、多鹿友喜、竹内純、小柴和子
2. 発表標題 Pitx2の左心房局在は心房中隔形成および左右心房の個性決定に重要である
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田上優佳、川村颯、片野亘、小柴和子
2. 発表標題 心臓におけるPitx2の発現極性は房室管領域のEMTを制御する
3. 学会等名 第21回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田上優佳、川村颯、片野亘、小柴和子
2. 発表標題 心臓形態形成におけるPi tx2の発現極性は房室管領域のECM合成に關与する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田上優佳、川村颯、片野亘、小柴和子
2. 発表標題 心臓形態形成におけるPi tx2の発現極性と房室管領域におけるECM制御
3. 学会等名 日本動物学会 第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田上優佳、川村颯、片野亘、小柴和子
2. 発表標題 心臓形成におけるPi tx2の発現極性とHas2の発現制御
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン 米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田上優佳、川村颯、片野亘、小柴和子
2. 発表標題 心臓形態形成においてPi tx2はHas2の発現を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田上優佳、川村颯、片野亘、小柴和子
2. 発表標題 心臓形態形成においてPitx2がECMに与える影響
3. 学会等名 第20回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柴和子
2. 発表標題 脊椎動物の心臓形態進化における転写因子の機能
3. 学会等名 2021年度生理研心血管研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柴和子
2. 発表標題 心臓形態進化と極性をもった転写因子の発現
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------