

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591192

研究課題名（和文） 心臓・四肢発生における Hand 遺伝子の組織特異的相補性

研究課題名（英文） Tissue-specific redundancy of Hand genes in the cardiac and limb development

研究代表者

前田 潤 (MAEDA JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00255506

研究成果の概要（和文）：マウス心臓、四肢の発生における転写因子 Hand1、Hand2 の組織特異的な相補性について、Hand2 を Hand1 で置換した遺伝子操作マウスを用いて検討した。胎生期の右心室形成過程において Hand1 は Hand2 に対して遺伝的相補性をもつが、前肢発達過程においては Hand 遺伝子間の遺伝的相補性がなく、Hand2 が前肢発達に必須であることが明らかになった。これらの Hand 遺伝子の組織特異的な相補性は、ヒトの先天性心臓及び四肢奇形の成因解明の端緒になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To investigate the tissue-specific role of genetic redundancy of Hand genes which encode transcription factors necessary to the cardiac and limb development, we generated genetically engineered mice harboring Hand2 gene replaced by Hand1. This study demonstrated that Hand1 had a genetic redundancy to Hand2 during cardiac development while Hand2 was necessary to development of forelimb suggesting no genetic redundancy of Hand genes in limb development. This tissue-specific genetic redundancy of Hand genes may shed light into congenital heart and limb defects in human.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器学、心臓・四肢発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 時間的・空間的に秩序正しく発現する転写因子やシグナル伝達分子は、正常な組織、器官形成に必須であり、それらの異常により種々の先天奇形・異常が発症する。小児の診療において、心臓と四肢の奇形を合併する先天奇形症候群はしばしば認められる。

(2) Hand1、Hand2 はともにベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子であり、マウス胚では、Hand1 は左心室に、Hand2 は右心室に優位に発現する。また、Hand2 は、胎生期の肢芽の後方にある zone of polarizing activity (ZPA) に、胎生初期が

ら特異的に発現する。ZPA は、肢芽の前後軸方向への発達を制御する中胚葉細胞集団であり、シグナル伝達分子 Shh は、その肢芽の ZPA に限局して発現する。ZPA において、Hand2 は Shh の発現を制御し、さらに Shh が肢芽遠位のシグナル伝達分子 Fgf8 発現を制御することにより、肢芽から四肢への発達・指の形成が促されることが明らかにされている。一方、Hand1 は胎生中期に肢芽前方腹側に発現すると報告されているが、胎生期の発現を否定する報告もあり、肢芽における発現様式、制御機構は明らかにされていない。Hand2 ノックアウト (Hand2^{-/-}) マウスは胎生 10.5 日に右心室形成不全による胎生期循環破綻により早期に死亡するため、Hand2 は右心室発生に必須であると考えられる。Hand2^{-/-} マウスでは肢芽の形成は認められるが、胎生早期致死のため、肢芽から四肢への発達を追跡することはできない。また、Hand1 ノックアウト (Hand1^{-/-}) マウスは胎盤機能不全により、Hand2^{-/-} マウスより早期に死亡するため、肢芽のみならず、心臓発達の解析も困難である。

(3) 研究代表者らは Hand2 を Hand1 で置換した遺伝子改変 (Hand2^{Hand1/Hand1}) マウスを作製することに成功した。このマウスは胎生期に発達が停止し、胎内死亡するが、Hand1 ノックアウトマウスや Hand2 ノックアウトマウスより長期に生存し、心臓、四肢が形成される段階まで追跡できることが判明した。

2. 研究の目的

Hand2-Hand1 遺伝子置換 (Hand2^{Hand1/Hand1}) マウス及び Hand2 遺伝子組織特異的ノックアウト (Hand2^{loxP/loxP}) マウスを用いて、哺乳類の心臓、四肢の発生における bHLH 型転写因子 Hand1、Hand2 の組織特異性、遺伝的相補性を解析すること。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス胎仔の Hand1 の肢芽における発現様式を、肢芽が形成される胎生 9.5 日から出生直前まで、Hand1 RNA プローブを用いた in situ hybridization (ISH)法で明らかにする。各胎齢で胎仔を採取し、ISH は肢芽全体をプローブで染色する whole mount ISH (WISH)と、組織切片を用いた section ISH (SISH)の両者で行い、Hand1 発現の空間的広がりを明らかにする。

(2) Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔の心臓形態を胎齢ごとに観察する。また、心臓特異的に発現する遺伝子の発現パターンを各胎齢で WISH、SISH を行って解析する。

(3) Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔の肢芽形態を、心不全による血流低下の影響が少ないと思われる胎生 10.5~12.5 日の肢芽を用いて観察する。また、肢芽特異的に発現する遺伝子の発現パターンを WISH、SISH を行って解析する。

(4) Hand2^{loxP/loxP} マウスを用いて、Hand2 肢芽特異的ノックアウトマウス胎仔を作製し、肢芽の表現型を解析する。

以上の検討から、心臓・四肢形成における Hand 遺伝子機能の相補性を明らかにし、組織間の相補性を比較する。

4. 研究成果

(1) Hand1の肢芽における時間的、空間的発現様式の解析

胎齢別に野生型マウス胎仔を摘出し、Hand1 RNAプローブを用いたWISHおよびSISHを行った。過去にHand1は胎芽にほとんど発現していないと報告されているが、今回の検討では胎生10.5日~11.5日の前肢前方、すなわち将来の第1指に相当する部位に限局した発現を認めた。

(2) Hand2^{Hand1/Hand1}マウスの心臓表現型解析

Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔は、胎生 13.5 日後成長が停止し、胎生 15.5 日頃に胎内死亡した。胎生 9.5 日以降、様々な程度の右心室の低形成及び右心室肉柱層の発達障害が認められた。これらの右心室では、心室壁の外側への伸展・発達が障害されていた。胎生 12.5 日の組織切片の顕微鏡学的所見では、心室中隔は形成されていたが、右心室肉柱層に発達不全が認められた (図 1)。

Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔において、Hand 遺伝子の発現を WISH および SISH により解析した。野生型では左心室だけに発現する Hand1 は、Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔では右心室全体に発現が拡大し、一方 Hand2 の発現は両心室に認められなかった (図 2)。すなわち、右心室における Hand2 から Hand1 への置換が遺伝子レベルで行われていることが確認された。また、心室特異的な転写因子 Irf4 の発現は Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔でも野生型胎仔と同様に認められ、右心室における Hand 遺伝子の置換を行っても、心室筋の分化は正常に行われていると考えられた (図 3)。また、Hand2^{Hand1/+} マウスと Hand2^{+/-} マウスの交配により作製された Hand2^{Hand1/-} マウスは、Hand2^{-/-} マウス (Hand2 ノックアウトマウス) と同様、胎生 10.5 日に著明な右心室低形成で胎内死亡し、Hand2^{Hand1/-} マウス胎仔は、Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔よりも、より重症な心臓表現型を

呈した。

以上の結果より、右心室の発達過程において、Hand1 は部分的に Hand2 の機能を代償する、すなわち遺伝的な相補性を有すること、その遺伝的相補性は Hand 遺伝子の量依存性であることが示唆された。

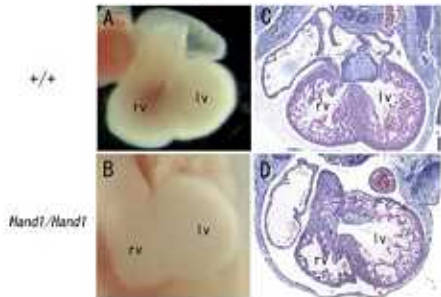


図1 胎生12.5日における野生型胎仔(上段)とHand2^{Hand1/Hand1}胎仔(下段)の心臓形態

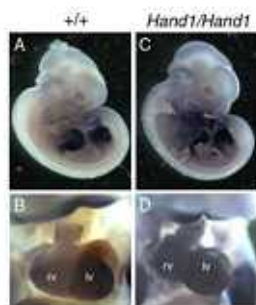


図2 胎生11.5日における野生型胎仔(左)とHand2^{Hand1/Hand1}胎仔(右)の心臓におけるHand1の発現

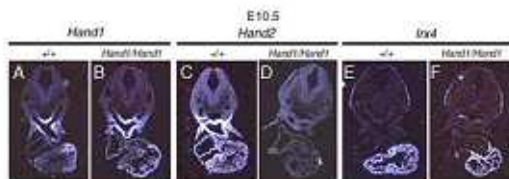


図3 胎生10.5日における野生型(左)とHand2^{Hand1/Hand1}胎仔(右)の心臓におけるHand1, Hand2, Irx4 mRNAの発現

(3) Hand2^{Hand1/Hand1} マウスの肢芽の表現型解析

Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔において、心不全に起因する血流低下による胎芽発達障害の影響が少ないと思われる胎生 10.5~12.5 日の肢芽の表現型を解析した。胎生 10.5 日の Hand2^{Hand1/Hand1} 胎仔の前肢形成は野生型マウス胎仔とほぼ同じであったが、胎生 11.5 日、12.5 日の Hand2^{Hand1/Hand1} 胎仔では、野生型マウス胎仔に比し、前肢第 2-5 指が低形成で、前肢後側の発達が障害されていた(図 4)。後肢の形成に関しては、Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔と野生型マウス胎仔との間で、明らかな形態

の差を認めなかった。四肢の部位特異的なマーカー遺伝子の発現を WISH および SISH で解析した結果、野生型で前肢に限局した発現を示した Hand1 は前肢全体に異所性発現が拡大していた。逆に野生型で前肢前方領域に発現する Hand2 は、Hand2^{Hand1/Hand1} マウス胎仔の前肢においては発現が消失していた(図 5)。これらの結果は、胎仔の前肢芽においても、Hand2 から Hand1 への置換が遺伝子レベルで行われていることが確認された。また、前後肢芽に発現して四肢のパターン化に与えるシグナル分子 Shh は、Hand2^{Hand1/Hand1} マウスにおいては、前肢、後肢とも発現が低下していた(図 6)。これは胎生期の前肢芽において、Hand1 は Hand2 の機能を代償できず、前肢後側(将来の第 2-5 指)の発達には Hand2 が必須であること、その制御機構に Shh シグナルが関与することが示唆された。

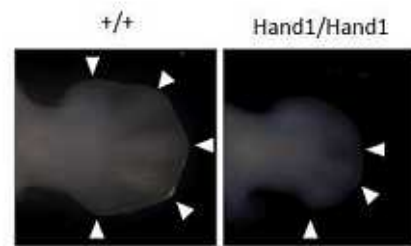


図4 胎生12.5日における野生型胎仔(左)とHand2^{Hand1/Hand1}胎仔(右)の前肢芽形態

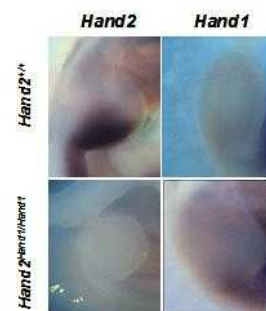


図5 胎生10.5日における野生型前肢芽(上段)とHand2^{Hand1/Hand1}前肢芽(下段)におけるHand2およびHand1の発現

さらに、Hand2^{loxP/loxP} (Hand2 コンディショナルノックアウト)マウスと、肢芽にのみ DNA 組み換え酵素 Cre を発現する Prx-Cre^{+/-} マウスを交配させて得た肢芽特異的 Hand2 ノックアウトマウスを作製した。これらのマウスは、Hand2^{Hand1/Hand1} マウスと異なり、胎内死亡することなく成長し、出生した。これらのマウスでは、前肢芽形成不全が認められ(図 7)、Hand2 の発現が肢芽においてのみ障害されて

いることが示された。Hand2 は胎生期の前肢発達に必須であり、Hand1 との遺伝的相補性を有しないことが再度示唆された。

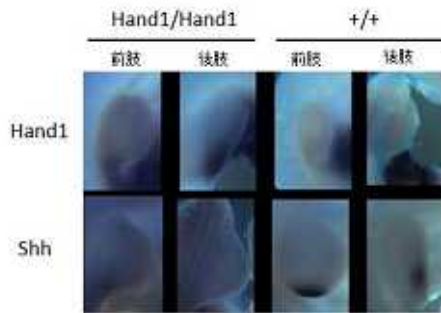


図6 胎生10.5日におけるHand2^{loxP/+}胎仔(左)と野生型胎仔(右)の肢芽におけるHand1およびShhの発現



図7 出生当日のHand2肢芽特異的ノックアウトマウス(左)と野生型の前肢(右)

(4)結論および今後の展望

転写因子 Hand1 と Hand2 は、哺乳類の発生において、オーバーラップする機能を有する。Hand1 と Hand2 の機能は、左右心室発生においては部分的、量依存的な遺伝的相補性を有し、肢芽発生においては、相補性を有しないと考えられた。Hand1、Hand2 の間には、組織特異的な遺伝的相補性が存在することが推測された。また、この組織特異的相補性は、Hand 遺伝子量依存的に増加する可能性も示唆された。

マウス胚では、心臓における部位特異的発現に見られるように、Hand1 と Hand2 の発現にオーバーラップしない部位があり、さらに四肢における両遺伝子の発現の相違は明らかではなく、遺伝的相補性が器官ごとに異なる可能性がある。上記の結果から、胎生期の四肢においては、心臓と比較して Hand 遺伝子間の相補性が低い、すなわち心臓発達と比較して、四肢発達では Hand2 に対する Hand1 の代償機能が低く、Shh や Fgf8 の調節も不十分となり、胎生中期以降の四肢発達の停止をもたらすことが予想される。さらに、心臓においては、Hand 遺伝子が量依存性に心室の発達に關与する可能性が考えられた。

ヒトにおいては、Holt-Oram 症候群など心

臓と四肢と同時に先天異常を発症する病態がしばしば認められ、HAND2 の座位する染色体 4 番長腕 q33 欠失を有する心臓、四肢の先天奇形症例も報告されている。本研究の成果は、心臓、四肢の異常を特徴とする奇形症候群の成因解明につながり、将来的にはそのような奇形症候群の遺伝カウンセリングや妊娠中の母体環境を整えることにより、先天奇形の発症を制御するような予防医学への応用の可能性が期待される。

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2件)

Tsuchihashi T, Maeda J, Shin CH, Ivey KN, Black BL, Olson EN, Yamagishi H, Srivastava D.

Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis. Dev Biol 2011;351:62-69 (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.023>

Kodo K, Yamagishi H. A decade of advances in the molecular embryology and genetics underlying congenital heart defects. Circ J 2011;75:2296-2304 (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0636>

[学会発表](計2件)

Kodo K, Uchida K, Tsuchihashi T, Nakanishi T, Matsuoka R, Yamagishi H. Exploring a novel molecular mechanism underlying the cardiac development implicated in the outflow tract defects. Academy of European Society of Pediatric Cardiology 2011, May 18-21, 2011, Granada, Spain

土橋 隆俊, 前田 潤, 山岸 千尋, 山岸 敬幸 心臓形成における Tbx 遺伝子ファミリーを中心とする遺伝子制御 一次元管腔構造から三次元4チャンパー心臓へのリモデリング 流出路発生における TBX1 の必須な役割 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会 2010年12月7~10日 兵庫県神戸市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 潤 (MAEDA JUN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 00255506

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山岸 敬幸 (YAMAGISHI HIROYUKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 40255500

土橋 隆俊 (TSUCHIHASHI TAKATOSHI)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 10286528