

## モデル動物を用いた心室中隔形成メカニズムの解析

Analyses of the molecular mechanism of ventricular septum formation using animal models

小柴 和子\*

### 1. はじめに

われわれヒトを含む哺乳類の心臓は、心房と心室がそれぞれ中隔によって区切られた二心房二心室の形態をとる。このような二心房二心室の心臓は、一本の管（心筒）が折れ曲がり心房と心室ができてから、中隔によって心房と心室が左右に分かれることにより形成される。中隔によって分かれる前の心臓の形態は、一心房一心室の魚類の心臓によく似通っており、個体発生と系統発生を考える際の良いモデルになっている<sup>1)</sup>。

心臓発生の途中で心房や心室の中隔形成に異常が生じると、先天性心疾患のひとつである心房心室中隔欠損症が引き起こされる。心室中隔の一部、またはすべてが欠失する心室中隔欠損症は高頻度で発症する先天性心疾患であるが、その発症原因については未だ明らかになっていないことが多い。近年の研究から、心臓に発現する主要な転写因子のハプロ不全が心房心室中隔欠損症を含む心臓形態異常を引き起こすことが報告されており、このことは正常な心臓発生において適正な量の心臓転写因子が作用することが重要であることを示している。筆者らはヒト心室中隔欠損症の原因遺伝子である転写因子の *TBX5* と *SALL4* に着目し、モデルマウスや培養細胞を用いた解析から転写因子の相互作用による心室中隔形成の分子メカニズムを明らかにしてきた。さらに、*Tbx5* の機能解析において、脊椎動物の心臓進化における *Tbx5* の新たな役割を見出したので併せて紹介したい。

### 2. 転写因子とヒト先天性心疾患

#### 2. 1 Holt-Oram 症候群の原因遺伝子 *TBX5*

*Tbx5* 遺伝子は DNA 結合ドメインとして T-box を有する転写因子をコードしており、マウス胚やニワトリ胚において、眼の網膜の背側、前肢、そして心臓の両心

房と左心室に特異的に発現している（図1）。ニワトリ胚を用いた *Tbx5* 異所性発現実験から、*Tbx5* が網膜の背腹軸、前肢後肢、心室の左右性の決定に重要な役割を果たしていることがわかった<sup>2),3),4)</sup>。

Holt-Oram 症候群は、左室低形成、心房心室中隔欠損や前肢の形態異常を主な病態とする先天性心疾患であり、その原因遺伝子として *TBX5* が同定された<sup>5),6)</sup>。先に述べたように、*Tbx5* は網膜にも発現しているが、Holt-Oram 症候群では眼の異常は報告されていない。この理由として、眼の網膜背側には他の *T-box* ファミリー遺伝子の *Tbx2* と *Tbx3* が発現しているため、これらの遺伝子が *Tbx5* の機能を補っていることが考えられている。Holt-Oram 症候群にみられる前肢の異常は非常に特徴的であり、3 個の指骨からなる伸長した親指や、前腕の親指側の骨（橈骨）の部分欠損による短縮などの形状を示す。Holt-Oram 症候群の診断は、心臓や前肢の特徴的な異常をもとになれてきたが、患者の中には *TBX5* に異常が認められないケースもあり、他の原因遺伝子の存在が考えられていた。

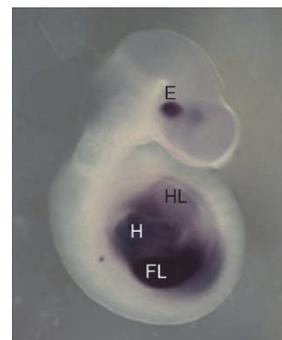


図1 胎生9.5日目マウス胚における *Tbx5 mRNA* の発現を whole mount in situ ハイブリダイゼーション法で調べたもの。眼、心臓、前肢には *Tbx5* が強く発現しているのに対し、後肢には発現が認められない。E: 眼、H: 心臓、FL: 前肢芽、HL: 後肢芽

\* 生命科学部 応用生物科学科

## 2. 2 Okihiro 症候群の原因遺伝子 *SALL4*

Okihiro 症候群は前肢の形成異常や眼球運動の異常、難聴等を主な病態とする遺伝性疾患であり、その原因遺伝子として *SALL4* が同定された<sup>7,8)</sup>。*SALL4* は DNA と結合する Zinc Finger モチーフを有する転写因子をコードする。Okihiro 症候群では心臓にも異常が認められ、前肢と心臓に生じる病態が Holt-Oram 症候群によく似ていたことから、*TBX5* に変異が認められなかった Holt-Oram 症候群の患者について *SALL4* を調べたところ、*SALL4* の変異が見出された<sup>9)</sup>。マウス胚を用いて *Sall4* と *Tbx5* の発現様式を調べると、Holt-Oram 症候群や Okihiro 症候群において異常が認められる心臓や四肢の部位に、両遺伝子が重複して発現していることがわかった<sup>10)</sup>。これらのことから、心臓と前肢の発生において *Tbx5* と *Sall4* が相互作用しながら機能していることが考えられた。

## 3. *Sall4* と *Tbx5* は相互作用しながら心臓や前肢の形成に関与する

### 3. 1 ダブルミュータントマウスを用いた解析

*Tbx5* と *Sall4* の相互作用を調べるために、*Tbx5<sup>del/+</sup>;Sall4<sup>GT/+</sup>* のダブルミュータントマウスを作成した。*Tbx5<sup>del</sup>* は *Tbx5* 遺伝子の exon3 を欠失したマウスで、機能ドメインである T-box を欠いた短い不完全な *Tbx5* タンパク質を産生する。*Tbx5<sup>del</sup>* のヘテロマウスである *Tbx5<sup>del/+</sup>* マウスは Holt-Oram 症候群のモデル動物となり、心房心室中隔欠損と親指の伸長が認められる<sup>11)</sup>。*Tbx5<sup>del</sup>* のホモマウスである *Tbx5<sup>del/del</sup>* は心臓形成の重度な異常なために、胎生 10 日目頃に致死となる。*Sall4<sup>GT</sup>* は、*Sall4* の exon2 に、スプライシングのアクセプターサイトをもつ  $\beta$ -geo カセットが挿入されたジェントラップマウスで、異所的なスプライシングが起こることにより、Q (グルタミン) リッチドメインから C 末端側を欠くタンパク質が産生される (*Sall4GT*、図 2)。*Sall4<sup>GT</sup>* で産生される不完全なタンパク質は、Okihiro 症候群の原因となる *SALL4* の変異のひとつで作られる変異タンパク質と同じ形状であり、タンパク質-タンパク質間相互作用に重要とされる Q リッチドメインが保

存されていることから、ドミナントネガティブとして作用すると考えられている。*Sall4<sup>GT</sup>* のヘテロマウスで、成体まで生き残るものは外見上に大きな異常は認められないが、胎仔では表現型の重篤なものに肢芽の伸長不全や心臓の形態異常が認められる。*Tbx5<sup>del</sup>* と *Sall4<sup>GT</sup>* のヘテロマウス同士を掛け合わせ、ダブルヘテロを作成すると、それぞれのヘテロマウスよりも重篤な心房心室中隔欠損と前肢親指のさらなる伸長が認められた<sup>10)</sup>。このことは *Tbx5* と *Sall4* が心臓形成と前肢の形成において、相互作用しながら機能していることを示唆する。

### 3. 2 *Sall4* と *Tbx5* はタンパク質レベルで相互作用する

そこで、*Sall4* タンパク質と *Tbx5* タンパク質を用いた免疫沈降実験を行った。*Sall4* がどの部位を介して *Tbx5* と相互作用しているか明らかにするために、Q リッチドメインを含まない N 末端部のみ (*Sall4-R1*)、Q リッチドメインまで含むもの (*Sall4-R2*)、Q リッチドメインを含まない C 末端部 (*Sall4-F1*) という *Sall4* の各変異タンパク質を作製し (図 2)、相互作用性を検証した。その結果、*Sall4-F1* のみ *Tbx5* と結合しないことが明らかとなり、*Sall4* と *Tbx5* は *Sall4* の N 末端部を介して相互作用 (結合) していることがわかった。さらに、培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイから、

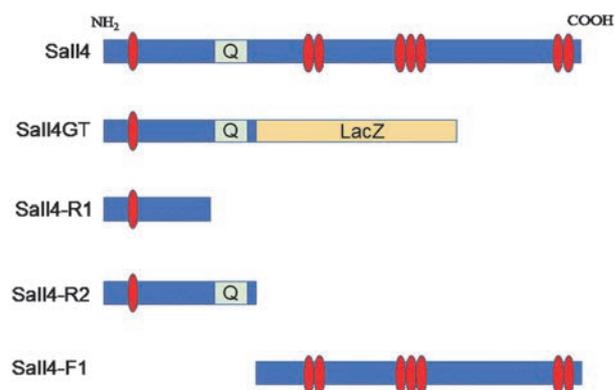


図 2 正常な *Sall4* タンパク質とさまざまな *Sall4* 変異タンパク質の模式図。Q はグルタミンリッチドメイン、楕円は Zinc Finger モチーフを示す。

心臓発生において *Tbx5* の下流遺伝子である *Nppa* と *Gja5* の転写制御に、また、前肢における *Tbx5* の下流遺伝子の *Fgf10* の転写制御に、*Tbx5* と *Sall4* は相乗的に関わっていることが明らかになった<sup>10)</sup>。

以上の結果から、Holt-Oram 症候群と Okihiro 症候群にみられる心臓と前肢の病態の類似性は、それぞれの原因遺伝子である *TBX5* と *SALL4* が相互作用しながら下流遺伝子の転写を制御していることが原因であると考えられた。このことは、転写因子の変異が原因となって生じる先天性心疾患の発症メカニズムの理解には、原因となる転写因子だけでなく相互作用する転写因子をも含めて調べていく必要があることを示唆する。

#### 4. *Tbx5* は進化的な心臓形態の変化に関与する

##### 4. 1 脊椎動物の心臓形態と *Tbx5* の発現様式

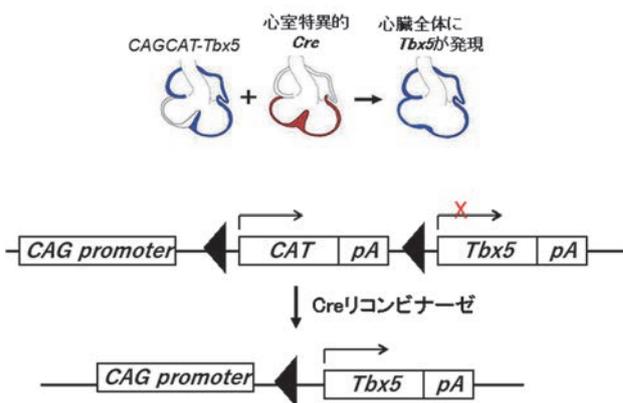
脊椎動物の心臓形態はさまざまであり、魚類は一心房一心室、両生類は二心房一心室、ヘビ・トカゲ・カメなどの爬虫類は二心房一心室、ワニ、鳥類、哺乳類は二心房二心室の心臓を有する。*Tbx5* は心臓発生において、心室の形態と関連した特徴的な発現様式を示す。一心室の心臓を有する魚類、両生類、爬虫類では心室に一樣に *Tbx5* が発現する。一方、心室中隔が形成され、心室が左右に分かれる鳥類、哺乳類では *Tbx5* は左心室に限局して発現する。心室中隔は脊椎動物の進化において爬虫類で獲得されたと考えられるが、カメでは心臓発生にもなう興味深い *Tbx5* の発現様式の変化が観察される<sup>12)</sup>。

ミシシippアカミミガメを用いた解析で、心臓発生初期には *Tbx5* は心室全体に発現するが、その後発生が進むと、右心室での *Tbx5* の発現が減少し、左心室から右心室にかけて勾配をもった発現様式をとるようになる。このころの心室形態は、心室中央のくぼみ（心室溝）付近の心室壁が肥厚する。つまりカメでは発生後期に *Tbx5* が左心室から右心室にかけて勾配をもった発現様式を示し、また心室においては中隔様構造が形成されるのである。爬虫類でも系統的により基部に位置するアノールトカゲでは、胚発生の時期を通じて心室中隔様の構造は形成されず、*Tbx5* も心室に一樣に発現したままで

あった。カメとトカゲにおける *Tbx5* の発現の違いは、*Tbx5* の極性をもった発現と心室中隔の形成に密接な関連があることを示す。

##### 4. 2 *Tbx5* 異所性発現マウスと心室中隔形成

*Tbx5* の極性をもった発現と心室中隔形成との関連を明らかにするために、*Tbx5* を心臓全体に異所的に発現する遺伝子改変マウスを作成し、心臓形態を調べた<sup>12)</sup>。*CAGCAT-Tbx5* マウスは *CAG* プロモーターの下流に *loxP* 配列に挟まれた *CAT* カセットが位置し、さらにその下流に *Tbx5* が配置している構造をもつ。*loxP* 配列に挟まれた領域は、遺伝子組換え酵素の Cre リコンビナーゼが存在すると、*loxP* の部分で組換えが起こり、除去される。*CAT* カセットがなくなると、*Tbx5* が *CAG* プロモーターによって転写されるようになり、結果、Cre が発現している場所に *Tbx5* が異所的に発現するようになる（図3）。*CAGCAT-Tbx5* マウスと心室全体に Cre を発現する *Nkx2.5-Cre* マウスとを掛け合わせると、心室全体に *Tbx5* が発現する爬虫類のような発現様式をもたらすことができる。このように *Tbx5* が心室に一樣に発現しているマウスでは心室中隔は形成されず、単心室の形状を示した。この結果は *Tbx5* の左心室へ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示



唆し、脊椎動物の進化の過程で、*Tbx5* が左心室に局在した発現様式をとることにより、心室中隔が形成され、二心房二心室の形状をもつ心臓ができていったと考え

図3 *Tbx5* 異所性発現マウスの作出

*CAGCAT-Tbx5* マウスは、Cre リコンビナーゼによって組換えが起こると、*Tbx5* を異所的に発現する。

られる。

#### 4. 3 心室中隔の形成位置と *Tbx5* の発現境界

心室中隔を有するニワトリ胚、マウス胚において心室中隔は左側半分が *Tbx5* 陽性で、右側半分は *Tbx5* 陰性である。つまり、心室中隔は *Tbx5* の発現境界に形成され、左右心室の心筋が均等に中隔形成に寄与する。*Tbx5* 陽性細胞の系譜追跡実験から、心筒が形成されるより前の胎生 7.5 日目で *Tbx5* 陽性であった細胞が、将来的に左心室および心室中隔の左側を形成することが明らかになり、*Tbx5* の発現境界、すなわち心室中隔の形成される位置は、心臓発生のごく初期に決定されることがわかった<sup>13)</sup>。一方で、*Tbx5<sup>fllox</sup>* マウスを用いた領域特異的な *Tbx5* の欠失により、*Tbx5* の発現境界を左側にシフトさせたミュータントマウスでは、*Tbx5* の発現境界が存在するにもかかわらず、心室中隔は形成されない<sup>12)</sup>。また、近年の研究から、ゼブラフィッシュの心室においても、単心室でありながら *tbx5a* 陽性細胞と陰性細胞による機能的な領域が形成されていることが明らかになってきており、心室中隔形成の分子メカニズムは、*Tbx5* の発現境界があれば心室中隔が形成されるという単純なものではなさそうである。

#### 5. まとめ

本稿では転写因子 *Tbx5* を中心とした心室中隔形成機構について述べてきた。*Tbx5* は本稿で取り上げた *Sall4* 以外にも *Nkx2.5* や *GATA4* と行った心臓形成に重要な役割を担っている転写因子とも相互作用している。また、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析から、心臓発生に関わる転写因子ネットワークの詳細がわかってきている。さらに、心臓形成の転写因子ネットワークには、転写因子だけでなく、さまざまなエピジェネティック因子も関わっていることが明らかになってきており<sup>14)</sup>、心臓形成にかかわる遺伝子発現制御の複雑さが示されている。しかし、発現している因子群が明らかになってきても、それらがどのような現象と関連して、どのように機能しているかについては、まだわかっていないことが多い。それらを明らかにするには、やはり生

体を用いた解析が必要であると考えられる。

本稿で取り上げた *Tbx5* と中隔形成との関連についても、単に遺伝子が発現しているかどうかだけでなく、その発現様式、発現量が中隔形成に関わっていることから、それらを調節している要因は何かということが次の問題になっている。エピジェネティックな *Tbx5* の発現制御メカニズムに着目した研究から、long non-coding RNA による新たな *Tbx5* の発現制御メカニズムも徐々に明らかになってきており<sup>15)</sup>、心室中隔欠損の発症原因についてもさらに詳細な解析が進むことが期待される。

#### 謝辞

本研究は、UCSF グラッドストーン研究所の Benoit G. Bruneau 博士、および、東京医科歯科大学の竹内純博士との共同研究で行われたものである。両博士と Bruneau 研究室、竹内研究室のメンバーに深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Katano W, Moriyama Y, Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K. Cardiac septation in heart development and evolution. *Dev Growth Differ*, in press
- 2) Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K, Matsumoto K, *et al.* *Tbx5* and *Tbx4* genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* 398:810-814 (1999)
- 3) Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Matsumoto K, *et al.* *Tbx5* and the retinotectum projection. *Science* 287:134-137 (2000)
- 4) Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, *et al.* *Tbx5* specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* 130:5953-64 (2003)
- 5) Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, *et al.* Mutations in human *TBX5* cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 15:30-35 (1997)
- 6) Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, *et al.* Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet.* 15:21-29 (1997)

- 7) Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, *et al.* Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet.* 11:2979-2987 (2002)
- 8) Al-Baradie R, Yamada K, St Hilaire C, *et al.* Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet.* 71:1195-1199 (2002)
- 9) Brassington AM, Sung SS, Toydemir RM, *et al.* Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *Am J Hum Genet* 73:74-85 (2003)
- 10) Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Arruda EP, *et al.* Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat Genet* 38:175-83 (2006)
- 11) Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, *et al.* A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106:709-21 (2001)
- 12) Koshiba-Takeuchi K, Mori AD, Kaynak BL, *et al.* Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* 461:95-98 (2009)
- 13) Devine WP, Wythe JD, George M, *et al.* Early patterning and specification of cardiac progenitors in gastrulating mesoderm. *Elife* Oct 8;3 (2014)
- 14) van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK. Epigenetic factors and cardiac development. *Cardiovasc Res* 91:203-211 (2011)
- 15) Hori Y, Tanimoto Y, Takahashi S, *et al.* Important cardiac transcription factor genes are accompanied by bidirectional long non-coding RNAs. *GMC Genetics* 19:967 (2018)