

[ 別紙 1 ]

## 論文の内容の要旨

論文題目：心筋特異的転写因子 *Csx/Nkx2-5* の成人期心臓における役割

指導教官：循環器内科 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名：瀧本 英樹

(背景および目的)

心臓は個体の発生過程において最初に形成される臓器であるが、心臓の発生に  
関与する分子メカニズムはこれまでほとんど不明であった。しかし 1989 年に  
ショウジョウバエのホメオボックス遺伝子 *tinman* が心臓に限局して発現する転  
写因子として報告され、その遺伝子を欠損したハエでは心臓が全く形成されな  
いことが明らかとなった。1993 年にはマウスの心臓から *tinman* に配列の似た  
ホメオボックス遺伝子の *Csx/Nkx2-5* が単離された。*Csx/Nkx2-5* は、発生段階の  
きわめて早期から前方中胚葉の予定心臓領域でその発現がみられ、その遺伝子  
を欠損したノックアウトマウスは *linear heart tube* が右側に *looping* をおこす段  
階で心臓の発生が停止し胎生致死となる。これは *Csx/Nkx2-5* が正常な心臓の発  
生に不可欠な転写因子であることを示している。また最近ヒトにおいて房室伝  
導障害を合併する家族性心房中隔欠損症の病因遺伝子の座位が *Csx/Nkx2-5* の染  
色体座位と一致することが見い出され、さらにその患者において *Csx/Nkx2-5* の

ホメオドメイン内ないしその直後に変異が発見された。このことから *Csx/Nkx2-5* は心臓の形態形成や房室伝導細胞の機能維持など、多くの機能を有していると考えられる。

*Csx/Nkx2-5* は発生初期から成人期に至まで心臓に発現しているため、成人期においても何らかの役割をはたしていることが考えられる。しかしながらノックアウトマウスは心臓形成不全による胎生致死をきたすため、その成人期における役割を探ることは不可能であった。そこで成人期心臓における *Csx/Nkx2-5* の役割を *in vivo* で明らかにすることを目的として本研究をおこなった。

#### (方法)

本研究では遺伝子工学の手法を用いて 2 種類の遺伝子改変マウス（野生型 *Csx/Nkx2-5* を過剰発現させたトランスジェニックマウスと *Csx/Nkx2-5* の作用を抑えるドミナントネガティブトランスジェニックマウス）を作成した。心筋と骨格筋における *Csx/Nkx2-5* の働きの違いを比較するため野生型 *Csx/Nkx2-5* を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは chicken  $\beta$ -actin をプロモーターとして使用した。またドミナントネガティブトランスジェニックマウスでは出生後の心臓に発現するように  $\alpha$ MHC をプロモーターとして使用した。12~18 週齢のマウスについて血圧、脈拍を測定し、心臓超音波による心機能を評価した。また電子顕微鏡による超微細構造の観察を含めた組織学的検索、さらに心臓における心筋特異的遺伝子発現の変化をノーザンブロット法で調べた。さらに *Csx/Nkx2-5* が心筋保護作用を持つかどうか調べるため、アドリアマイシンの負荷を加え心機能の変化を評価し、また心筋組織に誘導されるアポトーシスの程度を TUNEL 法で評価した。最後にラット培養心筋細胞に野生型 *Csx/Nkx2-5* とドミナントネガティブ *Csx/Nkx2-5* を導入し *in vitro* でアドリアマイシンに対するアポトーシスの程度を TUNEL 法で評価した。

#### (結果及び考察)

どちらのマウスも成長障害や外奇形を認めず、血圧、心拍数、心重量ともに野生型と比べ有意な差は認められなかった。心臓超音波解析では野生型トランスジェニックマウスでは心機能は正常であるが、ドミナントネガティブマウスで心機能の低下が認められた。

ノーザンブロット解析では野生型トランスジェニックマウス左室心筋で *ANP*, *BNP*, *CARP*, *MLC2v* といった遺伝子の発現が亢進していた。これらの遺

伝子はノックアウトマウス胎仔心筋ではその発現が低下していることが報告されており、*Csx/Nkx2-5* がこれら遺伝子上流に存在し、成人期においてもこれらの遺伝子発現を調節していることが示唆された。さらに骨格筋では野生型 *Csx/Nkx2-5* が過剰に発現しているにもかかわらず心筋特異的遺伝子である *ANP* の発現は認められなかった。このことは *Csx/Nkx2-5* は心筋細胞分化に必須の転写因子ではあるが、骨格筋におけるマスター遺伝子である *MyoD* とは異なり、これのみでは心筋のフェノタイプを誘導できないことを示している。

組織解析ではトランスジェニックマウス左室心筋に光顕上有意な変化を認めなかったが、電顕上左室心筋に多数の分泌顆粒を認めた。これら分泌顆粒はバソプレッシンの刺激で消失することからノーザンプロットの結果とあわせ、*ANP*, *BNP* が含まれると考えられた。通常心室筋には分泌顆粒は存在しないが、この結果は心室筋に過剰に発現した *Csx/Nkx2-5* が直接 *ANP*, *BNP* を誘導したためと考えられた。一方ドミナントネガティブマウス左室心筋においては、前出の心臓特異的遺伝子の発現に有意な変化は認められなかったが、光顕上、間質の線維化が増加しており、電顕では筋原線維の減少と、ミトコンドリアの増加が認められた。このことは成人期において *Csx/Nkx2-5* が心筋構造の維持に必須であることを示している。

さらにアポトーシスを誘導し心筋を障害するアドリアマイシンに対する急性期 (24 時間後) の反応性の違いを検討したところアドリアマイシン投与による心機能低下の程度はドミナントネガティブマウス、野生型マウス、トランスジェニックマウスの順で大きかった。また TUNEL 陽性細胞はドミナントネガティブマウス、野生型マウス、トランスジェニックマウスの順で多かった。これらの *in vivo* における結果を *in vitro* で確認するため、ラット培養心筋細胞に野生型 *Csx/Nkx2-5* とドミナントネガティブ *Csx/Nkx2-5* をトランスフェクトし、アドリアマイシンによる負荷を与えたところコントロール細胞では TUNEL 陽性細胞は 24% 程度であったが、ドミナントネガティブ *Csx/Nkx2-5* をトランスフェクトした細胞では 70%、野生型 *Csx/Nkx2-5* をトランスフェクトした細胞では 10% 以下であり、*Csx/Nkx2-5* が直接的な心保護作用を持つことが示唆された。

#### (結論)

本実験から、*Csx/Nkx2-5* は発生期のみならず成人期においても心筋構造及び心機能の維持に重要であり、*ANP* をはじめとするいくつかの心筋特異的遺伝子の

発現を調節していることが示された。またアドリアマイシンで誘導されるアポトーシスから心筋細胞を保護する役割があると考えられた。