

博士(医学) Sultana Nishat

論文題目

Irx3 determines expression of fast and slow connexins in the ventricular conduction system of the mouse heart

(Irx3 はマウス心臓心室刺激伝導系で早い及び遅いコネクシンの遺伝子発現を制御する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

転写因子 Iroquois related (Irx) family は 6 つの遺伝子が 2 つの染色体に 3 個ずつクラスターを形成している。そのうち、Irx4 は心室心筋特異的に発現し、ノックアウトマウスでは心筋の増殖異常を示す。Irx5 は心室筋で心内膜から心外膜に濃度勾配をもって発現しており、ノックアウトマウスでは心筋の再分極に異常を示し、高頻度で不整脈を呈する。Irx2 と Irx6 は心内膜に発現し、どちらのノックアウトマウスも心臓に異常を示さない。

申請者は心室に発現する Irx3 に注目して、その心室における役割を明らかにすることにした。まず、Irx3 の発現を検討し、ノックアウトマウスを作製し、ホモマウスの示す症状を解析することで、心室における Irx3 の機能を明らかにし、さらに Irx3 が欠失した場合、いろいろな遺伝子の発現がどのように変化するかも検討した。

[材料ならびに方法]

マウス Irx3 ゲノム遺伝子の第 1 と第 2 エキソンをネオマイシン耐性遺伝子カセットに置換する targeting vector を作製し、ES 細胞内に電気穿孔法で遺伝子導入し、相同的組換えを起こした ES 細胞クローンを 6 個得た。そのうちの 2 個を用いてキメラマウスを作製した。キメラマウスと野生型 B6 マウスを交配し、ヘテロマウスを得た。雌雄のヘテロマウスを交配し、ホモマウスを作製し、形態的、機能的な解析を行った。

[結果]

まず、心臓における Irx3 の発現を胎生 12.5 日と生後 7 日の正常心臓を section in situ hybridization 法で検討した結果、Irx3 は心室内刺激伝導系で発現していることが認められた。心室内刺激伝導系形成における Irx3 の役割を明らかにするため、Irx3 ノックアウトマウスを作製した。雌雄のヘテロマウスの交配から生まれてくるマウスのホモマウス、ヘテロマウス、正常マウスの比率はメンデル法則の通りであった。ホモマウスの雌雄を交配しても、正常に妊娠、出産、育児を行っていた。心臓の形態はホモマウスと野生型マウスの間に差はなかった。

細胞間を連結する蛋白に Connexin (Cx)があり、蛋白の大きさで Cx30.2, Cx40, Cx43, Cx45 などがある。興味深いことに、洞房結節と房室結節には Cx45 が、心室内刺激伝導系には Cx40 が、作業心筋には Cx43 が特異的に発現している。ちなみに、冠血管には Cx40 が発現している。Cx40 抗体と Cx43 抗体を用いて、野生型マウス心室とホモマウス心室の切片を

免疫組織染色したところ、野生型マウスでは房室結節はいずれでも染まらず、His 束と Purkinje 線維が Cx40 抗体で染色され、作業心筋は Cx43 抗体で染色され、Cx40 発現細胞と Cx43 発現細胞は異なる領域にあった。一方、ホモマウス心室では Cx40 陽性細胞の数が減少し、刺激伝導系内に Cx43 陽性細胞が異所的に出現していた。

心筋細胞を Pancratin/collagenase 法で分離し、Cx40 抗体と PECAM 抗体で 2 重染色し、セルソーターで Cx40 陽性/PECAM 陰性の細胞を刺激伝導系細胞（以後、伝導心筋細胞）として分離した。この細胞と全心室心筋細胞から RNA を抽出し、いろいろな mRNA の発現を半定量的 PCR で解析した。その結果、ホモマウスの伝導心筋細胞では野生型マウスからのそれと比して、Cx40 発現が低下し、Cx43 は逆に増加していた。Cx45 は著減していた。

次に、刺激伝導系の形成に関わることが知られている Id2, Tbx2, Tbx3 の発現はホモマウスと野生型マウスで差が無かった。さらに、活動電位に関わる Na イオンチャネル、K イオンチャネル、Ca イオンチャネルについて、伝導心筋細胞で比較したところ、ホモマウス伝導心筋細胞では Kcnh2、Scn4a の発現が低下していた。

Cx43 がホモマウスで異所性に発現する分子メカニズムを明らかにするため、Cx43 プロモーター（約 1kbp）とルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトを Cos1 細胞にいろいろな Cx43 遺伝子の転写制御因子と共に Irx3 または Irx4 も遺伝子導入したところ、Nkx2.5 の Cx43 遺伝子活性化作用を Irx3 は阻害するが、Irx4 は阻害しなかった。Gata4 の Cx43 遺伝子活性化作用に対し、Irx3 は軽度抑制するが、Irx4 はむしろ活性化に働いた。

[考察]

刺激伝導系の速度はコネクシンの種類とイオンチャネルにより決定される。ホモマウスで速度の速い Cx40 が減少したことは心室内伝導速度を遅くさせる可能性がある。Irx3 が Nkx2.5 による Cx43 活性化を抑制する分子メカニズムは Nkx2.5 結合部位に重複して Irx3 結合部位があるためと思われる。

[結論]

1. Irx3 は心室内刺激伝導系に発現している。
2. Irx3 欠失マウスでは Cx40 陽性細胞が減少している。
3. Irx3 は Cx43 以外にも複数の遺伝子を制御することで伝導心筋細胞の性状を維持している。

論文審査の結果の要旨

転写因子 Iroquois related (Irx) family の心臓における役割が注目されている。Irx4 ノックアウト(KO)マウスでは心筋の増殖異常を示し、Irx5 の KO マウスでは心筋の再分極異常と不整脈を呈する。申請者はこれまで未知であった Irx3 の役割を明らかにするため心室内での発現を解析し、KO マウスを作製して種々の遺伝子の発現変化を検討した。Irx3 は心室内刺激伝導系で発現していたが、Irx3 KO マウスのホモマウスの雌雄交配でも、正常な妊娠、出産が認められ、心臓形態上はホモマウスと野生型マウスの間に差はなかった。しかし、細胞

間を連結する蛋白 Connexin (Cx)の発現を免疫組織染色にて観察すると、野生型マウスでは His 束と Purkinje 線維に Cx40 が、作業心筋に Cx43 が発現したのに対し、ホモマウスでは Cx40 陽性細胞の数が減少し、刺激伝導系内での Cx43 陽性細胞の異所的発現が認められた。刺激伝導系の形成に関わることが知られている Id2, Tbx2, Tbx3 の発現はホモマウスと野生型マウスで差が無かったが、活動電位に関わる Na イオンチャネル、K イオンチャネル、Ca イオンチャネルについて、伝導心筋細胞で比較したところ、ホモマウス伝導心筋細胞では Na イオンチャネルに関わる Scn4a および K イオンチャネルに関わる Kcnh2 の発現が低下していた。

申請者は本研究により、Irx3 の KO マウスでは Cx の発現が変化するばかりでなくイオンチャネル関連遺伝子発現も変化する事を明らかにした。刺激伝導系機能は Cx の種類やイオンチャネルにより調節されており、今回の研究成果は心室内伝導系における Irx3 の重要性を新たに提示したのものとして高く評価される。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 渡邊 裕司
副査 針山 孝彦 副査 福田 敦夫