

胎児心臓・頭頸部形成異常を誘引する母体ストレスの催奇性研究

竹内 純

東京科学大学大学院医歯学総合研究科 分子発生・口腔組織学分野

【研究の背景】

レチノール (RA) は世界中で多くの研究がされており、申請者も四肢・心臓発生における RA の催奇性およびエピゲノム因子との相互作用の研究を行ってきた (Takeuchi, *PNAS* 2007; *Dev. Cell* 2006; *Development* 2003a; *Nature* 1999)。さらに、近年、環境ホルモン (内分泌攪乱物質) の一つ、コルチゾールが母体の環境変化に伴う胎児形成異常を誘引する可能性が議論された (Keystone Symposia 2020-2021)。

母体ストレス依存して産生が高まるコルチゾール (コルチコイド) は RA と同様な分子機能を持ち、核内での標的遺伝子の転写制御も酷似している。そこで、直接的な影響を知るために構築した胎盤非依存型成育環境 (Takeuchi, *Nature* 2009; *PNAS* 2007) 下で、デキサメタゾン (DEX) 暴露を受けた胎仔は心血管・頭頸部の形成異常が生じることを見出した。両領域形成に重要な遺伝子群のうち *Tbx1/Tbx5/Six1/Cyp26/Nr2f2/Raldh2* の局在変化が見受けられた。特に *Cyp26a1/b1/c1* の発現は強く抑制されて、同遺伝子群のエンハンサー領域でのヒストン H3k27 ではトリメチル化されていた。一方、*Nr2f1/2* および *Raldh2* 遺伝子群のエンハンサー領域でのヒストン H3k27 ではアセチル化が亢進していた。

【目 的】

ヒト先天異常において、心奇形・心機能異常、および口唇口蓋裂の発症頻度は非常に高い。しかしながらほとんどの発症成因が不明であり、環境要因に依存して発症する“多因子疾患”と考えられている。発生後期胚で DEX を用いた研究結果として高頻度の口唇口蓋裂を発症することが報告されており、エピゲノム変化による形態パターンニングの再編成の可能性が示唆されている。しかしながら、初期発生における報告はない。特に、頭部・心臓・四肢形成は発生初期 (7~9日胚) に基本的な位置情報は決定されており形態形成は開始されていることから、先天異常の理解においては明らかにすべき研究課題であると考えられる。

申請者は妊娠初期における高濃度コルチゾールが胎児先天異常を発症する催奇性因子となることを発見した。本研究では、非胎盤依存型培養系を用いて発生過程におけるコルチゾール (糖質コルチコイド) の詳細な分子機序を明らかにすることを目的とする。さらに、この発見は妊婦環境の改善を議論する上で科学的な証拠となると期待される。

【方 法】

1) コルチゾール暴露による心血管・頭頸部形態変化の組織学解析:

発生組織学解析 (3D 空間組織解析、疾患モデルとの遺伝学解析) を用いて、形態形成異常箇所の特定制と理由を明らかにする。

* OPT・CoMBI/EFIC を用いて、組織異常部位の空間的把握・理解を目指す。

* *Tbx1* および *Tbx5* の発現変化を伴う結果を得ており、両遺伝子との相互作用が推察される。DiGeorge 症候群 (*TBX1* の変異)、Holt-Oram 症候群 (*TBX5* の変異) は心臓・頭頸部の異常に加えて遺伝的要因以外で重症化する。*Tbx1*^{-/-} および *Tbx5*^{-/-} モデルマウスに DEX 処理を行うと重症化する萌芽的結果を得ており、詳細に解析する (*Tbx1*, *Tbx5* マウスは作成済)。

2) コルチゾール暴露による影響を受ける特定ゲノム領域とその制御機構:

オミクス解析(トランスクリプトーム解析・エピゲノム解析)を用いて、初期胚発生過程における DEX 暴露における催奇性の影響の評価と標的制御領域の規則性を明らかにする。

*DEX 暴露によって発現変化した遺伝子と相関性のあるオープンクロマチン領域を見出す。この領域は活性化 GR の制御領域である可能性が高い。

*GR-ChIPseq を行い、*Cyp26* 遺伝子群に着目する。理由は、DEX により遺伝子発現変化が見受けられていること、エンハンサー領域に複数のグルココルチコイドレセプター (GR) 結合領域が存在し結合する(実験済)。両者の解析結果により、精度の高い GR 制御機構の情報を得ることができる。*Tbx1/Tbx5* のエンハンサー領域研究は特定されておらず、本研究で明らかにできる可能性も高い。

【結 果】

1) コルチゾール暴露および阻害による心血管・頭頸部形態変化の組織学解析:

母体からの二次的な影響を避け、かつ、胚における直接的な薬効評価を行うため全胚培養系を用いて以下の実験を行った。コルチゾールのアゴニストとしてデキサメタゾン(DEX:浸透性グルココルチコイド)、アンタゴニストとしてミフェプリストン(RU486)を用いた。まず、先んじて報告されているようにDEX 暴露により口唇口蓋裂を発症するの否か、妊娠 11.5 日目に腹腔注射により DEX を投与して、妊娠 18.5 日目でマウス胎仔の形態変化を調査した。同条件での DEX 暴露胚は口唇口蓋裂、加え心大血管形成異常が確認された。

*初期発生における DEX 暴露胚の形態形成異常:

ICR 妊娠マウス 6 日目で胚を取り出し、体外培養下で DEX を添加して 3 日間胚発生(約 9 日胚)を観察したところ、濃度依存的に頭部形成奇形、特に顎顔面領域に重度の奇形が生じていた。心臓形成においては心筒形成以降の発生が停止した重度の奇形が見受けられた。通常胚発生過程 9 日目で心臓:全胚の体積比や発生進捗度に比べ、DEX 処理胚における心臓サイズが極端に小さく、発生も 8.5 以前で停止しているように見受けられることからより特異的な影響を受けていると考えられる。

コントロール胚(WT 胚)と DEX 処理胚との間でトランスクリプトーム解析を行ったところ、*Hoxb1*、*Hoxa2*、*Raldh2*などの通常体幹部遺伝子群の頭部領域での発現亢進が見受けられた。一方、胚発生初期に重要な形態形成遺伝子として *Cyp26a1*、*Tbx1*、*Isl1*、*Six1*、*Sall1* などの発現が減少していた。

*mRNA*FISH 用いて組織学的解析を行ったところ、頭部間葉組織で発現する *Tbx1*、*Pitx2*、*Six2* の発現領域は縮小し、一方心臓後方部領域で発現する *Raldh2*、*Tbx5*、*Nr2f2*、*Hey2* はより頭部側まで発現領域が拡大していた。これらの遺伝子群はトランスクリプトーム解析結果を反映していた。

*初期発生における RU486 暴露胚の形態形成異常:

前述項目の DEX 暴露実験と同様な条件下で RU486 暴露における胚発生への影響を調べた。予想に反して、頭部形成および心臓形成の両方において重度の発生遅延が観察された。上記で解析した遺伝子群に関して発現変化を調べたところ、*Tbx5* および *Hey2* は発現が減少、*Nr2f2* および *Raldh2* は心臓後域領域へ発現が拡大しており、*Tbx1* 等の遺伝子群は頭部間葉領域での発現が減少していた。

2) 疾患モデルマウス胚を用いた DEX/RU486 暴露下での胚発生異常のメカニズム理解:

先行研究において、*Tbx1*^{+/+} および *Tbx5*^{+/+} モデルマウスに DEX 処理を行うと重症化する萌芽的結果を得ており、詳細に解析した。作成済みの *Tbx1* および *Tbx5* 遺伝子改変マウス妊娠 6 日目に肺を取り出し、1) で用いた条件の 1/10 濃度の DEX/RU486 を添加して、3 日間全胚培養を行った。

* *Tbx1* 遺伝子改変マウスにおける解析:

DEX 暴露されたコントロール胚(WT 胚)では顕著な形態変化は見受けられず、*Isl1*、*Tbx5*、*Raldh2* 等の遺伝子発現変化は観察されなかったのに対し、*Tbx1*^{+/+} 胚においては頭部および心臓奇形が観察された。一方、RU486 暴露胚では際立った形態変化は観察されなかった。

* *Tbx5* 遺伝子改変マウスにおける解析:

DEX 暴露された *Tbx5*^{+/+} 胚においては際立った形態変化は観察されなかったのに対し、U486 暴露胚では心奇形が観

察された。Tbx5 の標的遺伝子である *Nppa*、*Hand* の発現は減少していた。

3) GR-ChIP および RAR-ChIP 解析における *Tbx1/Tbx5* 遺伝子制御機構:

Tbx1 遺伝子座にはグルココルチコイドレセプター (GR) 結合配列 (GRE) および RA 結合配列が近接している。核内受容体に属する GR はコルチコイドが結合することにより核内へ移行し直接特定の転写を制御することが報告されているが、全胚培養後の胚を用いて GR-ChIP、および RAR-ChIP 解析を行ったところ、DEX 濃度に依存して *in silico* GR 結合領域でのピークが観察されたのに相反して、*Tbx1* 遺伝子発現の抑制が見られた。また、*Tbx1* の標的とされる *Fgf8*、*Pitx2*、*Lhx2* のプロモーター領域でのヒストン H3K27 トリメチル化が亢進していた。一方、*Tbx5* 遺伝子座においても GRE が見受けられ、DEX に依存して *in silico* GR 結合領域でのピークが観察され *Tbx5* の発現亢進も見られた。

【考 察】

様々な動物種の妊娠後期における DEX 暴露による影響について、高頻度で口唇口蓋裂を発症することが報告されている (内閣府食品安全委員会平成 23 年度食品安全確保調査)。魚類においては水中での内分泌攪乱物質の一つとして頭部形成異常や前鰭形成異常の報告がある (Cheng et al., *Toxico. Sci.* 2017; Wilson et al., *J. Physiol.* 2013)。この影響はエピゲノム制御と密接に関係していると考えられ、今後早期と後期での胚に及ぼす影響の相違、DEX-GR の機能制御の違いを比較する実験を組む必要があると考えている。

一方、発生初期の影響についての記載はない。そのため、まずは早期胚における DEX の作用を理解する必要があると考えられた。本研究は、DEX 暴露下での発生早期胚発生の影響を調べた。加えて、母体からの二次的な影響を回避するために全胚培養系を用いて、既知遺伝子の組織学的な発現変化とトランスクリプトーム解析を行った。また、トランスクリプトーム解析で変化が見られた遺伝子に関しては、GR-ChIP、ヒストン-ChIP 解析を行い、ゲノム領域でのエピゲノム変化を追跡した。興味深いことに *Tbx1/Tbx5/Raldh2* 遺伝子座ともに GRE 近傍には RAR/RXR 結合配列が確認され、ヒストン K27 アセチル化酵素およびメチル化酵素と相互作用して両遺伝子発現を直接制御していることが見出された。加えて、本研究ではトランスクリプトーム解析と GR-ChIPseq/*Tbx1*-ChIPseq/RAR-ChIPseq/ヒストン ChIPseq 結果を統合した結果から、基本的には制御されるゲノム領域の違いはなく DEX で活性化された GR は遺伝子発現亢進・抑制の両方の作用があることを見出した。DEX 暴露胚における *Tbx5* 遺伝子座における制御については、アセチル化およびメチル化の亢進は見られず制御機構においては研究すべき課題が残った。現時点では *Raldh2* の発現亢進による過剰な RA の産生が引き起こされ胚の後方が生じた結果、二次的な作用で *Tbx5* の発現領域も頭部側へ拡大した可能性が考えられる。今後は亢進タイプ・抑制タイプを切り替える因子を同定し、時期特異的な胚発生制御機構を明らかにする。加えて本研究の ChIPseq を用いたデータ解析により、グルココルチコイド暴露下では過剰に活性化した GR は RARE/RXRE にも結合して下流に間違った転写活性を引き起こしている可能性も見受けられ、レチノイド・性ホルモンとの誤認作用の可否についても追試していく予定である。

課題の二つ目として、母体内でのコルチゾール (グルココルチコイド) の血中濃度および胎盤を通して胎仔に暴露されるグルココルチコイド濃度の解析が不明瞭のまま残された。今回の研究では代謝産物として DEX に焦点を当て、GR-ChIPseq を用いることによって実際に胚で活性化された GR が GRE に結合している結果を得ることができた。このことにより、胚発生において GR が機能していることを示しているが、今後は通常の母体内で発生した胚を用いてのエピゲノム解析が必要と考えられる。

本研究は、内分泌攪乱物質の一つとされるコルチゾール・コルチコイドに焦点を当てることにより DiGeorge 症候群 (*TBX1* の変異)、Holt-Oram 症候群 (*TBX5* の変異) の遺伝的要因以外で重症化する心臓・頭頸部異常の時期と、その分子メカニズムの一端を明らかにした。特に、Tbx と GR には遺伝学的な相互作用が存在することを見出した。内分泌攪乱物質の研究は昔からされてきており分子機能も明らかになってきたが、GR が胚発生の主要な遺伝子群に時期特異的に作用しているのか、また作用されるゲノム領域においても明確な解答を得ていない。本研究を継続することにより、先天異常の発症と合併症についての知見が得られると期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、3つの発展が期待される。

- 1: 内分泌攪乱物質・ストレスホルモンの一つとされるコルチゾール・コルチコイドの高濃度暴露のみならず抑制は、身体への危険信号であるとともに胎児発生においても悪影響を及ぼすことを示す科学的な証拠となる。妊婦・妊娠適齢期の体質改善・環境改善へ強く提示できる。
- 2: 胚発生時期(初期・後期)における GR が制御する特定ゲノム領域の同定および促進・抑制機能の解明は、合併症抑制における創薬開発や安全管理に向けた新たな情報を提供できる。
- 3: 哺乳類胚発生の胚外生体イメージング/ハイスループット薬理スクリーニング系として大きな可能性が期待される。

【参考・引用文献】

1. Katano W, Mori S, Sasaki S et al., Sall1 and Sall4 cooperatively interact with Myocd and SRF to promote cardiomyocyte proliferation by regulating CDK and cyclin genes. *Development*. 2023 Dec 15;150(24):dev201913.
2. 門脇伊吹、浅沼禎、小柴和子、竹内純 先天性疾患: *TBX5* 遺伝子と Heart-Hand 症候群 特集「先天性小児疾患研究の最前線」小誌月刊「細胞」2024

最後に

本研究は先進医薬研究振興財団からの研究助成に助けられました。選考に携わった先生方、関係者の皆様に感謝しています。研究助成があつて新たな研究結果を見出すことができました。分子メカニズムを明確にして報告できるように精進いたします。また、東京科学大学大学院医歯学相互研究科井関祥子教授、古川哲史名誉教授には研究環境と議論の場を頂きまして大変感謝しております。