


身体所見

血圧：90/56mmHg. 脈拍：100/分・不整

座位において内頸静脈の拍動を鎖骨上で観察，甲状腺腫なし．傍胸骨拍動(右室拍動)を触知．S2p 亢進(心尖部で S2p を聴取)

心雑音：第 4 肋間胸骨左縁で逆流性収縮期雑音(Levine III / VI度)，

逆流性拡張早期雑音(Levine III / VI度)を聴取．呼吸音：両側肺野で低下

腹部：肝を 3 横指触知し圧痛あり，平坦軟

下腿浮腫：両側に++ (pitting edema)

下腿浮腫を診断

下腿浮腫をきたす疾患を表 1 に示した．全身倦怠感，食欲不振を伴い浮腫を認める疾患は，表 1 に数多く認められる．上腹部膨満感は腹水，肝腫大，イレウスなどの消化器系の異常で認められる．循環血液量の増大により肝うっ血から肝腫大を生じた場合にも上腹部膨満感を訴えることがある．したがって問診の段階では表 1 に示された疾患から診断を絞りきれない．

しかし，診察所見に重要な情報が数多く含まれている．丁寧な診察が鑑別診断を進めることでしばしばある．座位において内頸静脈が鎖骨より上で見えると右房圧は 10mmHg を超えることが知られている．傍胸骨拍動の触知は右室負荷があることを示し，心尖部付近で心音第 II 音の肺動脈成分 S2p (IIp 音) を聴取することは S2p の亢進を示唆し，第 4 肋間胸骨左縁で主に聴取される収縮期逆流性雑音は三尖弁閉鎖不全と考えられる．圧痛を伴う肝腫大はうっ血肝であることが多く，pitting edema(強く圧迫すると陥凹し回復するのに時間を要する浮腫)を示す下腿浮腫は循環血液量増大によって起こることが多い．以上から循環血液量増大による浮腫，特に心不全の可能性が非常に高いと推測される．

■右心不全の診察所見(表 2, 図 1)

これらの診察所見の中で診断を確定する最も大事な所見は，頸静脈の視診所見と思われる．頸静脈視診を適切に行えるかどうか右心不全の診断の最も重要な鍵といえる．頸静脈視診

表 1 下腿浮腫の鑑別

| | |
|------------------------------------|---|
| 1. 循環血液量増加 (Na ⁺ 増加) | 1) 心不全 2) 腎不全 3) 薬剤(ミノキシジル, Ca 拮抗薬, 抗炎症薬, ステロイドなど) 4) 妊娠 |
| 2. 静脈閉塞 | 1) 下肢深部静脈閉塞 |
| 3. 低アルブミン血症 | 1) ネフローゼ症候群 2) 蛋白漏出性胃腸症 3) 肝不全 4) 栄養失調 |
| 4. 血管透過性亢進 | 1) 熱傷 2) 外傷 3) 敗血症 4) アレルギー性 5) ARDS 6) 糖尿病 |
| 5. リンパ管閉塞 or 血管内膠質浸透圧上昇 | 1) リンパ節郭清 2) 悪性腫瘍 3) 甲状腺機能低下症 |

(Up to date on line 17.3 Burton D. Rose, MD より改変)

表 2 右心不全の診察所見

1. うっ血を示唆する所見
 - 1) 頸静脈怒張
 - 2) 肝うっ血
 - 3) 下腿浮腫(pitting edema)
2. 右室負荷を示す所見
 - 1) 右室拍動
 - 2) S2p 亢進(肺高血圧症を原因とする場合)
 - 3) 三尖弁閉鎖不全雑音
 - 4) 右心性 S₄
 - 5) 右心性 S₃

検査結果

血液所見

末梢血：WBC 4000/ μ L, RBC 450 万/ μ L, Hb 15 g/dL, Plt 13 万/ μ L

臨床化学：Alb 3.6 g/dL, T-Bil 1.0 mg/dL, AST/ALT 28/18 (IU/L),

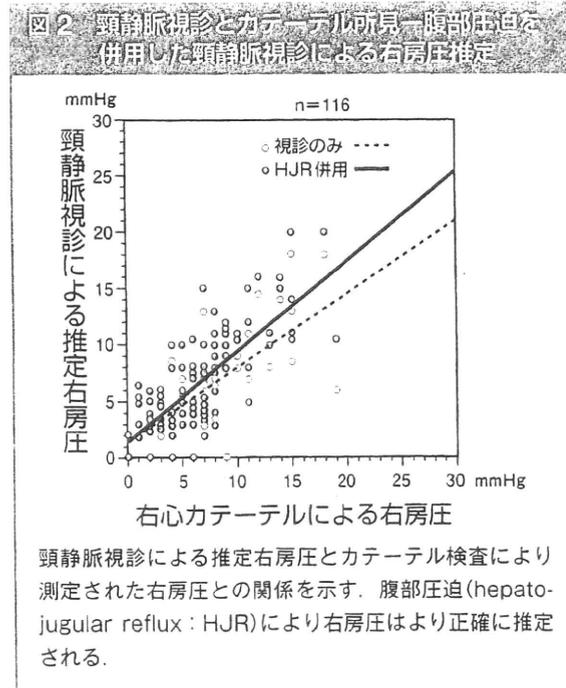
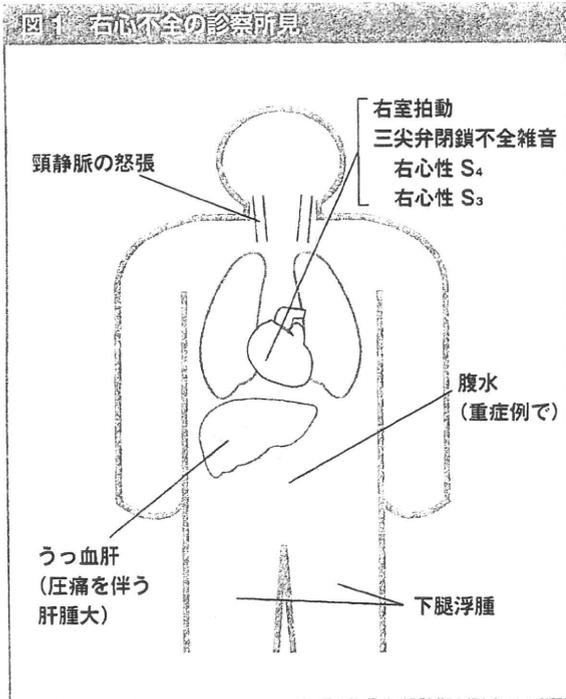
ALP 203 IU/L, BUN 16 mg/dL, Cre 1.0mg/dL, Na 140 mEq/L,

K 4.0 mEq/L, CRP 0.3 mg/dL, BNP 1,020 pg/mL

血清反応：RF 陰性, MPO-ANCA 陰性, ANA <40 ×

血液ガス所見(鼻カニューレ 3L 下)

PaO₂ 55Torr, PaCO₂ 33Torr, pH 7.42, HCO₃⁻ 33mmEq/L



による右房圧高値(Key Words—頸静脈怒張参照)は特異度の非常に高い所見といえるが感度が決して高くないことが以前から指摘されていた。しかし右季肋部を中心として腹部の圧迫を併用しつつ頸静脈を視診することにより感度が上がる(図2)。

他に右心不全による静脈うっ血を示唆する所見としては肝うっ血と下腿浮腫が挙げられる。肝うっ血を生ずると肝左葉が主に腫大し心窩部に触知されるようになる。急激に拡大して肝の被膜が伸張されるため圧痛を伴うことが診断に有用といえる。

右心不全の結果として生ずる所見ではないが、右心不全の前段階である右室負荷の所見としては、傍胸骨部の拍動、三尖弁閉鎖不全雑音、右心系のS₃、S₄などが挙げられる。傍胸骨拍動は健常成人で触知されることはなく、触れれば右室の圧あるいは容量負荷を示す所見といえる。右室圧上昇によりS₄は早期から聴取され、右心不全が進行するとS₃が出現する。右室は元来、壁が薄くコンプライアンスの高い(軟らかい)部屋であるためS₃は右室機能がかなり低下してから聞かれる。肺高血圧症を介した右心不全の場合にはS_{2p}の亢進所見が認められる(One Point Advice—S_{2p}の亢進参照)。

検査の進め方

病歴、診察所見から右心不全による下腿浮腫である可能性が高くなってきたため、次にすべきことは右心不全の確認、右心不全の原因疾

息の精査，右心不全の程度を知ることとなる。心肺系の異常の精査においては，まずは簡単にできる心電図と胸部 X 線検査を行って基本的情報を得る。次に非侵襲的にできる心肺系の検査として心エコーを施行する。ここまでの検査で上記の右心不全に関して必要な情報はほとんど得られているが，治療を始めるに当たってさらに必要な検査を追加する。当症例では肺高血圧症の程度が心エコーでは正確に評価できない場合も多いため右心カテーテル検査を施行した。

心肺系の検査順序 (図 4)

■胸部 X 線

左第 2, 4 弓が突出し，肺動脈，右室の拡大が示唆される。肺野は肺気腫のため過膨張し右肺に胸水も認められる。側面像では右室拡大のため胸骨後腔が狭小となっている (図 4a 白矢印)。

■心電図

右軸偏位，不完全右脚ブロック， V_5V_6 で深い S 波を認め，右室肥大と診断される。 V_1V_2 で尖鋭な P 波を認め右房負荷も伴っている。高血圧の影響で左房負荷，左室肥大も同時に認める。

■心エコー

短軸像では心室中隔は扁平化し右室圧が高いことがうかがえる。多量の三尖弁閉鎖不全の逆流を認め，jet から求めた推定肺動脈圧は 64mmHg であった。右室，右房が拡大し，下大静脈の呼吸性変動が低下して右房圧が高値であることが示唆された。

■右心カテーテル検査

脈拍 88/分，右房圧 (10)mmHg，右室圧 60/EDP 19mmHg，肺動脈楔入圧 (7)mmHg，肺動脈圧 60/15 (30)mmHg，心拍出量 2.3L/分，肺血管抵抗 10Wood 単位

■肺血流シンチグラム

defect 像を認めなかった。

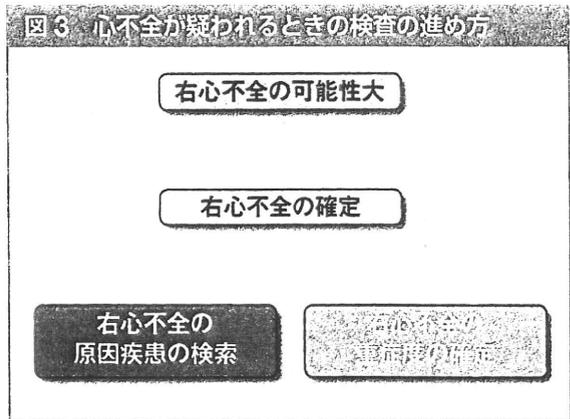


表 3 肺高血圧症の分類 (Danaport 分類, 2008 年改訂)

| | |
|--------------------------------|---|
| 1. 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) | 1) 特発性 (IPAH) 2) 遺伝性 3) 薬物と毒物 4) 各種疾患に伴う 肺動脈性肺高血圧症 ① 膠原病性 ② 先天性心疾患 ③ 肝臓病 ④ エイズ ⑤ 住血吸虫 ⑥ 溶血性貧血 |
| 1' 肺静脈および / または肺毛細管閉塞 | 5) 新生児遷延性肺高血圧症 肺静脈閉塞性疾患 (PVOD), 肺毛細管腫症 (PCH) |
| 2. 左心性心疾患に伴う肺高血圧症 | 1) 収縮障害 2) 拡張障害 3) 弁膜症 |
| 3. 肺疾患および / または低酸素血症に伴う肺高血圧症 | 1) 慢性閉塞性肺疾患 2) 間質性肺疾患 3) 混合性障害 4) 睡眠呼吸障害 5) 肺泡低換気障害 6) 高所への慢性曝露 7) 発育障害 |
| 4. 慢性血栓性および / または塞栓性疾患による肺高血圧症 | |
| 5. その他の肺高血圧症 | 1) 血液疾患： 骨髄増殖性疾患，脾摘出 2) 全身疾患： サルコイドーシス， ヒスチオサイトーシス X， リンパ管腫症，神経鞘腫， 血管炎 3) 代謝疾患： 甲状腺疾患，糖尿病， Gaucher 病 4) その他： 肺血管の圧迫 (リンパ節腫 脹，腫瘍，線維性縦隔炎) |

(第 4 回世界シンポジウム, Danaport, USA, 2008)

図4a 胸部X線

左第2, 4弓が突出し, 肺動脈, 右室の拡大が示唆される. 左第4弓は右下がりの時には左室拡大, 左下がりの時は右室拡大のことが多い. 肺野は肺気腫のため過膨張し右肺に胸水も認められる. 側面像では右室拡大のため胸骨後腔が狭小となっている(白矢印).

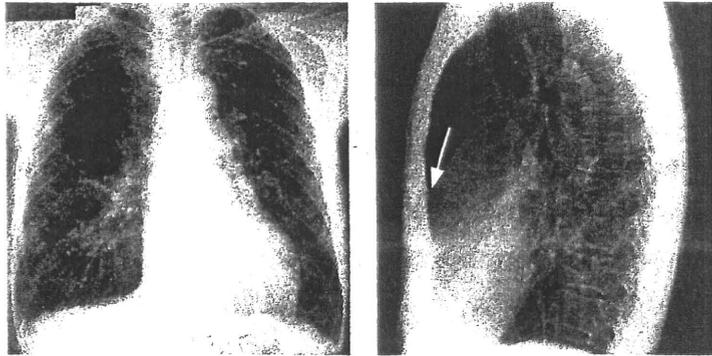


図4b 心電図

右軸偏位, 不完全右脚ブロック, V_5V_6 で深いS波を認め, 右室肥大と診断される. V_1V_2 で尖鋭なP波を認め右房負荷とも診断される. 高血圧の影響で左房負荷, 左室肥大も同時に認める.

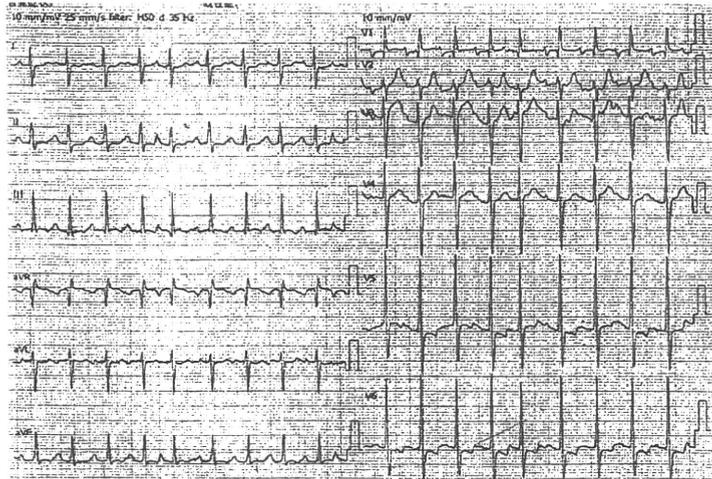
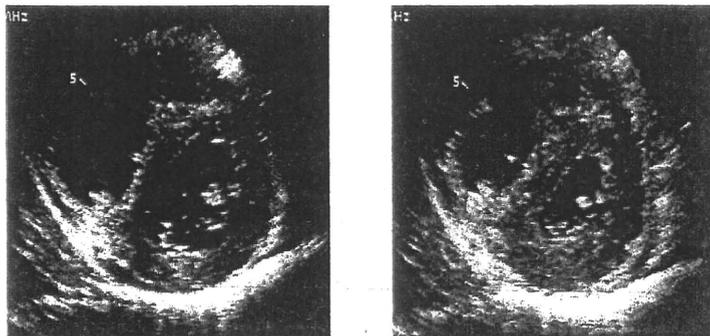


図4c 初診時経胸壁心エコー

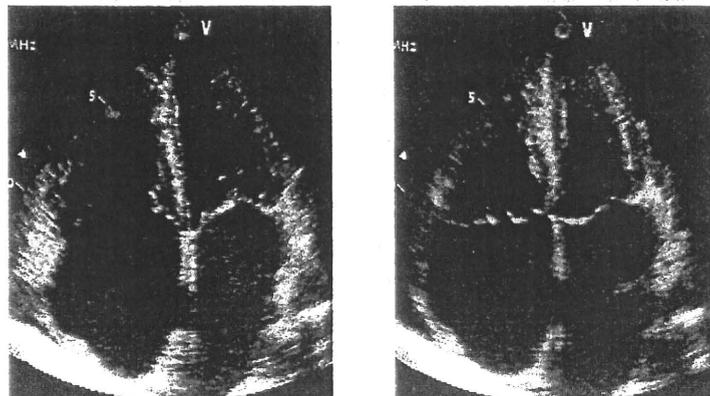
短軸像: 拡張期, 収縮期を通じて心室中隔は扁平化し右室圧が高いことがうかがえる. 三尖弁閉鎖不全の逆流 jet から求めた推定肺動脈圧は 64mmHgであった.



拡張期

収縮期

四腔像: 右室, 右房が拡大している.



最終診断

肺高血圧症による右心不全であることが検査所見から確認された。肺高血圧症の鑑別は肺血流シンチグラムで血栓塞栓性のものは否定され、肺動脈性肺高血圧症の中では膠原病は自己抗体が認められないことより否定的で、心エコーで心内シャントは存在せず、肝障害も認められないため門脈性のものは否定され、原因となる薬物の服用もなく、70歳という年齢から特発性のものも否定的で、肺疾患による肺高血圧症と心不全(肺性心)と診断された。

治療

右心不全に対しては利尿薬を開始し、低酸素血症に対しては酸素投与量を増量した(5L/分)。非侵襲的に測定した酸素飽和度は89%から95%へと上昇し、利尿も良好で下腿浮腫は4、5日でほぼ消失し、体重が約4kg減少した。食欲不振や上腹部膨満感も徐々に改善を認めた。心エコーで再検したところ下大静脈の呼吸性変動は回復していたが依然推定肺動脈圧は50mmHg近くあったため、肺動脈性肺高血圧症の治療に準じてシルデナフィルの内服を開始した。

退院後は動脈血酸素飽和度を正常域に保てる十分な酸素投与を行い、シルデナフィルを継続して経過をみる方針とした。

■肺動脈性肺高血圧症の一般的な治療法

肺動脈性肺高血圧症は、従来は死亡率の高い難治性疾患と考えられ有効な治療法はなかった(表4の「従来の治療」)。しかし、日本でも1999年より表4の「新しい治療」が行われるようになり生存率は徐々に改善が認められるようになった。現在では作用機序の異なる3種類の薬剤が使用される。肺疾患による肺高血圧症の治療は十分な酸素投与が最優先されるがそれでも肺高血圧症を残す場合には未だエビデンスはないが肺動脈性肺高血圧症に準じた治療が試み

表4 肺高血圧症の治療法

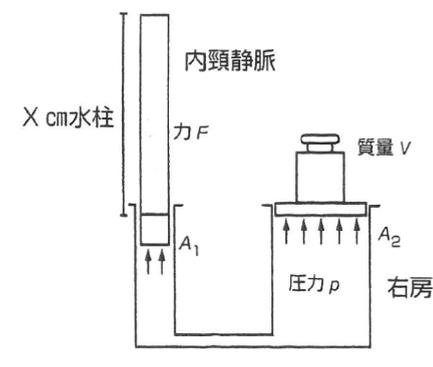
| | |
|---------|---|
| 従来の治療 | 1. 生活様式 運動量の制限, 女性の妊娠の禁止 |
| | 2. 右心不全 ジゴキシン 利尿薬(ラシックス [®] , アルダクトン [®] A) |
| | 3. 低酸素血症: 酸素吸入 |
| | 4. 抗凝固薬(ワーファリン [®]) |
| | 5. 血管拡張薬 1) Ca blocker 大量療法(5%に有効) 2) long acting beraprost (経口 PGI ₂)内服 3) epoprostenol (PGI ₂) 持続静注 |
| | 4) bosentan (エンドセリン拮抗薬)内服 5) sildenafil (PDE 阻害薬)内服 |
| 新しい治療 | 6. 移植—5年生存率 50% 生体・両肺・心肺移植・片肺 |
| | 7. 血管増殖抑制薬 imatinib |
| これからの治療 | |

られている。新しい3種の血管拡張薬の中で、肺疾患で大きい割合を占める肺内シャント(血流は存在するが酸素化されない肺内血)を増やさないことが示されているのはシルデナフィルのみとなり、これを開始した。

頸静脈怒張

頸静脈怒張とは、頸静脈視診により右房圧を推定し正常より高値であることを指す用語として使われる。頸静脈には内頸静脈と外頸静脈があり両者が観察されるが、内頸静脈の方が可視される頻度が高い。内頸静脈は気管近くの深い位置にあるため血管の拍動そのものが見えるのではなく拍動が周囲の筋肉などに伝わったものが観察される。内頸静脈はあくまで静脈であるため通常、拍動はないが、右房の拍動が、右房内圧に釣り合う内頸静脈の血液の柱の高さまで伝播する(図1)。逆にこれを利用して、拍動が観察される内頸静脈の最も高い位置を視診し右房までの高さを測定すると、これが右房圧に近い(図2)。

図1 内頸静脈視診による右房圧推定



右房拍動が伝播して内頸静脈は拍動する。波動力学の原理から、どこまで拍動するかは、右房圧に内頸静脈の血液の柱が釣り合っている位置までとなる。これを利用して右房圧を内頸静脈の視診から推定する。

S2pの亢進

肺高血圧症の所見としてS2p亢進はよく言及される所見であるが、聴き方はどうすればよいかの解説は少ない。自験の多数例の検討から、正常ではS2pは胸骨左縁2～4肋間で聴取されるのみであるが、肺高血圧症があつてS2pが亢進すると通常の左室心尖部とされる第5肋間中鎖骨線付近でも聴取される。これは右室の左方への拡大と、S2p音の持続が長くなり音量が増すことが理由と考えられる。

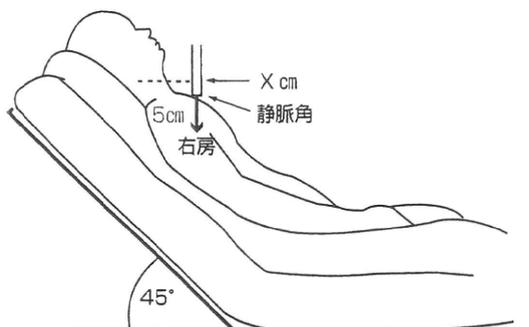
図2 右房圧の推定法

● 静脈角より拍動の最も明瞭な点までの距離を X cm

● 静脈圧は (5 + X) cmH₂O (水柱)

$$= \frac{(5 + X) \times 10}{13.6} \text{ mmHg}$$

● 頸静脈圧は 10cm 水柱(7～8mmHg) 前後までが正常

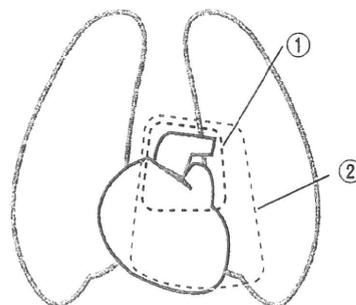


(Constant J. Bedside Cardiology. Lippincott Williams & Wilkins, 1999 より引用改変)

右房から内頸静脈の視診される最高点までの距離が推定右房圧となるが、右房の位置はほぼ、静脈角(第2肋間胸骨附着部)から5cm下方にある。したがって、静脈角から頸静脈拍動の見える最高点までの距離Xcmに5cmを加えた値が、右房圧と釣り合った、右房からの血液の柱の高さとなる。これに10を掛けてmm単位とし、水銀の比重13.6で割ると水銀柱で表した推定右房圧が得られる。

①通常のS2p聴取領域

②肺高血圧症でのS2p聴取領域



15. 肺動脈疾患

15-a

a. 急性肺血栓塞栓症

達成目標 A

学習の達成目標

- 肺血栓塞栓症の病態を説明でき、臨床症状、経過、身体所見、心エコー図から疑うことができる。
- ガイドラインに基づいて、Dダイマーや造影CTなどを用いた診断ができる。
- ガイドラインに基づいた急性期の対応ができる。
- 合併症や予後について知識を有し、専門医に紹介できる。

■肺血栓塞栓症の病態を説明でき、臨床症状、経過、身体所見、心エコー図から疑うことができる

■ガイドラインに基づいて、Dダイマーや造影CTなどを用いた診断ができる

臨床症状が6ヵ月以上持続することがなく、治療が遅れて肺動脈の閉塞・狭窄が残存しても、治療後には、閉塞・狭窄が肺動脈全体の10~70%を超えることはなく肺高血圧を生ずることもない。

●原因

急性肺塞栓症の70%で下肢深部静脈血栓症が原因疾患として存在し、下肢静脈血栓症の50%で急性肺塞栓症を合併する¹⁾。静脈血栓の生成に関してVirchowの提唱した静脈壁の障害、血流のうっ滞、凝固能の亢進という3徴を考慮する。表15-a-1に示したような血栓形成の誘因を複数有すると発症の危険が高まる。

●診断

この疾患の可能性を疑うことが重要で、突然の発症、急速に出現して持続する呼吸困難では常に鑑別診断に含める。以下に診断の要点を示す。

表 15-a-1 静脈血栓生成の誘因

| | |
|------------------|--|
| 静脈内壁の障害と局所血流のうっ滞 | 血管炎(Behçet病, 血管炎症候群など) 膠原病 手術 留置カテーテル・ペースメーカー 血管造影 |
| 血流うっ滞 | 長期臥床(術後, 外傷後, 血管造影後, 脳血管障害, 心不全, 慢性疾患) 乗り物(飛行機, 長距離トラックなど) 下肢静脈弁不全, 下肢静脈交通枝不全 肥満 妊娠 心房細動 |
| 凝固能亢進 | 悪性腫瘍 ネフローゼ症候群 血液疾患 妊娠 糖尿病 脂質異常症 アンチトロンピンⅢ欠損症 プロテインC欠損症 プロテインS欠損症 低プラスミノゲン血症 抗リン脂質症候群 ホモシスチン血症 |

a. 【症候】

①《中枢肺動脈の閉塞による症候》

呼吸困難が中心で、肺血流減少により死腔換気(血流のない肺胞領域で換気のみ行われる)が増加し換気量が増大すると呼吸困難を生ずる。労作時失神、咳嗽、動悸を訴えることもある。

②《肺梗塞による症候》

急性肺血栓塞栓症の10~20%に合併し、咯血、血痰、胸痛、発熱を伴うことがある。肺動脈は区域枝あるいは亜区域枝付近で気管支動脈と吻合しているが、末梢肺動脈は吻合が不十分で閉塞すると梗塞となる。高圧の気管支動脈の血流が肺組織に流れ込み、出血性壊死を起こす。

b. 【診察所見】

心電図や胸部X線検査よりも感度が高い。中枢肺動脈の閉塞によりⅡp亢進、右室拍動を認める。左室心尖部付近でもⅡpを聴取することがⅡp亢進を判定するのに有用となる。右心不全を合併すると、頸静脈怒張がみられ、右心性Ⅳ音、右心性Ⅲ音が聴取される。頻脈、血圧低下が認められることが多く、重症例ではショックとなる。肺梗塞の所見としては、梗塞部の水泡性ラ音、呼吸音低下、吸気時胸痛、浅い頻呼吸を認める。

c. 【胸部X線¹⁾】

呼吸困難を示す他の疾患(心疾患、肺疾患など)の除外診断を行う。一方、以下の所見は右

室負荷の増大を意味し、発症前の胸部X線と比較すると有用となる。左3・4弓の拡大(右室および右室流出路の拡大)、左2弓の突出(主肺動脈の拡大)、右2弓の拡大(右房の拡大)、右肺中間動脈の拡大(knuckle sign)などの所見。肺梗塞を起こすと浸潤影(Hampton's hump)、胸水貯留、希少血管野(血管陰影が明らかに減少し、他側と比較すると透過性が亢進する)がみられる。

d. 【心電図】

肺高血圧症による右心負荷を検出する。右室心筋は左室に比較すると心筋量が少ないため心電図に異常が現れないことがあり、心電図に異常所見を認める比率は50%以下といわれる。左室の虚血所見と類似する場合もあり、虚血性心臓病と誤診されることもある。洞性頻脈のほか、右軸偏位、SIQⅢTⅢ pattern、Ⅲ・aVFのST上昇あるいは陰性T波、V₁~V₄のST上昇あるいは陰性T波(V₁、V₂で顕著)、I・aVL・V₅・V₆のST低下(おそらく右室負荷のreciprocal change)、右脚ブロック、V₅・V₆のS波増高などがある。右房負荷を示す所見は、Ⅲ・aVF・V₁・V₂でのp波の増高と先鋭化となる。

e. 【血液ガス】

肺血流が減少して換気血流比不均等分布を生じ低酸素血症を認める。肺内血流分布の不均一さも換気血流比不均等分布に寄与している。換気が亢進するため低二酸化炭素血症も認める。

f. 【血液検査】

①《凝固線溶系マーカー》

Dダイマー(DD)は感度の高い検査で(感度98%、negative predictive value 98%)、上昇がないと急性肺血栓塞栓症は否定的といえる。

②《右心負荷を示す所見》

BNPや尿酸値は右心負荷を反映する。

g. 【心エコー図】

重症感のある急性肺血栓塞栓症でも心エコー図所見はほとんど正常か、異常が疑われるだけのことがある。右心負荷はあっても急性の場合には変化が捉えにくいから、元から存在する左心系の異常(左室収縮能あるいは拡張能低下)が右心負荷を隠すためと思われる。右室拡大、心室中隔の扁平化、三尖弁閉鎖不全より連続波ドプラーで検出される右室圧の上昇、右室流出路のパルスドプラー法を用いた右室圧上昇の検出、右室

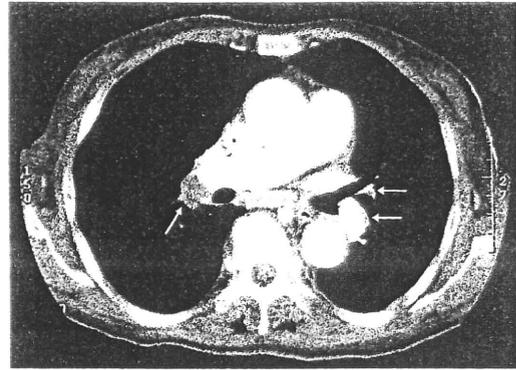


図 15-a-1 急性肺血栓塞栓症のCT画像
矢印部に血栓像が認められる

自由壁の壁運動低下が検出される。下大静脈、右房、右室の血栓も必ず検索し、存在すれば緊急手術を考慮する。下肢エコーによる深部静脈血栓の検索を行う。

h. 【CT】

最も簡便で鋭敏な確定診断の方法で、多列超高速CTで息止めなしに心血管系を撮影でき、区域枝までの血栓をとらえる特異度、感度とも90%前後とされる(図15-a-1)。

i. 【肺血流シンチグラム】

CTで簡便かつ短時間で診断され、利用頻度は減っている。感度・特異度ともに高い検査手段で、CTで捉えられないような小さい血栓閉塞も診断される。臨床的可能性が中等度でも肺血流シンチグラムで陽性であれば80~90%は急性肺血栓塞栓症が存在し、肺血流シンチグラムが陰性で急性肺血栓塞栓症が存在する可能性は6%以下とされる²⁾。区域枝領域以上の欠損像が多発し特に肺末梢を底辺として存在する。

j. 【肺動脈造影】

CTの進歩で施行される機会は少なくなった。臨床的所見と上記検査所見が一致せず確定診断に至らない場合、非常に重症で経皮的人工心肺補助装置(PCPS)の挿入が必要な時、抗凝固療法が不能で肺動脈血栓塞栓の直接除去が必要な時などにカテーテル検査が施行される。血栓塞栓による陰影欠損、肺動脈閉塞像・狭窄像などがみられる。

■ガイドラインに基づいた急性期の対応ができる

■合併症や予後について知識を有し、専門医に紹介できる

●治療

①【抗凝固薬】

新たな血栓の生成を予防する治療でヘパリンとワルファリンが主に使用される。ヘパリンは経静脈的に投与され、効果の出現が早く半減期も短い(約60分)。自己の線溶系を刺激しアンチトロンビンⅢの作用を促進して抗凝固能を発揮する。ヘパリンの投与方法に関しては Raschke らがノモグラムを作成している³⁾。投与初期は1時間ごとにAPTTを測定して投与量を調整する。APTTの正常値の1.5倍より2.5倍までの範囲で延長するようにコントロールし(通常50~70秒)、5~7日間投与する。ヘパリン投与の前には出血傾向の有無を検討する。ヘパリン因性血小板減少症、骨粗鬆症、肝障害、アルドステロン抑制などが副作用とされる。ワルファリンはなるべく早期より開始し、投与開始時にはプロテインC、プロテインSも抑制され凝固能は逆に高まるため、約5日間はヘパリンと重複させる。ビタミンKに拮抗して凝固因子の作用を抑制するが、第Ⅱ因子の半減期は2.5日間と長く抗血栓作用の発現には4~6日を必要とする。またワルファリンの投与量はプロトロンビン時間(PT)を使い、国際単位(INR)で2~3にコントロールする。明らかに下肢深部静脈血栓症(DVT)を起こす誘因がある場合には6週より3ヵ月、誘因がない場合は3ヵ月より6ヵ月間投与する。悪性腫瘍や先天性のthrombophilia(プロテインC欠損やプロテインS欠損症その他)など、是正が難しい血栓形成傾向があれば長期の投与が奨められる。ワルファリンの主な副作用も出血で、ヘパリンは投与を中止して早期に作用が失活するのに対し、ワルファリンは半減期が長くビタミンKや新鮮凍結血症(FFP)の投与が必要となる。

b. 【血栓溶解薬】

tissue plasminogen activator (t-PA) が使用される。適応は低血圧、極度の低酸素血症、明らかな右室負荷(心電図、心エコーなどで)とされる。血行動態が安定して閉塞範囲が広い急性肺血栓塞栓症に対しても、右心機能・肺血流・短期予後の改善、再発予防においてヘパリン単

独治療よりも優れていることが示されているが、われわれの経験からは血行動態が維持されている場合にはヘパリン単独治療で治療効果に遜色はない。むしろ、血栓溶解薬を使用して抗凝固薬を中止すると新たな血栓を生成しやすくなり、改善を遅らせる。血栓溶解薬投与時には自己の凝固能は逆に亢進する。副作用は出血で、投与前に禁忌とされる消化管出血の有無、最近の手術、脳血管障害の既往などを十分確認し、高齢者にも注意する。血管穿刺は最小限とし、血液ガス採取にも注意を払う。

c. 【下大静脈フィルター】

適応は、抗凝固薬投与により出血を起こしているか起こす可能性が高い場合、および抗凝固薬の適正な投与にもかかわらず肺血栓塞栓症を再発した場合となる。浮遊性の深部静脈血栓であっても適応とされない。実際には血栓発生の危険性が高い時期のみ使用する目的で一時的な下大静脈フィルターが使用され、急性期死亡が減少するとされる。急性期死亡は発症24時間以内に至適ヘパリン投与量を決定できるかどうか依存し、頻回のAPTT値測定が難しい施設では有用な治療手段であるが、6時間あるいは8時間ごとにAPTT値が正確に報告される施設では一時的な下大静脈フィルターは不要と考えられる。

d. 【カテーテルによる血栓除去】

抗凝固薬が使用できない場合やショックのためPCPSが血管造影室で挿入された場合に施行される。血管造影用のカテーテルで破砕して肺血流を再開させる。ショック状態を脱し得ない場合にはまずPCPSを挿入し全身の灌流を維持する。

e. 【予防】

長期のベッド上安静を避け、臥床が必要な場合には弾性ストッキング、間歇的下肢圧迫法、低分子ヘパリンが使用される。最近ではヘパリンに代わってXa因子阻害薬フォンダパリヌクスが塞栓予防に使用される。

文献

- 1) 佐藤 徹: 胸部X線写真. 肺血栓塞栓症の臨床. 国枝武義ほか編. 医学書院, 48-63, 1999
- 2) Hull, RD et al: Pulmonary angiography, ventilation lung scanning, and venography for clinically suspected pulmonary embolism with abnormal perfusion lung scan. Ann Intern Med 98(6): 891-

- 899, 1983
- 3) Raschke, RA et al : The weight-based heparin dosing nomogram compared with a standart care nomogram : Hull, RD et al : Pulmonary angiography, ventilation lung scanning, and venography for clinically suspected pulmonary embolism with abnormal perfusion lung scan. Ann Intern Med 98(6) : 891-899, 1983
 - 4) 日本循環器学会：循環器病の診断と治療に関するガイドライン。肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断、治療、予防に関するガイドライン(2009年改訂版)。http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2009_andoh_h.pdf(2011年1月15日閲覧)

15-b

b. 肺高血圧症

達成目標 A

学習の達成目標

- 肺高血圧症の病態を説明でき、臨床症状、経過、身体所見から疑うことができる。
- 心エコー図、心臓カテーテル、CT などから診断できる。
- 合併症や予後について知識を有し、専門医に紹介できる。

■ 肺高血圧症の病態を説明でき、臨床症状、経過、身体所見から疑うことができる

■ 心エコー図、心臓カテーテル、CT などから診断できる

●概念、定義

肺高血圧症は肺動脈圧が正常域を超えて上昇する病態を指し、右心カテーテル検査で肺動脈収縮期圧 30mmHg 以上あるいは平均肺動脈圧 (mPA) 20mmHg 以上といわれているが、特異度が 100% に近い定義は平均肺動脈圧 25mmHg 以上となる(1960年 WHO 世界会議での肺高血圧症の定義)。

●肺高血圧症の(存在)診断

以下の所見を総合して肺高血圧症の存在を診断する。

a. 【症状】

厚生労働省の難病指定申請用紙への記載内容からの統計では、1) 労作時呼吸困難 60%、2) 全身倦怠感 20%、3) 失神 13%となる。ほかに咳嗽、嘔声などを認める。

b. 【診察】

上記と同様の統計では、1) IIp の亢進 93%、

2) 三尖弁閉鎖不全雑音 40%、3) 下腿浮腫 32% などがあげられ、ほかに頸静脈怒張、右室拍動、右心性 SIII/SIV、肝腫大、肺動脈弁閉鎖不全などを認める。

c. 【胸部 X 線】

同様の統計で、1) 心陰影の左 2 弓突出を 90% で認めるとされるが、2) 右肺動脈中間動脈の拡大、3) 末梢動脈の狭小化、4) 右 2 弓突出、5) 左 4 弓の突出などを認める。

d. 【心電図】

1) 右軸偏位、2) V₁ の R 波増高、3) V_{5,6} の S 波増高、4) 右側胸部誘導の T 波陰転化、5) II・III・aVF・V₁・V₂ の p 波増高(右心不全の所見)を認める。

e. 【心エコー図】

ここにあげた種々の診断法の中で容易に施行できて感度、特異度とも高いのが心エコー図検査となる。1) 右室拡大、2) 短軸像で中隔の扁平化、3) 三尖弁逆流波に連続波ドプラを適用して推定右室圧の高値、4) 三尖弁閉鎖不全、5) 肺動脈弁閉鎖不全を認める。

f. 【肺血流シンチグラフィ】

1) 慢性肺血栓塞栓症：末梢を底辺とする楔形の多発欠損像、2) ほかの肺高血圧症：不均一な血流像(mottled pattern)を認める。

g. 【心臓カテーテル検査】

肺高血圧症においては大腿静脈穿刺では右心カテーテルを肺動脈末梢まで送るのが難しく、内頸静脈穿刺の方が容易であるためこちらを選択した方がよい。

1) 意義：a) 最終診断となり、b) 重症度判定・予後判定も行われる。

2) 所見：a) 肺動脈楔入圧(PCWP)15mmHg 以下、b) 平均肺動脈圧 25mmHg で診断される。c) 肺動脈血管抵抗(PVR)の求め方は、

$$PVR = \frac{mPA - PCWP}{CO} \text{ unit}$$

CO：心拍出量

d) CO(Fick 法)

$$= \frac{VO_2}{13.4 \times Hb \times (SpO_2 - SvO_2)} \text{ l/min}$$

となる。

VO₂：酸素消費量、Hb：血中ヘモグロビン濃度、SpO₂：動脈血中酸素飽和度、SvO₂：混合静脈血酸素飽和度(動脈血中酸素飽和度)で求められる。

表 15-b-1 肺高血圧症の分類(ダナポート分類 2008)

| | |
|---|--|
| <p>1. 肺動脈性肺高血圧症(PAH)</p> <p>1) 特発性 IPAH</p> <p>2) 遺伝性</p> <p>3) 薬物と毒物</p> <p>4) 各種疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症</p> <p>① 膠原病性</p> <p>② 先天性心疾患</p> <p>③ 肝臓病</p> <p>④ エイズ</p> <p>⑤ 住血吸虫</p> <p>⑥ 溶血性貧血</p> <p>5) 新生児遷延性肺高血圧症</p> <p>1' 肺静脈および/または肺毛細血管閉塞 肺静脈閉塞性疾患(PVOD), 肺毛細血管腫症(PCH)</p> <p>2. 左心性心疾患に伴う肺高血圧症</p> <p>1) 収縮障害</p> <p>2) 拡張障害</p> <p>3) 弁膜症</p> | <p>3. 肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症</p> <p>1) 慢性閉塞性肺疾患</p> <p>2) 間質性肺疾患</p> <p>3) 混合性障害</p> <p>4) 睡眠呼吸障害</p> <p>5) 肺泡低換気障害</p> <p>6) 高所への慢性暴露</p> <p>7) 発育障害</p> <p>4. 慢性血栓性および/または塞栓性疾患による肺高血圧症</p> <p>5. その他の肺高血圧症</p> <p>1) 血液疾患: 骨髄増殖性疾患, 脾摘出</p> <p>2) 全身疾患: サルコイドーシス, ヒストシオサイトーシス X, リンパ管腫症, 神経鞘腫, 血管炎</p> <p>3) 代謝疾患: 甲状腺疾患, 糖尿病, ゴーシェ病</p> <p>4) その他: 肺血管の圧迫(リンパ節腫脹, 腫瘍, 線維性縦隔炎)</p> |
|---|--|

(第 4 回世界シンポジウム, Danaport, USA, 2008 より引用)

3) 重症度診断

- ① 軽症: $25\text{mmHg} \leq$ 平均肺動脈圧 $< 35\text{mmHg}$,
- ② 中等症: $35\text{mmHg} \leq$ 平均肺動脈圧 $< 50\text{mmHg}$,
- ③ 重症: 平均肺動脈圧 $50\text{mmHg} \leq$.

h. 【血液検査】

1) 胆汁うっ滞型肝障害(肝うっ血による): アルカリフォスファターゼ, 総ビリルビンが上昇する. 2) 多血症(低酸素血症による)が認められる. ヘモグロビンが上昇する.

i. 【肺機能検査】

1) 低 O_2 血症, 2) 低 CO_2 血症, 3) 拡散能(DLco)低下が認められる.

●肺高血圧症の原因診断(表 15-b-1)

表 15-b-1 の番号に従って鑑別法を記す. この表に従って鑑別する. 1~4 の大分類により治療の選択が決まる. 1 の肺動脈性肺高血圧症ではさらに細かい原因の分類まで行い, 予後やさらに詳しい治療選択を決定する.

1. 他のカテゴリーの除外による.

a. 【膠原病】

自己抗体の採血や臨床症状より診断される.

b. 【先天性心疾患】

通常の 2D 心エコーで診断される症例もあるが, balanced shunt となっていることが多いためドブラを使っても診断が難しいことがありコントラスト心エコーで右左シャントを探すようにした方がよい.

c. 【肝疾患(門脈圧亢進)】

血液検査で中等度以上の肝障害を認める症例

の 1% 前後に認めるとされる. 発症原因は明らかではない.

d. 【HIV】

HIV の約 1~3% に認めるとされる. 抗体検査を鑑別のためには全例で施行した方がよい. AIDS の典型的症状を呈して肺高血圧症を示すようになる症例が多いが, 不顕性感染で肺高血圧症のみを認める症例もある.

e. 【薬剤性】

あらゆる薬剤で発症すると考えておいた方がよい. やせ薬を含む漢方薬, サリドマイドによるものを経験した. NSAIDs の長期常用が原因の可能性のある症例を 2 例認めた. 問診時に詳しく聞くようにする.

f. 【分類 5 の疾患】

分類 5 には肺高血圧症を合併する全身疾患が列挙されている. 肺高血圧症で発症し経過中にこのような疾患が顕在化する症例もあり, 他臓器の症状が現れたら十分な検索を進めた方がよい.

2. 心エコーで左心系の異常を認めるか, あるいはカテーテル検査で PCWP が高値となる. 多くの左心疾患は心エコーで異常が容易に見出されるが, 拘束型心筋症はかなりの肺高血圧症をきたし壁運動が正常のため見逃され, 肺動脈性肺高血圧症と診断されることがある.

3. 低酸素血症の有無, 肺機能検査, CT によって診断される.

4. 換気血流シンチグラム, 肺動脈造影により診断される. 換気シンチグラムでは正常で, 血流シンチグラムで末梢を底辺とする楔型の欠

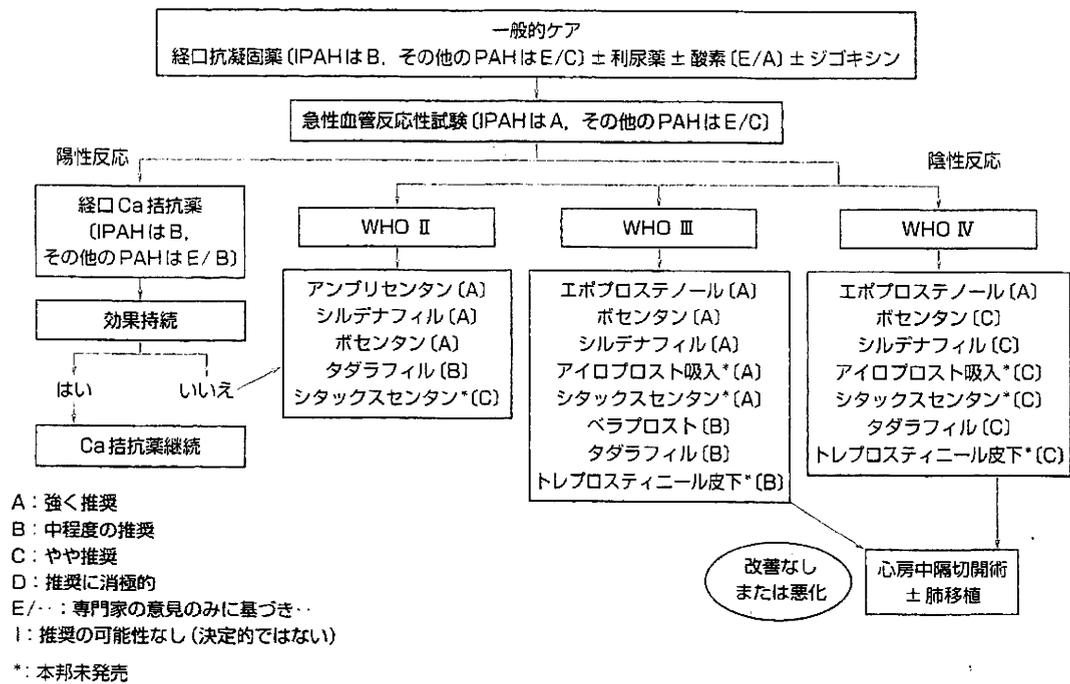


図 15-b-1 肺高血圧症の治療法 (ACCP ガイドライン, 2007 より一部改変)

損を認めると診断される。肺動脈造影では狭窄像、閉塞像、辺縁の不整像やweb形成を認める。CTは新鮮血栓の診断には有用であるが、慢性肺血栓塞栓症では血栓は器質化して内膜の肥厚像となるため、あまり有効ではない。

■合併症や予後について知識を有し、専門医に紹介できる

●肺高血圧症の治療(図 15-b-1)

治療の選択には、ACCPガイドライン¹⁾を参照。表 15-b-1 の分類に従って治療法を記す。

1. 図 15-b-1 に示した WHO II ではエポプロステノールを除く日本で使用される治療薬が使用される。WHO III ではエポプロステノールも使用されエビデンスレベルに応じて推奨度が違っている。WHO IV ではエポプロステノールのみが推奨度が高い。エポプロステノールは肺動脈性肺高血圧症治療薬として最も効果が高いが、在宅持続静注が必要でカテーテルの植え込みや点滴薬の調合など手間がかかる点である程度以上の重症例に限られる。しかし WHO IV で

開始した方が III で開始したより予後が悪いことが知られており、III でもある程度重症化したら投与に踏み切った方がよい。

2. 左心疾患の治療を行う。
3. 十分な酸素投与と肺疾患の治療。それでも肺高血圧症が残存する場合には、図 15-b-1 の肺動脈性肺高血圧症に使われる治療も行われる。

4. 以下の条件を満たせば血栓内膜摘除術の適応となる。a) 70 歳未満, b) 肺動脈造影 (PAG) で中枢性の血栓像, c) 肺動脈血管抵抗 (PVR) 5 wood unit 以上, d) ほかに臓器障害がない。

手術適応がない場合には図 15-b-1 の肺動脈性肺高血圧症の治療を行う。

文献

1) Badesch, DB: Medical Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: Updated ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest 131: 1917-1928, 2007

(佐藤 徹)

Zac1 Is an Essential Transcription Factor for Cardiac Morphogenesis

Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Toshimi Kageyama, Sung Han Yoon, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Takahiko Nishiyama, Ruri Kaneda, Mitsushige Murata, Fumiyuki Hattori, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Owen W.J. Prall, Richard P. Harvey, Keiichi Fukuda

Rationale: The transcriptional networks guiding heart development remain poorly understood, despite the identification of several essential cardiac transcription factors.

Objective: To isolate novel cardiac transcription factors, we performed gene chip analysis and found that *Zac1*, a zinc finger-type transcription factor, was strongly expressed in the developing heart. This study was designed to investigate the molecular and functional role of *Zac1* as a cardiac transcription factor.

Methods and Results: *Zac1* was strongly expressed in the heart from cardiac crescent stages and in the looping heart showed a chamber-restricted pattern. *Zac1* stimulated luciferase reporter constructs driven by *ANF*, *BNP*, or α *MHC* promoters. Strong functional synergy was seen between *Zac1* and *Nkx2-5* on the *ANF* promoter, which carries adjacent *Zac1* and *Nkx2-5* DNA-binding sites. *Zac1* directly associated with the *ANF* promoter in vitro and in vivo, and *Zac1* and *Nkx2-5* physically associated through zinc fingers 5 and 6 in *Zac1*, and the homeodomain in *Nkx2-5*. *Zac1* is a maternally imprinted gene and is the first such gene found to be involved in heart development. Homozygous and paternally derived heterozygous mice carrying an interruption in the *Zac1* locus showed decreased levels of chamber and myofibrillar genes, increased apoptotic cells, partially penetrant lethality and morphological defects including atrial and ventricular septal defects, and thin ventricular walls.

Conclusions: *Zac1* plays an essential role in the cardiac gene regulatory network. Our data provide a potential mechanistic link between *Zac1* in cardiogenesis and congenital heart disease manifestations associated with genetic or epigenetic defects in an imprinted gene network. (*Circ Res.* 2010;106:1083-1091.)

Key Words: heart development ■ transcription factor ■ *Zac1*/Plagl1

The importance of transcription factors in development and cell differentiation has recently been underscored by the discovery that the introduction of 4 transcription factors into fibroblasts produces pluripotent stem cells.¹ Heart development is known to be regulated by a number of highly conserved transcription factors, although the mechanisms and logic of that regulation remain unclear. GATA4, myocyte enhancer factor (MEF)2C, serum response factor (SRF), Tbx5, and *Nkx2-5* are expressed in the heart and play essential roles in its formation.²⁻⁵ Furthermore, many of these transcription factors interact and act cooperatively and synergistically to direct cardiac developmental programs.⁶ Despite their importance in cardiac development, however, none of the factors shows heart-specific expression, and it seems unlikely that a single factor determines cardiac cell fate.

We reported previously that transient treatment of differentiating embryonic stem cells with bone morphogenetic protein antagonists, efficiently induces cardiomyocyte differentiation.⁷ Exploiting this system, we subsequently screened embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for novel cardiac transcriptional factors using a gene chip analysis and found abundant cardiac expression of the zinc finger protein gene, *Zac1*. *Zac1* was initially identified as an antiproliferative protein,⁸ with subsequent studies implicating *Zac1* in tumor suppression and organ development.^{9,10} Furthermore, *Zac1* expression is regulated epigenetically during normal development. Imprinted genes are expressed from one allele according to their parent of origin, and this phenomenon is essential for mammalian embryogenesis. *Zac1* is a paternally expressed, imprinted gene.¹⁰ Although imprinted genes are

Original received March 3, 2009; resubmission received December 1, 2009; revised resubmission received February 2, 2010; accepted February 5, 2010.

From the Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics (S.Y., T.O., K.S., Y.O., T.K., S.H.Y., T.E., T.S., H.H., T.N., R.K., M.M., F.H., S.M., M.S., K.F.); Cardiology Division (S.Y., T.O., K.S., Y.O., T.K., S.H.Y., T.E., T.S., H.H., T.N., M.M., S.O.); Department of Internal Medicine; and Center for Integrated Medical Research (S.Y., S.M.), Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; Victor Chang Cardiac Research Institute (O.W.J.P., R.P.H.), Darlinghurst, New South Wales, Australia; and Faculties of Medicine and Science (R.P.H.), University of New South Wales, Kensington, Australia. Present address for O.W.J.P.: Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia.

Correspondence to Keiichi Fukuda, MD, PhD, Professor and Chair, Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan. E-mail kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp

© 2010 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214130

Downloaded from circres.ahajournals.org at KITAJIMA PUBLICATIONS KEIO IGAKU on May 12, 2011

| Non-standard Abbreviations and Acronyms | |
|---|-------------------------------|
| ANF | atrial natriuretic peptide |
| BNP | brain natriuretic peptide |
| ChIP | chromatin immunoprecipitation |
| E | embryonic day |
| EB | embryoid body |
| ES | embryonic stem |
| GST | glutathione S-transferase |
| LOT1 | lost on transformation 1 |
| MEF2C | myocyte enhancer factor 2C |
| MHC | myosin heavy chain |
| MLC | myosin light chain |
| P | postnatal day |
| PLAG | pleomorphic adenoma gene |
| SRF | serum response factor |
| ZRE | Zac1-response element |

important for mammalian development, their roles in heart organogenesis are unknown.

In the present study, we investigated how *Zac1* is involved in heart development. We show that *Zac1* is an essential cardiac transcriptional factor, being highly expressed in mouse hearts from embryonic day (E)8.5 to adulthood in a chamber-restricted pattern. *Zac1* was found to bind directly to the atrial natriuretic peptide gene (*ANF/Nppa*) promoter in vitro and in vivo, and to possess potent transcriptional activity. *Nkx2-5* and *Zac1* bound to adjacent sites within the *ANF* promoter, physically interacted, and synergistically activated cardiac gene expression. The *Zac1* promoter was activated by *Nkx2-5* in vitro, whereas *Nkx2-5*-null mice showed decreased *Zac1* expression. Genetic inactivation of *Zac1* in mice (paternal-mutated heterozygote-descendent mice) induced defective embryonic heart development and reduced expression of chamber and myofilament genes. Our results indicate that *Zac1* is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. Moreover, this is the first report that an imprinting gene mutation causes abnormal development of the heart.

Methods

Experimental procedures for in situ hybridization, animal study, immunostaining, Western blotting, plasmids, cell culture, electrophoretic mobility-shift assay, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, glutathione S-transferase (GST) pull-down assay, RT-PCR analysis, and statistical analyses are provided in the expanded Methods section in the Online Data Supplement, available at <http://circres.ahajournals.org>.

Results

Zac1 Expression in the Embryonic Heart

We used gene chip analysis to search for novel cardiac transcription factors. Initially, we screened for genes upregulated in Noggin-treated differentiating embryonic stem (ES) cells that contained conserved transcription factor motifs and then confirmed the expression in the heart by whole-mount in situ hybridization. We also analyzed the transcriptional po-

tency of each identified factor in vitro using the *ANF* promoter as target gene. The *ANF* promoter is a marker of the developing chamber myocardium, and is responsive to various signals, including those controlling cardiac growth, remodeling and pathological overload.¹¹ We screened for upregulated genes by comparing cardiomyocyte-rich differentiating ES cell-derived embryoid bodies (EBs) and nontreated EBs at day 6 of culture. Three hundred fifty-three genes were upregulated (>4-fold) in Noggin-treated EBs. Among them, 13 genes encoded a recognizable conserved transcription factor motif and had not yet been analyzed in the context of heart development. These were analyzed for cardiac expression, and 6 genes were analyzed for *ANF* promoter transactivation.

In situ hybridization of staged mouse embryos showed weak expression of *Zac1* in the cardiac crescent and other embryonic sites at E7.75 and stronger heart expression at E8.5, E9.0 and E9.5 (Figure 1A). Expression at E8.5 was enriched in chamber myocardium. Immunostaining revealed *Zac1* protein expression in the heart at E8.5, E9.5, and E10.5, with a heart expression pattern similar to that of α -Actinin, but included more extensive expression in mesenchyme dorsal to the heart tube, corresponding to the second heart field (SHF) (Figure 1B). *Zac1* protein expression was also enriched in chamber myocardium at E9.5 and E10.5, being lower in nonchamber myocardium of the atrioventricular canal (Figure 1B). In COS7 cells, overexpressed *Zac1* was localized to the nucleus, as assessed by immunohistochemistry with an anti-*Zac1* antibody (Figure 1C). Fractionation of COS7 cells transfected with increasing amounts of expression vector followed by SDS-PAGE and immunoblotting confirmed the specific accumulation of *Zac1* in the nuclear (Figure 1D).

Zac1 Is a Potent Activator of *Nppa* Gene Expression

We used the gene promoters from *ANF*, brain natriuretic peptide (*BNP/Nppb*), and α -myosin heavy chain (α -*MHC/Myh6*) to evaluate the transactivational potency of *Zac1* in COS7 cells in comparison to that of cardiac transcription factors MEF2C, GATA4, and SRF. *Zac1* activated these promoters in a manner similar to the other factors (Figure 2A), in the case of *ANF* >250-fold. We also performed the luciferase assay using neonatal rat ventricular cardiomyocytes (Online Figure I). In these cells, *Zac1* increased *ANF* and *BNP* promoter activities, as did the other transcription factors; however, relative transactivation was not as strong as in COS7 cells. The α -MHC promoter did not significantly respond to any of the factors, likely because cardiac transcription factors including *Zac1* are strongly expressed in these cardiomyocytes and the effect of additional expression is weak or insignificant, depending on the promoter. Although *Zac1* has been identified as a transcription factor and its binding sequence reported,¹² homologous sequences were not identified in the *ANF* promoter. To show that the *Zac1*-dependent *ANF* promoter activation was regulated in a DNA-binding-dependent manner, we constructed a series of *ANF* promoter mutants and mapped the *cis*-regulatory sequence that mediates the response to *Zac1* to the region from

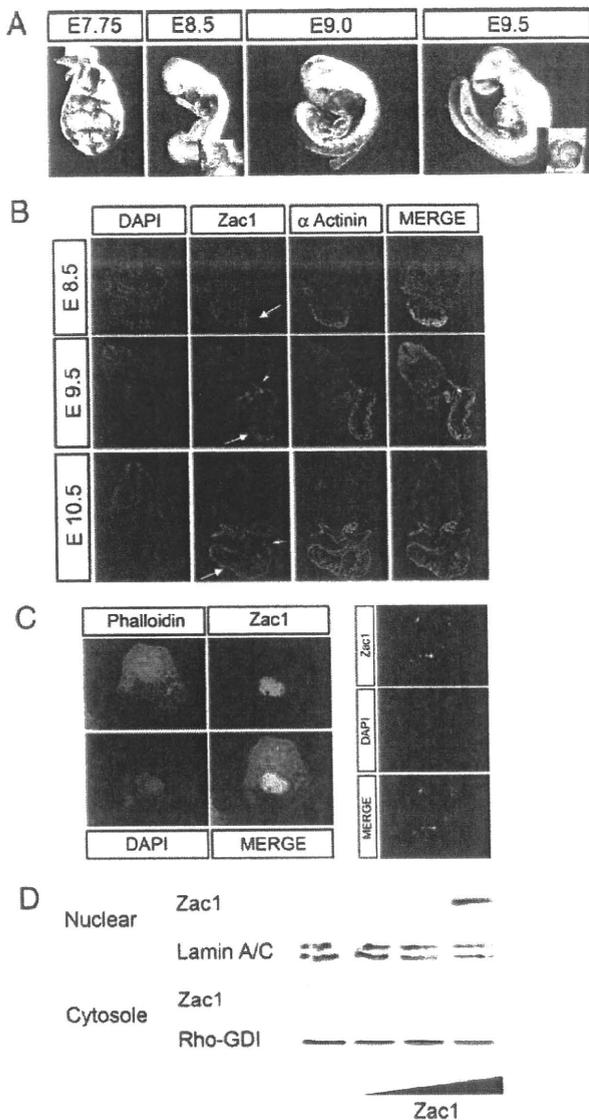


Figure 1. Expression of Zac1 in the murine embryonic heart. **A**, *Zac1* transcripts were detected in mouse embryos by whole-mount in situ hybridization. *Zac1* expression is weakly expressed in the cardiac crescent at E7.75 but detected throughout the heart at E8.5, E9.0, and E9.5. Frontal view of heart is shown in the inset. **B**, Immunostaining for the Zac1 protein in E8.5, E9.5, and E10.5 mouse embryos (transverse section). Zac1 protein is expressed in the heart enriched in chamber myocardium, whereas α -actinin is expressed throughout the heart and in the somites. Expression at E8.5 was enriched in chamber myocardium (arrow). Zac1 expression included more extensive expression in mesenchyme dorsal to the heart tube, corresponding to the SHF (arrowhead). Zac1 protein was also enriched in chamber myocardium (arrow) at E9.5 and E10.5, being lower in nonchamber myocardium of the atrio-ventricular canal (short arrow). **C**, Immunostaining of Zac1 protein in transfected COS7 cells, showing expression in the nucleus. **D**, Subcellular location of Zac1 protein in transfected COS cells, as detected by Western blotting. The nuclear accumulation of Zac1 is proportional to the DNA dosage used for transfection. Lamin A/C is a nuclear protein control, and Rho-GDI is cytosolic protein control.

-111 to -93 (Figure 2B). The specific DNA sequence responsible for transactivation by Zac1 was further delineated by point mutagenesis. A Zac1-response element (ZRE) candidate sequence (GCCGCCG) within the *ANF* promoter was

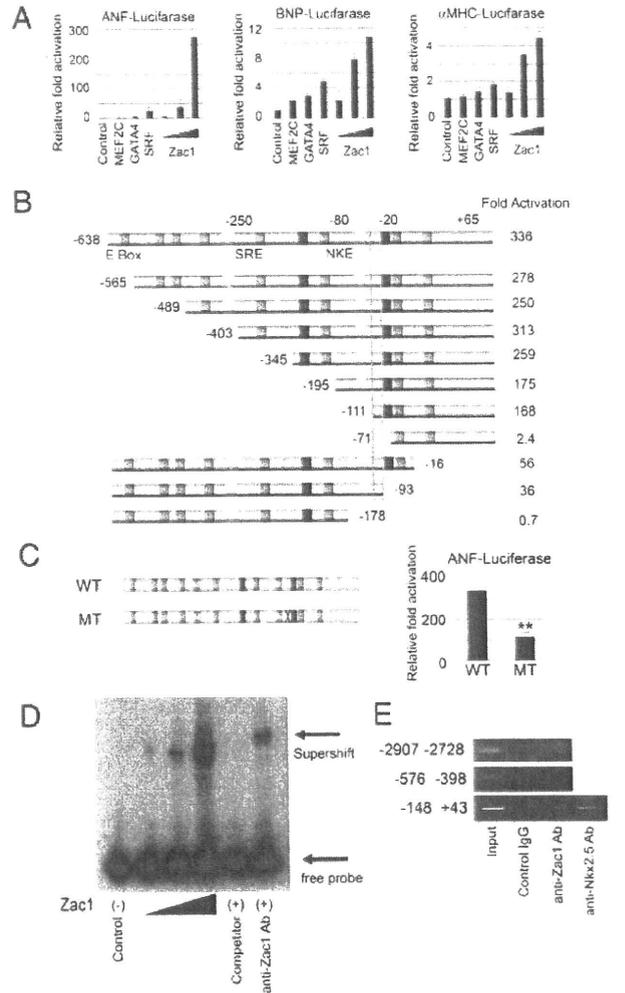


Figure 2. Zac1-transactivated ANF, BNP, and α -MHC genes. **A**, COS7 cells were cotransfected with a Zac1 expression plasmid and *ANF*, *BNP*, or α -*MHC*-luciferase reporter constructs. Values are expressed as the fold increase in luciferase activity compared to the empty expression plasmid (Control). **B**, COS7 cells were transfected with the Zac1 expression plasmid and the indicated *ANF* luciferase reporter constructs. Values are expressed as the fold increase in luciferase activity compared to the empty expression plasmid (Control). Colored rectangles indicate conserved transcription factor-binding site; green box, E box site; blue box, NKE; yellow box, SRF-binding element. **C**, COS7 cells were transfected with the Zac1 expression plasmid and the indicated *ANF* luciferase reporter constructs. The Zac1 response element is shown in blue (wild-type [WT]), and this element is mutated in the mutant (MT) promoter. **D**, Electrophoretic mobility-shift assay reveals the binding of Zac1 to radioactively labeled ZRE. Cold competitor interferes with the binding of Zac1 to the labeled ZRE. An antibody specific for Zac1 (anti-Zac1 Ab) supershifts the Zac1/ZRE complex. **E**, ChIP analysis reveals the binding of Zac1 and Nkx2-5 to the *ANF* promoter including the region -148 to +43 in vivo. PCR-amplified bands are apparent for the input DNA and anti-Zac1 antibody-precipitated DNA.

at least in part responsible for Zac1-dependent transactivation because mutation of this sequence to GTATATG attenuated responsiveness to Zac1 (Figure 2C). An electrophoretic mobility-shift assay was performed to determine whether Zac1 bound directly to this GCCGCCG sequence. The total amount of Zac1/DNA complex increased in proportion to the

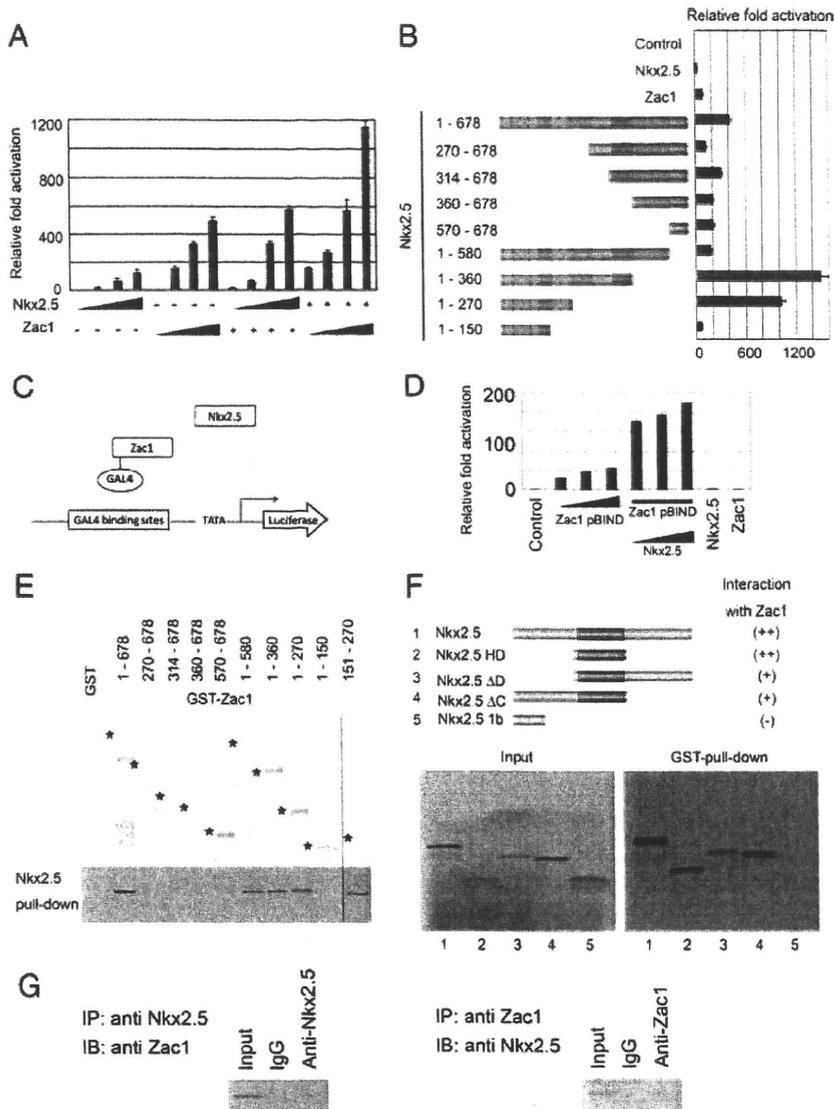


Figure 3. Zac1 and Nkx2-5 physically interact and synergistically activate ANF transcription. **A**, COS7 cells were transfected with ANF luciferase and expression vectors, encoding Nkx2-5 and Zac1. Both constructs synergistically activate ANF transcription (n=3). Nkx2-5 (10 to 300 ng); Zac1 (10 to 300 ng). **B**, Deletion mutants of Zac1 were tested for their abilities to synergize with Nkx2-5 to activate ANF luciferase in COS7 cells. Values are expressed as fold increase in luciferase expression compared to the control. **Colored rectangles** indicate conserved protein motifs; **green box**, zinc finger motif; **blue and red boxes**, amelogenin motif; **brown box**, trypan PARP-like motif. **C**, Zac1 was fused with GAL4. A luciferase gene controlled by multiple GAL4-binding sites was used. Nkx2-5 cannot directly bind to GAL4 sites. **D**, Zac1-GAL4 increased the transactivation by DNA binding and Nkx2-5 increased this transactivation without direct DNA binding in presence of Zac1-GAL4. Wild-type Nkx2-5 and wild-type Zac1 alone did not show transactivation. **E**, GST-Zac1 deletion mutants were incubated with [³⁵S]methionine-labeled Nkx2-5 translated in vitro. The input Zac1 deletion mutant proteins are shown at **top**. Nkx2-5 proteins that bind to GST-Zac1 deletion mutants are shown at **bottom**. **F**, GST-Zac1 was incubated with [³⁵S]methionine-labeled Nkx2-5 deletion mutants translated in vitro. The input Nkx2-5 deletion mutant proteins are shown in the left panel. Nkx2-5 proteins that bind to GST-Zac1 deletion mutants are shown in the right panel. **G**, Coimmunoprecipitated proteins for Nkx2-5 or Zac1 were analyzed by immunoblotting using Zac1 or Nkx2-5 antibody. Nkx2-5 associated with Zac1 in neonatal heart extracts.

nuclear-localized Zac1 protein in COS7 cells at increasing DNA dosage. Furthermore, this complex was extinguished by the addition of cold competitor and was supershifted by the anti-Zac1 antibody (Figure 2D). To confirm that Zac1 binds to the ANF promoter in vivo, we used a ChIP assay. Cross-linked chromatin obtained from neonatal rat hearts was immunoprecipitated with the anti-Zac1 antibody. The precipitated chromatin DNA was then purified, and PCR analysis for enrichment of the target sequences revealed that Zac1 bound directly to the ANF promoter in vivo (Figure 2E). ChIP assay also showed that Nkx2-5 bound to same promoter region which includes an Nkx2-5-binding region (NKE). Zac1 did not bind to distant promoter regions which do not include a ZRE.

Zac1 Activates ANF Gene Expression Synergistically With Nkx2-5

The Zac1 DNA-binding site within the ANF promoter is adjacent to the reported binding site for Nkx2-5.¹³ Therefore, we used the ANF promoter to ascertain whether Zac1 acts

synergistically with Nkx2-5 to activate transcription. Vectors for these transcription factors were cotransfected at different DNA dosages into COS7 cells (Figure 3A). Zac1 activated the ANF promoter >1100-fold in a dose-dependent manner and this required the presence of Nkx2-5. Moreover, maximum activation by Nkx2-5 (>600 fold) required Zac1. To identify the protein domain of Zac1 that is involved in this synergistic activity with Nkx2-5, we cotransfected several mutated forms of Zac1 and Nkx2-5 into COS7 cells and measured the transcriptional activity of the ANF promoter (Figure 3B). Deletion of the 6 zinc finger domains in Zac1 (green domains in Figure 3B) reduced its ability to stimulate transcription. Notably, carboxyl-terminal deletion mutants 1 to 360 and 1 to 270, which potentially lack C-terminal repression domains, showed strong synergistic activities with Nkx2-5 (1000- to 1400-fold), which in turn was reduced by deletion of the zinc finger 5 and 6 domains (Figure 3B). Therefore, our data implicate zinc finger domains 5 and 6 of Zac1 in the functional interaction with Nkx2-5. To clarify the requirement of DNA binding for the interaction between

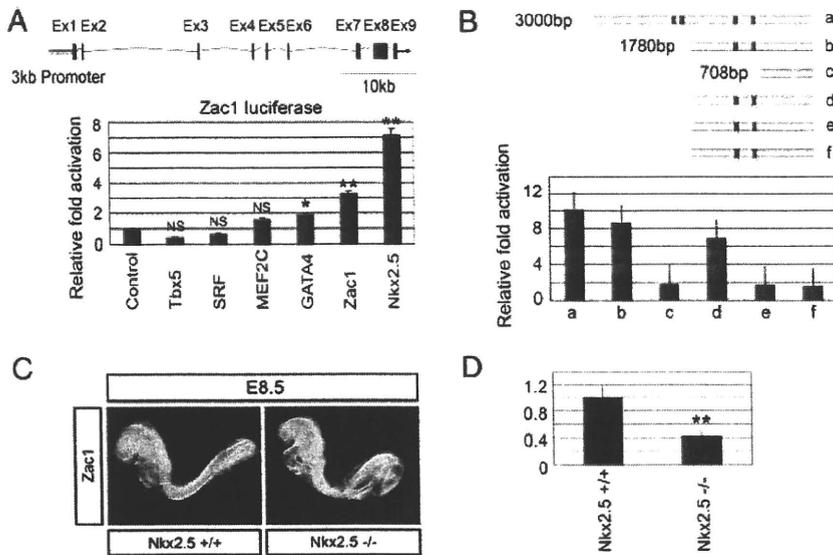


Figure 4. Nkx2-5 regulates *Zac1* gene expression. **A**, Structure of the mouse *Zac1* gene. The red line indicates the 3000-bp promoter used in this assay. COS7 cells were transfected with *Zac1*-luciferase and expression vectors, encoding Tbx5, SRF, MEF2C, GATA4, *Zac1*, and Nkx2-5. **B**, Four Nkx2-5-binding sites (blue bar) within the *Zac1* 3kb promoter/enhancer region are shown. Mutation of the third Nkx2-5-binding site (e and f) diminished the Nkx2-5-dependent *Zac1* promoter transactivation. **C**, Detection of *Zac1* transcripts by whole-mount in situ hybridization in wild-type and Nkx2-5 knockout embryos at E8.5. **D**, Quantitative RT-PCR analyses for *Zac1* transcripts in wild-type and Nkx2-5^{-/-} mice are shown.

Zac1 and Nkx2-5, we performed a mammalian 1-hybrid assay (Figure 3C). In this assay, *Zac1*, expressed as a fusion protein with the DNA-binding domain of the yeast transcription factor GAL4, was transfected with a luciferase vector under the control of multiple GAL4-binding sites (pBIND) and Nkx2-5 expression vector. Under these conditions, neither Nkx2-5 nor *Zac1* could directly activate luciferase gene expression (Figure 3D). *Zac1*-GAL4 alone increased basal activity up to 50 fold, and Nkx2-5 increased this level of transactivation to a maximum of >200 fold (Figure 3D). These data suggest that a functional interaction between *Zac1* and Nkx2-5 can occur in the absence of DNA binding.

To map the Nkx2-5-binding domain for *Zac1* and to verify the physical interaction between *Zac1* and Nkx2-5, GST pull-down experiments were performed using several recombinant GST-*Zac1* deletion mutant fusion proteins and in vitro translated wild-type [³⁵S]methionine-labeled Nkx2-5. The wild-type *Zac1*-GST fusion protein interacted with Nkx2-5, as did the GST-*Zac1* 1 to 580, 1 to 360, 1 to 270, and 151 to 270 mutants, which encompass the zinc finger 5 and 6 domains (Figure 3E). The results indicate that these 2 zinc finger domains located within the N-terminal half of *Zac1* are necessary and sufficient for association with Nkx2-5. To determine the domain of Nkx2-5 that interacts with wild-type *Zac1*, pull-down assays were performed with GST-conjugated full-length *Zac1* and [³⁵S]methionine-labeled deletion mutants of Nkx2-5 translated in vitro. Wild-type and homeodomain-containing deletion mutants of Nkx2-5, including a homeodomain-only fragment, clearly interacted with *Zac1*, whereas an N-terminal fragment lacking the homeodomain did not (Figure 3F). The homeodomain of Nkx2-5 is therefore necessary and sufficient to mediate association with *Zac1*. These results demonstrate the importance of a protein-protein interaction between *Zac1* and Nkx2-5 for gene activation in the heart. Although the *Zac1* constructs amino acids 270 to 678, 314 to 278, 360 to 678, and 570 to 678 do not interact with Nkx2-5, they still show significant synergy with Nkx2-5. Because those mutants contain amino acids 570 to 678, we speculated that the 570 to

678 region of *Zac1* was responsible for *Zac1* dominant-active activity. Its mechanistic role is independent of a protein-protein interaction with Nkx2-5, and will be further investigated.

To demonstrate this more physiologically, we performed a coimmunoprecipitation assay to assess the existence of complexes between Nkx2-5 and *Zac1* in nuclear extracts from neonatal rat hearts (Figure 3G). Coprecipitation of *Zac1* with immunoprecipitated Nkx2-5, and of Nkx2-5 with immunoprecipitated *Zac1*, was observed.

Zac1 Is Expressed Downstream of Nkx2-5

As noted above, whole-mount in situ hybridization analysis revealed expression of *Zac1* transcripts in the cardiac crescent region in embryos at E7.5, when cardiogenic precursors are specified (Figure 1A). Shortly thereafter, *Zac1* was expressed strongly in a chamber-restricted manner in the developing heart tube. To investigate the regulation of *Zac1* expression in the heart, we evaluated a 3000bp *Zac1* 5' proximal, cis-regulatory fragment, which contained numerous putative cardiac transcription factor binding sites as predicted by the TFSEARCH program (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Although Tbx5, SRF, and MEF2C had no significant effect on transcriptional activity, both *Zac1* and Nkx2-5 specifically augmented *Zac1* expression (Figure 4A). The activity of *Zac1* suggests autoregulation, perhaps in collaboration with Nkx2-5. To clarify the role on Nkx2-5 on *Zac1* promoter activation, we deleted or mutated several Nkx2-5-binding sites found within the 3kb promoter fragment (Figure 4B). Of the 4 consensus Nkx2-5-binding sites detected, mutation of the third site alone or in combination with other sites diminished Nkx2-5-dependent *Zac1* transactivation (Figure 4B). We also examined the expression of *Zac1* in Nkx2-5-null embryos to confirm that Nkx2-5 regulates *Zac1* expression in vivo. *Zac1* mRNA levels were downregulated, as assessed by whole mount in situ hybridization, and quantitative RT-PCR analysis indicated a reduction to approximately one-third of wild-type levels at E8.5 in Nkx2-5^{-/-} embryos (Figure 4C and 4D). These results

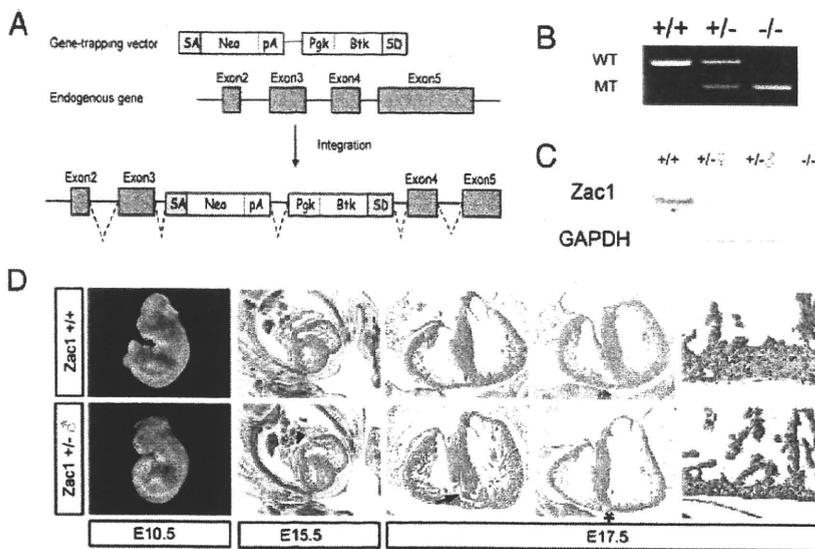


Figure 5. *Zac1* gene targeting-induced cardiac malformations. **A**, Schematic representation of the gene-trapping vector (top), as well as wild-type (middle), and interrupted *Zac1* gene (bottom). **B**, Genotyping by PCR. The wild-type allele yields a 407-bp product, which is absent in the homozygous mutant mice. The 250-bp product represents the targeted allele-specific band. **C**, Confirmation of *Zac1* expression by Western blotting. **D**, Whole embryos at E10.5 and an embryonic heart at E15.5 and E17.5. Gross analysis of mutant embryos showed growth retardation and defective neural tube closure. Atrial septum defect (arrowhead) at E15.5, ventricular septum defect (arrow) at E17.5, and thin ventricular wall (asterisk) at E17.5 in *Zac1*-mutated embryos are shown compared to the wild-type controls.

indicate that *Nkx2-5* induces and/or maintains *Zac1* expression in vivo, likely in a collaborative manner with *Zac1* itself.

Partial Embryonic Lethality and Cardiac Malformation in *Zac1*-Null Embryos

To study the effect of the *Zac1* mutation on mouse development, we assessed a mouse line carrying an interruption in *Zac1* generated by ES cell gene-trap methodology from Lexicon Pharmaceuticals. This mouse line contains an insertion in intron 3, which is predicted to induce a null mutation of the *Zac1* gene (Figure 5A). We confirmed the expected genomic mutation by PCR analysis (Figure 5B). Because *Zac1* shows only paternal expression, being a maternally imprinting gene, *Zac1* heterozygous animals descendent from male *Zac1* heterozygotes were indistinguishable from homozygous littermates. As we expected, *Zac1* protein expression was totally abrogated in male *Zac1* mutant-descendent heterozygotes and homozygote mice (Figure 5C). Therefore, we deemed these 2 groups of mutant mice to be equivalent for the purpose of phenotypic analysis. At first we examined the gross phenotype of *Zac1* knockout mice which we generated and compared to the phenotypes previously described.¹² We confirmed that our *Zac1* knockout neonatal mice showed a similar phenotype with respect to overall weight loss, curly tail, and wrinkled skin. We analyzed 66 embryos at E10.5, 52 embryos at E15.5, and 89 embryos at E17.5. Gross examination of embryos at E10.5 revealed a defect of neural tube closure in 9% of *Zac1* mutants (Figure 5D). Histological analysis of the hearts of mutant embryos by serial sectioning along the anterior-posterior axis revealed an atrial septal defect in 42% of the mutant hearts at E15.5, as well as a ventricular septal defect involving fenestration of the muscular septum in 23% of the mutants and a thin ventricular wall in 26% at E17.5 (Figure 5D). At E17.5, we could not longer observe any of the neural tube defects evident in 9% of mutants at E10.5, suggesting a partially penetrant embryonic lethality before E17.5. Indeed, at E10.5, the expected Mendelian number of heterozygous embryos was observed (n=66). At E17.5, however, the number of heterozygous

fetuses was reduced to 91% (n=89). These findings suggest neural developmental disorder as a cause of embryonic lethality in a low percentage of mutants. We also genotyped neonates at postnatal day (P)0 and P5 and adults at P90. At P0, the expected number of heterozygote mice was reduced to 91% (n=101). Although there seems to be approximately 10% reduction of heterozygous embryo, we could not obtain statistical significant differences compared to expected Mendelian ratios until P0 probably because of the limited number of embryos. At P5, this was further reduced to 44% (n=86) and at P90 was 40% (n=62), indicating an additional postnatal lethality. After P5, there are significant differences in this sample size. We did not observe any cardiac phenotypes at adult stages, suggesting that they were involved in the postnatal lethality. Varrault et al reported that approximately 30% to 50% of mutants survived to adulthood, with the percentage affected by genetic background, which is consistent with our own.¹² To confirm that the targeted locus is a null allele, we reexamined *Zac1* expression in knockout mice and could not detect *Zac1* by Western blot analysis using 2 different antibodies and quantitative RT-PCR analysis using independent primer sets and probes (data not shown).

The *Zac1* Mutant Mouse Shows Abnormal Cardiac Gene Expression and Patterning and a Significantly Increased Number of Apoptotic Cells in the Heart

Because *Zac1* mutant mice showed cardiac morphogenetic abnormalities, we examined the expression patterns of several cardiac genes in these mice. The expression patterns of cardiac-expressed transcription factors *Nkx2-5* and *GATA4* were unaffected (Figure 6A and 6B). By contrast, the expression levels of the cardiac-specific genes *ANF*, *MLC2v* (myosin light chain 2v), and *MLC2a* were significantly down-regulated by both in situ hybridization and quantitative PCR (Figure 6C through 6E).

To clarify the mechanisms of cardiac malformation, we analyzed proliferation and apoptosis in the embryonic hearts. We found that *Zac1* mutant mice displayed a significantly

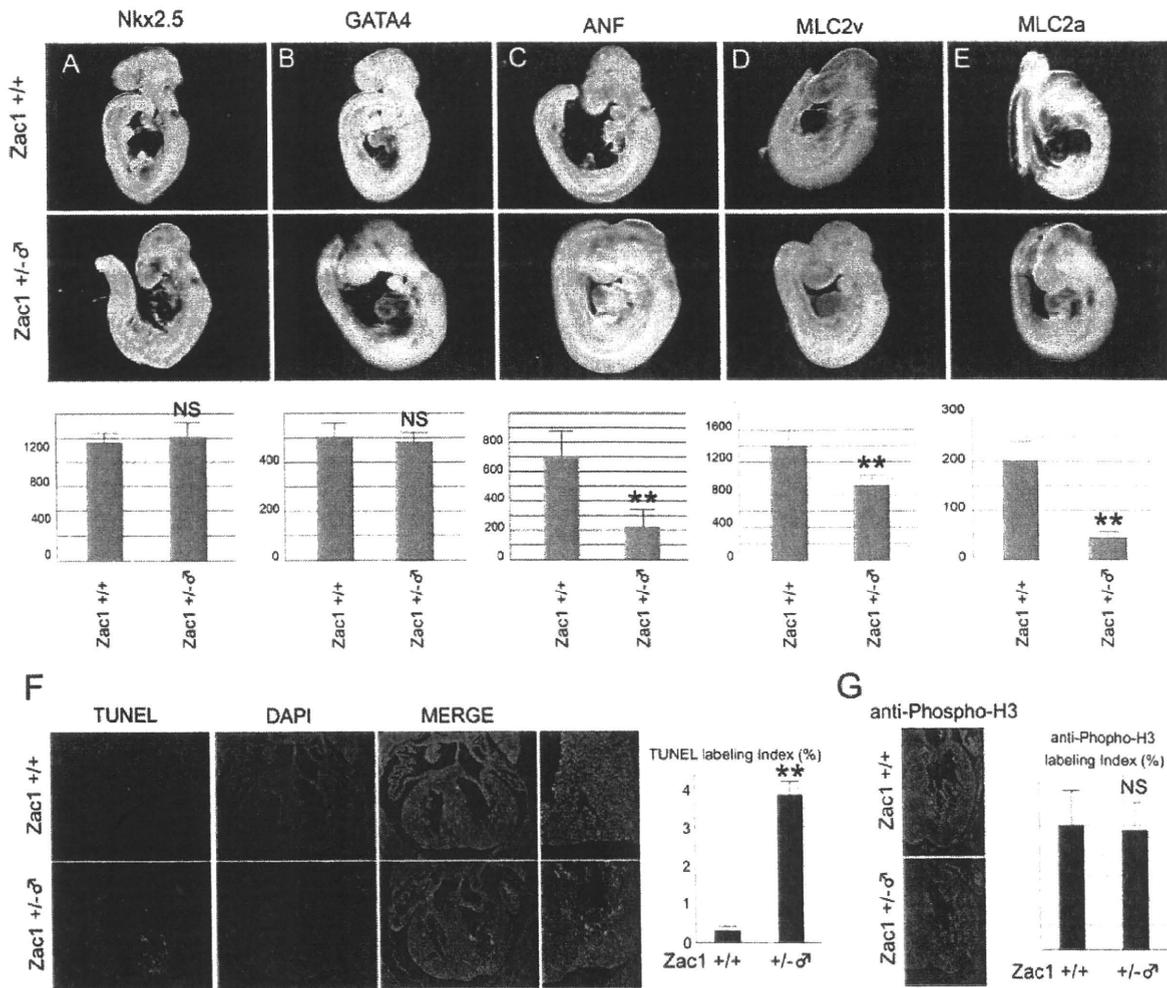


Figure 6. Altered gene expression in *Zac1*-mutated hearts. **A and B,** Expression levels of *Nkx2-5* and *GATA4* are normal in the *Zac1*-mutated heart, as assessed by whole-mount in situ hybridization and quantitative RT-PCR analysis. **C through E,** Expression levels of *ANF*, *MLC-2v*, and *MLC-2a* are decreased in the *Zac1*-mutated heart, as assessed by whole-mount in situ hybridization and quantitative RT-PCR analysis. **F,** Representative histological sections from the wild-type and *Zac1*-mutated hearts at E13.5 stained in the TUNEL assay. The numbers of positive cells in 5 different hearts of each genotype are shown. **G,** Representative histological sections from the wild-type and *Zac1*-mutated hearts at E13.5 stained with anti-phospho-histone H3 antibody. The numbers of positive cells in each 5 different hearts are shown.

increased number of apoptotic cells in the heart (Figure 6F). No such differences were observed in the number of proliferating cardiac cells (Figure 6G). *Zac1* is a known tumor suppressor gene, is frequently lost in multiple carcinomas, and promotes cell cycle and apoptosis.^{9,14} However, many of those studies are performed in cancer cell, and there is no study in the heart. Therefore, we considered that *Zac1* may have different, unique, and possibly opposite roles in cardiac development.

Discussion

In the present study, we identified the transcription factor *Zac1* as an important to heart development. Initially, we used gene chip analysis of ES cell-derived cardiomyocytes to discover new cardiac-specific transcription factors.⁷ Upregulated genes were tested for cardiac-specific expression and transcriptional potency using the *ANF* promoter, well studied as a cardiac target gene reflective of development and

pathological hypertrophy. We confirmed *Zac1* to be a strong transcriptional activator of cardiac gene in synergy with *Nkx2-5* and that *Zac1* itself is regulated by *Nkx2-5*. Analysis of a *Zac1* mutant mice verified that *Zac1* is required for proper cardiac morphological development and gene expression.

The *Zac1* Family of Transcription Factors

Zac1/LOT1/PLAGL1 is a member of the subfamily of *PLAG* (pleiomorphic adenoma gene) transcriptional factors. The *PLAG* family genes were defined by the capacity of *PLAG1* overexpression to induce pleiomorphic adenomas.¹⁵ The *PLAG* family comprises *PLAG1*, *Zac1/LOT1/PLAGL1*, and *PLAGL2*. These factors share high levels of homology, especially in their zinc finger amino-terminal regions, although they are functionally distinct. *PLAG1* is a protooncogene and a target of chromosomal rearrangements that results in tumorigenesis. *PLAGL2* is induced in human acute my-

eloid leukemia, and may in fact induce acute myeloid leukemia in cooperation with other fusion genes.¹⁶ PLAG1 and PLAGL2, therefore, have similar capabilities in tumorigenesis and have indistinguishable DNA-binding specificities, which are different from that of *Zac1*.¹⁷ *Zac1/LOT1/PLAGL1* is lost in malignant transformed rat ovarian surface epithelial cells, hence the name *LOT1* (lost on transformation).¹⁴ However, *Zac1* was also shown to regulate apoptosis and the cell cycle, accordingly named *Zac1*.⁸ Subsequently, the gene symbol for this family member was designated as *PLAGL1*. Although having a similar protein structure, *Zac1* appears to have an opposite function to PLAG1 and PLAGL2 in tumor formation and binds different DNA sequences.¹⁷ Therefore, we speculated that there is no functional overlap between *Zac1* and the other *PLAG* family genes.

Imprinting Genes in the Heart

From a metaanalysis of microarray data, *Zac1* was found to be a member of an imprinted gene network.¹² Classically, both alleles of a gene were thought to be actively transcribed and functionally equivalent. Since the identification of the first autosomally imprinted genes in 1990s, researchers have tried to elucidate imprinting functions.¹⁸ In the murine genome, approximately 600 genes are potentially imprinted,¹⁹ and several theories have been proposed to explain why so many genes should be imprinted.²⁰ The ovarian time bomb hypothesis states that imprinting occurs to prevent parthenogenesis from unfertilized oocytes, which can lead to malignant trophoblastic disease.²¹ Epigenetic abnormalities in imprinted regions have been implicated in a number of developmental disorders and carcinogenesis in mice and humans.^{22,23}

The maternally methylated CpG island of the murine and human *Zac1* locus was identified in a screen for imprinted genes.^{24,25} Genetic and epigenetic defects in the *Zac1* locus are also associated with Beckwith–Wiedemann syndrome.²⁶ Although Beckwith–Wiedemann syndrome is generally characterized by exomphalos, macroglossia, and gigantism, cardiac manifestations are also known to occur, including congenital heart disease (ventricular septum defect, atrial septum defect, aortic stenosis) and cardiomyopathy.^{27–31} Beckwith–Wiedemann syndrome is associated with a region of chromosome 11 in which many candidate disease genes are present including IGF-1 and *p57^{Kip2}*. Although the molecular mechanisms underlying cardiac abnormalities seen in Beckwith–Wiedemann syndrome remain unknown, we have shown here a possible mechanistic link between *Zac1* and heart disease seen in the syndrome.

Regulation of Cardiac Gene Expression by *Zac1*

Our data show that *Zac1* acts as a transcriptional activator for cardiac genes based on the following observations: (1) in development, *Zac1* was highly expressed in the heart and enriched in chamber–myocardium; (2) *Zac1* bound directly to the *ANF* promoter and strongly activated the *ANF*, *BNP*, and α -*MHC* promoters; (3) *Zac1* physically interacted with Nkx2-5 to synergistically activate cardiac gene expression; (4) *Zac1* functioned as a downstream target of Nkx2-5 both in

vitro and in vivo; (5) *Zac1* mutant mice showed cardiac gene expression abnormalities; and (6) *Zac1* mutant mice exhibited cardiac malformations.

A number of cardiac transcriptional factors collaborate in a complex manner to guide development and homeostasis in the heart. Nkx2-5, GATA4, Tbx5, MEF2C, and SRF are essential and potent cardiac transcriptional factors, regulating the expression of one another and serving to stabilize and reinforce the cardiac gene regulatory network. *Zac1* expression was first observed at early stages of heart development, coincident with just after cardiac specification and expression of early transcription factors such as Nkx2-5. Our data also indicate that Nkx2-5 directly activates *Zac1* expression in the heart. We speculate that *Zac1* and Nkx2-5 orchestrate and support the expression of other transcription factors and cofactors. In particular, cardiac transcription factors and *Zac1* function together to stabilize the transcriptional machinery, in part by binding to adjacent sites within the promoter/enhancer regions of cardiac genes and also through direct protein–protein interaction. This robust transcriptional activation network promotes development and maturation of the heart. Our work establishes *Zac1* as a new player in this network. *Zac1* may provide a valuable entry point for genetic analysis heart growth and control of apoptosis and how these processes are controlled by the core, conserved transcription factor network.

Sources of Funding

This study was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan; the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the National Institute of Biomedical Innovation; and the National Health and Medical Research Council, Australia (354400).

Disclosures

None.

References

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–676.
2. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 1997;276:1404–1407.
3. Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol*. 1993;13:2235–2246.
4. Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt–Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*. 1997;15:21–29.
5. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons J, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 1993;119:419–431.
6. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006;313:1922–1927.
7. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23:607–611.
8. Spengler D, Villalba M, Hoffmann A, Pantaloni C, Houssami S, Bockaert J, Journot L. Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by *Zac1*, a