

心臓学におけるエピジェネティック因子の今後の展望

心臓の形成には多くのgenetic, epigeneticな因子がかかわることが次

第に明らかとなり、心筋のdefined factorsの発見という大きなブレイクスルーを生み出した。defined factorの一つがクロマチンリモデリング因子*Baf60c*であったことも、心臓発生に

おけるエピジェネティック因子の重要性を物語っている。エピジェネティクスに着眼した生体内の機能解析はまだ始まったばかりであり、今後は各細胞系譜や発生段階などで詳細な解析を進

文献

- van Weerd H, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK. Epigenetic Factors and Cardiac Development. *Cardiovasc Res* 2011 May 23. [Epub ahead of print]
- Bruneau BG: Chromatin remodeling in heart development. *Curr Opin Genet Dev* 20: 505-511, 2010.
- Guidi CJ, Sands AT, Zambrowicz BP, et al: Disruption of *Ini1* leads to peri-implantation lethality and tumorigenesis in mice. *Mol Cell Biol* 21: 3598-3603, 2001.
- Kim JK, Huh SO, Choi H, et al: *Srg3*, a mouse homolog of yeast *SWI3*, is essential for early embryogenesis and involved in brain development. *Mol Cell Biol* 21: 7787-7795, 2001.
- Klochender-Yeivin A, Fiette L, Barra J, et al: The murine *SNF5/INI1* chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep* 1: 500-506, 2000.
- Bultman S, Gebuhr T, Yee D, et al: A *Brg1* null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian *SWI/SNF* complexes. *Mol Cell* 6: 1287-1295, 2000.
- Stopka T, Skoutchi AI: The *ISWI* ATPase *Snf2h* is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14097-14102, 2003.
- Link BA, Fadool JM, Malicki J, Dowling JE: The zebrafish young mutation acts non-cell-autonomously to uncouple differentiation from specification for all retinal cells. *Development* 127: 2177-2188, 2000.
- Reyes JC, Barra J, Muchardt C, et al: Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian *brahma* (*SNF2alpha*). *EMBO J* 17: 6979-6991, 1998.
- Indra AK, Dupé V, Bornert JM, et al: Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in embryonic surface ectoderm and fetal epidermal keratinocytes unveils two distinct developmental functions of *BRG1* in limb morphogenesis and skin barrier formation. *Development* 132: 4533-4544, 2005.
- Chi TH, Wan M, Zhao K, et al: Reciprocal regulation of *CD4/CD8* expression by *SWI/SNF*-like *BAF* complexes. *Nature* 418: 195-199, 2002.
- Chi TH, Wan M, Lee PP, et al: Sequential roles of *Brg*, the ATPase subunit of *BAF* chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity* 19: 169-182, 2003.
- Lessard J, Wu JI, Ranish JA, et al: An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55: 201-215, 2007.
- Engelen E, Akinci U, Bryne JC, et al: *Sox2* cooperates with *Chd7* to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat Genet* 43: 607-611, 2011.
- Martens JA, Winston F: Recent advances in understanding chromatin remodeling by *Swi/Snf* complexes. *Curr Opin Genet Dev* 13: 136-142, 2003.
- Wang W, Xue Y, Zhou S, et al: Diversity and specialization of mammalian *SWI/SNF* complexes. *Genes Dev* 10: 2117-2130, 1996.
- Delgado-Olguín P, Takeuchi JK, Bruneau BG: Chromatin modification and remodeling in heart development. *ScientificWorldJournal* 6: 1851-1861, 2006.
- Kadam S, Emerson BM: Transcriptional specificity of human *SWI/SNF BRG1* and *BRM* chromatin remodeling complexes. *Mol Cell* 11: 377-389, 2003.
- Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, et al: *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator *SNF2/SWI2*. *Cell* 68: 561-572, 1992.
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, et al: Maternal *BRG1* regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* 20: 1744-1754, 2006.
- Yan Z, Wang Z, Sharova L, et al: *BAF250B*-associated *SWI/SNF* chromatin-remodeling complex is required to maintain undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 1155-1165, 2008.
- Takeuchi JK, Bruneau BG: Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-711, 2009.
- Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, et al: Chromatin remodeling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun* 2: 187, 2011.
- Hang CT, Yang J, Han P, et al: Chromatin regulation by *Brg1* underlies heart muscle development and disease. *Nature* 466: 62-67, 2010.
- Côté J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL: Stimulation of *GAL4* derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast *SWI/SNF* complex. *Science* 265: 53-60, 1994.
- Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, et al: *Baf60c* is essential for function of *BAF* chromatin remodeling complexes in heart development. *Nature* 432: 107-112, 2004.
- Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, et al: *Baf60c* is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 846-851, 2007.
- 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: 709-721, 2001.
- Mori AD, Zhu Y, Vahora I, et al: *Tbx5*-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev Biol* 297: 566-586, 2006.
- Wang Z, Zhai W, Richardson JA, et al: Polybromo protein *BAF180* functions in mammalian cardiac chamber maturation. *Genes Dev* 18: 3106-3116, 2004.
- Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, et al: *RXR* alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 8: 1007-1018, 1994.
- Ho L, Crabtree GR: Chromatin remodeling during development. *Nature* 463: 474-484, 2010.
- Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, et al: The dermatomyositis-specific autoantigen *Mi2* is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 95: 279-289, 1998.
- Kaji K, Nichols J, Hendrich B: *Mbd3*, a component of the *NuRD* co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Development* 134: 1123-1132, 2007.
- Kaji K, Caballero IM, MacLeod R, et al: The

めるとともに、心疾患とのかかわりについても明らかにしていく必要がある。再生能が制限された哺乳類の心臓において、エピジェネティック因子により心筋へとリプログラムする手法は、心

疾患の新たな治療法としての可能性を秘めている。エピジェネティック因子による心臓転写因子の制御メカニズムを解明する試みは、心臓発生の理解を深めるとともに将来の心疾患治療や予

防において新たな知見をもたらすに違いない。

- NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 8: 285-292, 2006.
- 36) Nimura K, Ura K, Shiratori H, et al: A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 460: 287-291, 2009.
- 37) Lu J, Jeong HW, Jeong H, et al: Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex. *PLoS One* 4: e5577, 2009.
- 38) 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: 175-183, 2006.
- 39) Backs J, Olson EN: Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res* 98: 15-24, 2006.
- 40) Haberland M, Montgomery RL, Olson EN: The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10: 32-42, 2009.
- 41) Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, et al: Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat Genet* 31: 25-32, 2002.
- 42) Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, et al: The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 123: 347-358, 2005.
- 43) Wang D, Chang PS, Wang Z, et al: Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105: 851-862, 2001.
- 44) Davis FJ, Gupta M, Camoretti-Mercado B, et al: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *J Biol Chem* 278: 20047-20058, 2003.
- 45) Barron MR, Belaguli NS, Zhang SX, et al: Serum response factor, an enriched cardiac mesoderm obligatory factor, is a downstream gene target for Tbx genes. *J Biol Chem* 280: 11816-11828, 2005.
- 46) Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, et al: Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest* 112: 863-871, 2003.
- 47) Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, et al: Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell* 19: 450-459, 2010.
- 48) Murakami M, Nakagawa M, Olson EN, Nakagawa O: A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18034-18039, 2005.
- 49) Heallen T, Zhang M, Wang J, et al: Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 332: 458-461, 2011.
- 50) Bergemann AD, Cole F, Hirschhorn K: The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Trends Genet* 21: 188-195, 2005.
- 51) Nguyen AT, Xiao B, Nepl RL, et al: DOT1L regulates dystrophin expression and is critical for cardiac function. *Genes Dev* 25: 263-274, 2011.
- 52) Tan X, Rotlant J, Li H, et al: SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2713-2718, 2006.
- 53) Monzen K, Ito Y, Naito AT, et al: A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol* 10: 567-574, 2008.
- 54) Shirai M, Osugi T, Koga H, et al: The Polycomb group gene *Rae28* sustains *Nkx2.5/Csx* expression and is essential for cardiac morphogenesis. *J Clin Invest* 110: 177-184, 2002.
- 55) Caretti G, Di Padova M, Micales B, et al: The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* 18: 2627-2638, 2004.
- 56) Latinkic BV, Cooper B, Smith S, et al: Transcriptional regulation of the cardiac-specific *MLC2* gene during *Xenopus* embryonic development. *Development* 131: 669-679, 2004.
- 57) Bhalla SS, Robitaille L, Nemer M: Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem* 276: 11439-11445, 2001.
- 58) Chen CY, Schwartz RJ: Competition between negative acting YY1 versus positive acting serum response factor and tinman homologue Nkx-2.5 regulates cardiac alpha-actin promoter activity. *Mol Endocrinol* 11: 812-822, 1997.
- 59) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000, 1987.
- 60) Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, et al: MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242: 405-411, 1988.
- 61) Small EM, Warkman AS, Wang DZ, et al: Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development* 132: 987-997, 2005.
- 62) Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN: Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7129-7134, 2003.
- 63) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142: 375-386, 2010.
- 64) Basson M: Singling out heart cells. *Nat Med* 13: 33, 2007.
- 65) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, et al: Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 68: 691-702, 2004.
- 66) Gonzales C, Pedrazzini T: Progenitor cell therapy for heart disease. *Exp Cell Res* 315: 3077-3085, 2009.
- 67) Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, et al: Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 21: 1345-1357, 2007.
- 68) Blin G, Nury D, Stefanovic S, et al: A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest* 120: 1125-1139, 2010.

1. 心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子

東京大学分子細胞生物学研究所エピゲノム疾患研究センター心循環器再生研究分野
東京大学理学部生物学科動物科学大講座
戦略的創造推進事業さきがけ [iPS細胞と生命機能] 兼任

竹内 純

東京女子医科大学循環器小児科
東京女子医科大学総合研究所心血管発生分化制御研究部門

宮川 - 富田幸子

東京大学分子細胞生物学研究所エピゲノム疾患研究センター心循環器再生研究部門
東京工業大学生命理工学部

笹岡陽介

東京大学分子細胞生物学研究所エピゲノム疾患研究センター心循環器再生研究部門
東京大学理学部生物学科動物科学大講座

小柴和子

key words master factor, cardiac transcription factor, Baf60c, chromatin remodeling factor

動 向

心臓は生物が発生していく過程で、最も早期に機能し始める器官であり、胎生期、生後の生命活動に不可欠な器官である。加えて、先天性心疾患患者は全出生児の約1.9%（可能性は7.5%：日本では1.2%）^{1,2)}、心不全による死亡者数は全体死者数の15.9%（厚労省21年度報告）であることから心疾患発症メカニズムを解析するだけでなく、心臓誘導過程や心機能維持機構を新たな視点で明らかにすることも必要である。このような視点で展開する研究は将来的に心機能回復に向けた臨床研究への橋渡しとなると考えられる。

心臓誘導に関しては古くから様々な生物種を用いて研究されてきた。しかし、近年になって心臓には形・機能の異なった様々な細胞が存在することが明らかになり、これに関連して、各々の細胞分化過程や系譜の詳細なメカニズムが明らかになってきた^{3,4)}。さらに、細胞分化・誘導そして分化転換を引き起こす特定因子についても徐々に明らかになりつつある^{5,6)}。その中でもクロマチン構造を変換させる能力を持つクロマチン再構成

因子群に属するSWI/SNF-Baf複合体が心筋分化・維持に不可欠であることが報告され、心臓発生におけるエピジェネティックな発生制御機構が現在注目されている^{7,8)}。

本稿では生体内で心筋分化に関わる分子メカニズムの最新の知見をレビューしながら、今後の心臓発生・再生研究の発展に関わると予想される重要因子について概説する。

A. 心臓を構成する細胞集団起源とその分化系譜

マウスにおいて、心臓中胚葉は原始線条 (primitive streak) と呼ばれる中胚葉性細胞の起源となる領域の中でも胚頭側領域から派生してくる。この派生領域は生物種を超えて保存されていることがTamやKirbyによって報告されている⁹⁻¹¹⁾ (図1)。哺乳類胎仔やニワトリ胚における実験発生学的研究により、心臓は主に4つの異なった領域から派生した細胞群が移動し、運命決定されながら分化し、連携を取ることで初めて機能すること

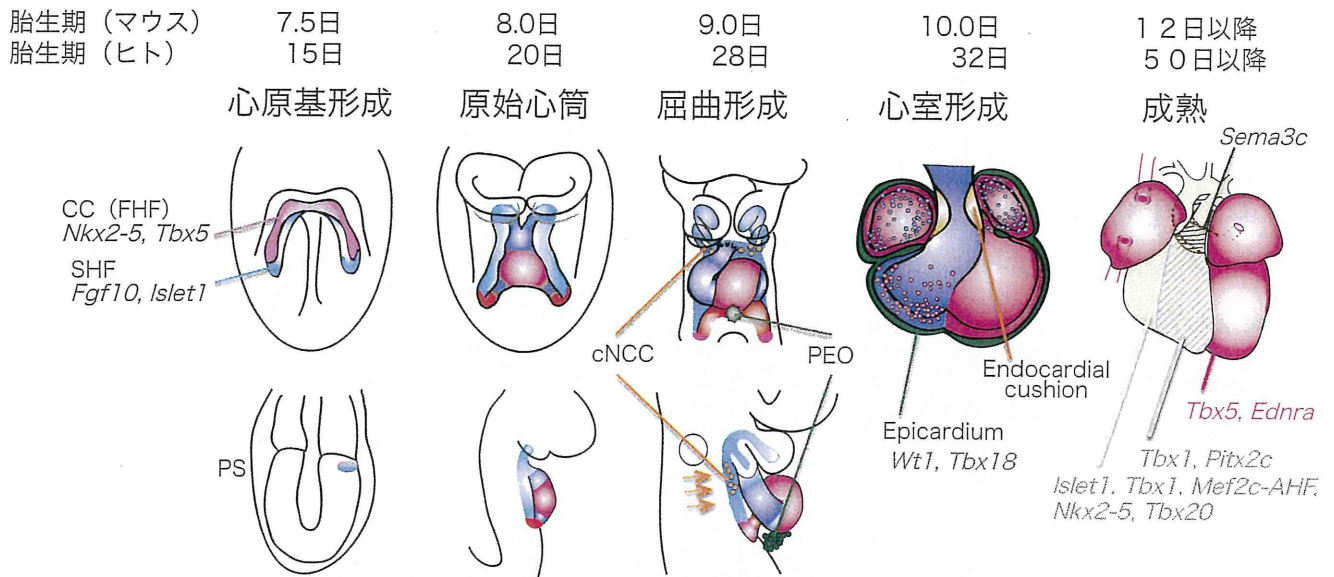


図1 マウスとヒトの発生過程における心臓形成と心臓形成に関わる細胞領域

が示された (図1). これらの細胞群は心臓前駆細胞として存在し発生過程を経るにつれて心臓を構成する様々な細胞に分化することが確認されているが, 心臓を構成する全ての細胞に分化する訳ではない^{12,13}. つまり, 発生段階で特異な遺伝子発現制御を受けながら将来分化する細胞の方向決定がなされていくのである.

1. 心臓を構成する第一心臓予定領域と派生意義

現在報告されている限りにおいて, 心臓を構成する細胞群は主に4つの領域の細胞が移動し, 幾つもの異なった機能を持つ細胞に分化する (図1). 細胞は相互に作用し, 非常に複雑なネットワークを形成することにより生命機能器官としての心臓を作り上げる. その中でも実際に心臓を構成する領域として一番古くから研究されてきた領域は心臓形成領域とも呼ばれ, 頭側側板中胚葉由来の細胞集団から発生し, これらの細胞群が存在する領域を第一心臓予定領域 (FHF: First Heart Field) と称する (図1)^{14,15}.

第一心臓予定領域はマウス胎生期7.5日 (ヒトでは約15日目) において三日月状の馬蹄型を示

す心原基 (CC: cardiac crescent) を形成する. その後, 左右両側の細胞が腹側正中線上において融合し一本の管状形態である原始心筒 (linear heart tube) を形成し, 主に左室を形成する (図1の赤で塗られた領域). まるで, ジッパーを閉じるかのように正確に融合する機構は魚類からヒトに至るまで高度に保存されている. 次いで, 原始心筒は右側に屈曲し, 左右心室と心房形態が明瞭になってくる (looping stage). マウスにおいては胎生期10日目 (ヒトでは約1カ月) に心房・心室間に中隔と弁形成が始まり, 2心房2心室形態が形作られる (chamber formation). この時期にはFHF以外からの細胞集団 (咽頭弓中胚葉・心臓神経堤細胞・心外膜組織前駆細胞; 下記詳細記載) が心臓形成に関わり, その後マウスでは出生までの約10日間 (ヒトでは胎生期50日目以降) で心臓の成熟と血管再構成 (maturation & remodeling) が行なわれる^{16,17}. 咽頭弓中胚葉細胞 (A-2項参照) はIslet1陽性の胚性心臓前駆細胞が存在する領域でもあり, 主に心臓流出路を中心とする動脈幹自身の形成に関わる. 心臓神経堤細胞 (A-3項参照) は大動脈弓, 動脈幹, 肺動脈形成に関与し, 心臓神経堤細胞に異常が生じる

と動脈幹中隔を欠損する。心外膜前駆組織由来細胞群 (A-4項参照) は、心外膜形成だけでなく、間葉系細胞、血管平滑筋、さらには心筋に分化する。これらの領域の細胞群は全て心臓形成領域 (第一心臓予定領域) 内の最終目的地まで移動しながら分化・連携するところが魅力的である。このように心臓はドラマティックに形態を複雑化する機能器官である¹⁸⁾。

2. 胚性心臓前駆細胞存在領域としての第二心臓予定領域

心臓形成に関わる細胞群を派生する二つ目の領域は、FHFに隣接したより背側領域の頭側臓側中胚葉からつくられ、この領域を第二心臓予定領域 (SHF: Second Heart Field) と呼ぶ¹⁹⁻²²⁾ (図1内の青で塗られた領域)。この領域自体が心臓を形作るのでなく、この領域に存在する前駆細胞群が心臓形成領域に移動する過程で心臓細胞へと運命が特定され分化していくことは非常に興味深い。また、成長の過程でこの領域は消失する。つまり、心臓運命が決定された前駆細胞群が心臓形成領域 (FHF) 以外に存在するという点で発生生物学においても非常にインパクトがある。この領域にはDiGeorge症候群の責任遺伝子である*Tbx1*や*Fgf8*等が発現することも明らかとなり、心臓形成領域以外で大血管異常をもたらす領域が

存在することを知らしめた、今後の心臓研究のホットスポットでもある。さらに、興味深いことにSHF由来の細胞群は左室領域以外の細胞、つまり右室、流出路、及び心房の一部を構成する (図1)^{3,9,10)}。この結果は、同じ心室筋でもSHF由来であるかFHF由来であるかで実際には機能が異なる可能性が考えられ、心機能再生を目指した移植医療における新しい課題となるかもしれない。その一例として基礎心疾患を持たずに突発性心室細動をひきおこすBrugada症候群が挙げられる。この疾患は右脚ブロック波形と特徴的なST上昇を特徴とし、責任遺伝子の1つとしてSCN5A (Na⁺チャネル) の変異が挙げられているが、この症候群の80%以上の症例において責任遺伝子が見つかっていない。この疾患は、特に右室内の限局された心筋に異常が起こることが報告されており、そのため心電図において右側胸部誘導に限局したST上昇が見られることが報告されている^{23,24)}。また、右室優位に起こる疾患として不整脈源性右室心筋症もあり、これらの理解において心筋の派生由来と機能相違との関連性の解明も求められる。

3. 心臓神経堤細胞

神経堤細胞とは、胎生初期の神経管背側から派生してくる外胚葉由来の多分化能を持つ細胞集団

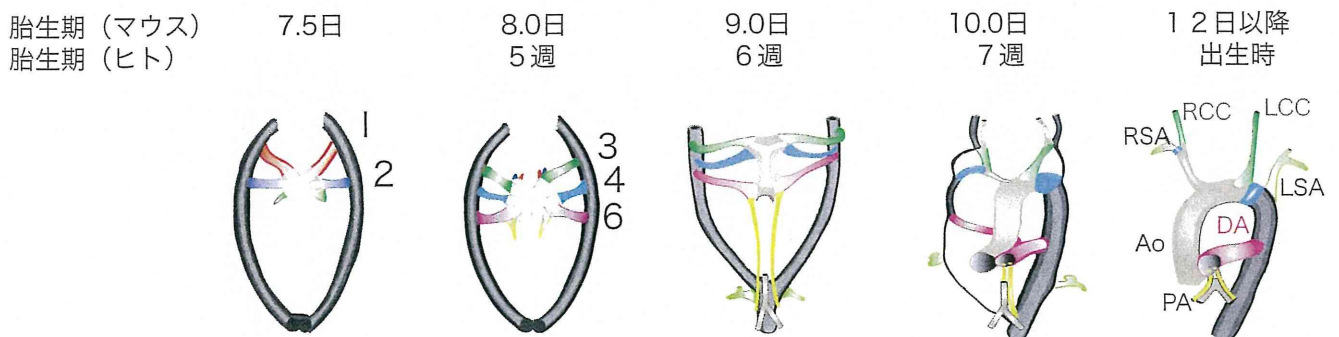


図2 心大血管の発生

RCC: 右総頸動脈, LCC: 左総頸動脈, RSA: 右鎖骨下動脈, LSA: 左鎖骨下動脈, Ao: 大動脈囊, DA: 上行大動脈, PA: 肺動脈

である。この細胞集団は間葉系細胞として身体前後軸に沿って様々な細胞（交感・副交感神経細胞，感覚神経細胞，グリア細胞，色素細胞，平滑筋，軟骨，結合組織，線維芽細胞）に分化する。神経堤細胞の中には，神経管背側から移動して円錐動脈幹領域（outflow tract）から心臓形成領域に入り込む細胞群が存在する。最終的に大動脈弓と大動脈，肺動脈，半月弁等の形成に関わることから，これらの細胞群の派生する領域を心臓神経堤（cNCC: Cardiac Neural Crest）と称する（図1の橙で塗られた領域）²⁵⁾。心大血管系は非常に複雑な器官で（図2），心臓神経異常と推察とされる心臓流出路異常を伴ったヒト先天性心疾患は全先天性心疾患患者の約30%と非常に高頻度で発症する。その原因究明のために多くの責任遺伝子の単離がなされている。

4. 第四の心臓前駆細胞存在領域としての心外膜前駆組織由来細胞

図1の緑領域で示す様に，原始心筒後方に接する臓側中胚葉由来の一部の細胞集団の中で，静脈洞側から心臓全体を覆う心外膜形成に重要と考えられている細胞集団領域を，心外膜前駆組織（proepicardial organ; PEO）由来細胞と称する。心外膜形成のみならず，細胞の一部は形質転換して間葉系細胞となり心筋層に侵入し冠動脈を形成する²⁶⁾。2008年，EvansとPuらによって，PEO由来細胞の一部が心筋にも分化することが示され，心外膜前駆細胞が新しい心臓前駆細胞として注目された^{27,28)}。SHFと同様に心臓形成領域（FHF）以外の細胞群が心筋に分化することは驚きであった。これらの一連の研究結果は，胚性心臓前駆細胞の臨床応用研究への橋渡しとなる貴重な知見である。しかしながら，再生医学に用いるには胚性前駆細胞の詳細な特徴を明らかにしていく必要があると考えている。

B. 心臓領域特異的な遺伝子マーカーと細胞系譜解析

1. 心臓前駆細胞としての中胚葉マーカー

心臓を構成する細胞がどのような領域のどのような細胞から派生するのかを調べることは，発生生物学的にも先天性疾患研究においても重要な知見を与えてくれる。このような研究は細胞系譜解析と呼ばれ，両生類胚やニワトリ胚に生体色素（DiI）を注入することにより特定の細胞のみ色素ラベルし，ラベルされた細胞の系譜を追跡するというものである¹⁰⁾。マウスではcreリコンビナーゼをくみこんだトランスジェニック（TG）マウスを用いた発生工学的研究手法が樹立されたおかげで，特定遺伝子を発現していた細胞の系譜を追跡することが可能となった。これにより，遺伝学を用いた細胞系譜追跡，分化経路，特定細胞の選別や単離，再培養分化などの再生医学に向けたトランスレーショナルリサーチ研究の発展につながった。

心臓領域における心臓前駆細胞の最も初期のマーカーは*Mesp1*である。*Mesp1-cre*マウスと，*Rosa*遺伝子座に*lacZ*遺伝子をノックインした*R26R-LacZ*マウスとを交配し*Mesp1*陽性細胞の系譜を追跡したところ，心臓を形成する細胞群が標識されることが分かった^{29,30)}。*T-box*遺伝子群の*T*（*Brachyury*）も初期心臓中胚葉で発現する重要因子である³¹⁾。図3で示す様に，初期中胚葉因子*Mesp1*と*T*陽性細胞から心臓中胚葉が派生する。血管系のマーカーである*Flk1*も初期心臓中胚葉分化に重要であり，*Flk1+T*（*Brachyury*）*+Islet1*陽性細胞が初期心臓中胚葉の系譜を持つ遺伝子マーカーとなる³²⁻³⁴⁾。しかしながら，心臓構成細胞全てが*Islet1*陽性となって分化する訳ではなく，かつ，*Mesp1/T/Flk*系譜が心臓誘導を引き起こすためにはさらなる誘導因子の存在が必要である。この下流か，並列的

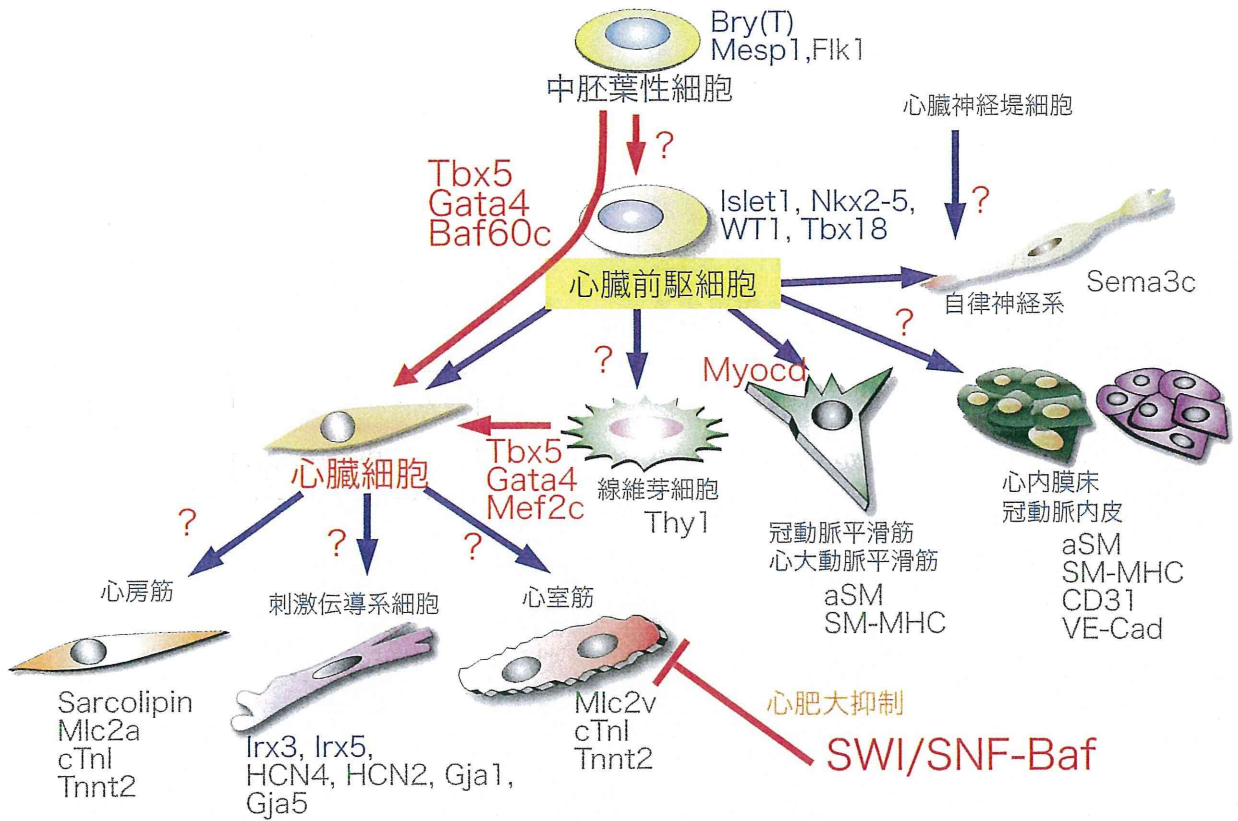


図3 心臓構成細胞の重要因子と維持因子

に心臓中胚葉を誘導するようなシグナルが存在するはずである。

2. 心臓領域のマーカとなる転写調節因子

a. *Islet1-cre*を用いた系譜解析

*Islet1*はSHFの主要マーカーであると考えられてきたが、最近の論文で*Nkx2-5*欠損マウスではFHFにも*Islet1*が発現することが分かってきた^{16,35}。さらに*Islet1-cre*または*Islet1-merCremer*マウスと*R26R*マウスを交配し細胞系譜を追跡すると、冠動脈やペースメーカー細胞にも分化していることが明らかとなった³⁶。*Islet1-cre*, *Tbx1-cre*, *Mef2c-AHF-cre*等のSHFマーカー遺伝子を用いた系譜解析により、これらの遺伝子でマークされるSHF由来の細胞群は右室領域のほぼ全ての細胞を構成するが、左室においては一部領域の細胞群のみ分化制御していることが分かった^{37,38}。興味深いことにカエル胚において

は*Islet1*の発現は*Nkx2-5*とほぼ全域でオーバーラップしており、*Islet1*遺伝子をノックダウンさせても初期心臓形成には全く影響が無かった³⁹。ゼブラフィッシュにおいては*Islet1*依存性と*Fgf8*依存性の二つの異なった経路からの心筋誘導があると報告されている⁴⁰。

b. *T-box (Tbx)*-*cre*を用いた系譜追跡

現在24種の*Tbx*遺伝子が報告されているが、その中で8種類の*Tbx*遺伝子が心臓で発現している。*TBX*遺伝子変異はヒトにおいて特徴的な先天性心疾患を引き起こす(*TBX1*はDiGeorge症候群, *TBX3*はulnar-mammary症候群, *TBX4*はPatella症候群, *TBX5*はHolt-Oram症候群の原因遺伝子である(詳細は他稿または竹内純 細胞工芸学2007または山岸&白石 臨床心臓発生学2007を参照)。実際*Tbx1-cre*マウスまたは*Tbx1-merCremer*を用いて細胞系譜を調べたところ、ヒト疾患で異常の見られる領域の形成に関与して

いることが報告されている^{33,41)}。Christoffelsらは*Tbx3*がCx40やHCN4の発現を抑制すると報告しているが、*Tbx3*発現細胞の系譜についての記載は無い⁴²⁾。*Tbx5*遺伝子破壊マウスはHolt-Oram症候群のモデルマウスとして作製され、心房心室中隔欠損・第1指過伸長を伴う⁴³⁾。また、zinc-finger型転写因子*Sall4*と協調的に作用することによって心室中隔形成に深く関わり、心室中隔形成における機能は種を超えて高度に保存されている^{44,45)}。このようなことから*Tbx5-cre*を作製し細胞系譜解析を行なったところ、マウス胎生7.0日以前の細胞集団が心臓と上肢領域形成に関わっていることを見いだした (Benoit & Koshiba-Takeuchi 論文準備中)。*Tbx18*は*Tbx18-cre*を用いた研究によって、*Wt1* (後述) と共にPEO由来細胞に発現し、心外膜を形成するとともに心外膜から心室心筋層に移動し心筋形成にも深く関与することが示された²¹⁾。*Tbx20*には4つのアイソフォームが存在し、その中で抑制因子と機能している*Tbx20c*が*Tbx5*と相補的にSHFにおいて発現し、右室と流出路形成に関わっている^{46,47)}。

T-box 遺伝子と心臓形成に関する発生生物学的な解析研究についてはHarveyまたはChristoffelsらの総説を参照されたい^{48,49)}。

c. *Nkx2-5-cre*における研究

*Nkx2-5*はショウジョウバエ*timman*遺伝子の脊椎動物ホモログであり、ショウジョウバエにおいて*timman*変異体は心筋分化が完全に抑制されることから、*Nkx2-5/timman*は心臓形成に重要な因子の一つであると考えられる。*Nkx2-5*単一遺伝子破壊マウスでは、重度の心奇形が生じ、多くの心筋マーカー因子の発現が消失する。*NKX2-5*は先天性心疾患の原因遺伝子でもあり、心房心室中隔欠損 (ASD/VSD)、Fallot四徴症、心臓刺激伝導系異常など様々な表現型の異常が報告されている。心房性ナトリウム利尿ホルモン

Nppa, 心筋収縮因子*Gja5* (Cx40), *Myhc* (a型心ミオシン重鎖) 等の遺伝子のプロモーター上には*Nkx2-5*, *Tbx5*, *Gata4*の結合配列が存在し、三者の協調的な作用で転写が活性化される^{39,50,51)}。SHFマーカーである*Mef2c*遺伝子プロモーター上には*Islet1*, *Gata4*, *Nkx2-5*, *Foxh1*の結合配列が存在し、協調的な制御を受けている^{52,53)}。*Nkx2-5*のプロモーター上にも*Gata*と*Tbx*の結合配列が存在し、その近傍には*Islet1*の結合配列も存在し、直接発現制御を受けている^{42,54)}。*Nkx2-5*心筋特異的遺伝子破壊マウス (KO:ノックアウト) マウスは、ヒト疾患に酷似した表現型を示し、そのようなことから*Nkx2-5*は発生初期から出生後にわたり様々な領域において機能していることが分かる⁵⁵⁾。

*Nkx2-5-cre*は2タイプ作製されており、心室特異的遺伝子破壊マウスの作製や初期心臓領域特異的遺伝子破壊マウス作製の為に利用されている^{56,57)}。*Nkx2-5-cre*や*Nkx2-5-EGFP*を用いての*Nkx2-5*陽性細胞の系譜解析については、WuやPuによって報告されている^{28,58)}。

d. *Gata* 遺伝子の細胞系譜

Gata 遺伝子はzincフィンガー型の転写因子をコードしており、心臓では*Gata4*, 5, 6が発現している。これら遺伝子に変異のある先天性心疾患患者では、ASD, VSD, AVクッション変異が見られる^{47,59)}。*Gata4*KOマウスでは内胚葉異常が主たる原因である心臓二分離 (cardia bifida) が認められ*Gata5*KOマウスでは表現型は認められない。*Gata6*は胚外組織分化においても重要な因子であるため、そのKOマウスは早期胚で致死となり心臓系譜を追跡することは難しいが、これらのことから*Gata* 遺伝子間で機能的代理 (代償) があると結論される⁶⁰⁻⁶³⁾。マウス発生工学を用いた4倍体実験 (tetraploid aggregated KOs) を用いて*Gata4/Gata6*の2重遺伝子破壊 (ダブルKO) マウスを作製したところ、心臓前駆領域は

形成されるものの心筋分化が完全に抑制された⁶⁴⁾。これらのことから、Gata因子は心臓発生、心筋分化において必須な遺伝子であると考えられ、他の臓器においてもGataファミリーは肝臓発生やアストロサイト、膵臓分化機構も制御することが報告されている⁶⁵⁻⁶⁷⁾。

Gata4やNkx2-5などの転写調節因子群は初期心臓原基において発現しており、*T-box*遺伝子の*Tbx20*や、MAD-boxを持った*Mef2c*、*Hand1/2*なども心臓形成における重要因子である。しかしながら、ノックイン*cre*を用いた解析により、これらの因子はFHFにもSHFにも発現が見られ、FHFマーカー因子と特定することは難しい。A型エンドセリンレセプターである*Ednra*のKOマウスではANF、*Hand1*、*Cited1*、*Mlc2a*の発現は維持されていたものの、*Tbx5*と*cx40*の発現が減少した。発現領域が*Tbx5*と酷似しており、新たなFHFマーカー遺伝子になり得ると期待される⁶⁸⁾。

3. 心臓神経堤マーカーと流出路遺伝子マーカー

心臓神経堤細胞の移動（遊走）には前後軸シグナルによる分節化も重要である。一般にはSHF由来細胞は咽頭弓中胚葉から心臓流出路の心筋層と心内膜層に多く存在し、心臓神経堤由来の細胞群は円錐動脈幹隆起に存在する。心臓神経堤細胞の系譜は*Wnt1-cre*を用いて解析されており、将来的には大動脈弓形成にも関わる。また、SHF由来の細胞を標識する遺伝子として*Islet1*、*Mef2c*、*Tbx1*、*Foxh1*、*Foxc1/c2*が挙げられ、*Islet1-cre*（前章記載）、*Mef2c-cre*、*Tbx1-cre*を用いた細胞系譜研究により詳細な研究がなされている。心臓神経堤細胞の詳細は参考図書（Hutson & Kirby 2007または山岸 & 白石 2007）を参考にしてもらいたい。

4. PEOマーカーと形質転換

PEOは心発生において一過的に形成される構造物であり、原始心筒の後域側から派生し、主に冠動脈を形成する。冠動脈は一般にFHF由来ではなくseptum transversum由来と定義されてきたが、PuやChienらの研究により*islet1*でマークされるSHF由来の細胞群も心外膜や冠動脈を形成することが報告された⁶⁹⁻⁷²⁾。一連の研究で、*islet1*でマークされる冠動脈の形成にはNkx2-5のサポートが重要である⁷³⁾。PEOは形質転換して冠動脈形成に寄与するが、このときSnailとEカドヘリンからのシグナルが必要で、*Wt1*KOマウスでは冠動脈に異常が生じる。冠動脈形成には、PEOと神経堤細胞が関与すると考えられているため、神経堤細胞も*Wt1*の影響を受けていることが予測される。*Wt1*を破壊するとPEOも神経堤細胞も分化抑制状態になっていることに起因するのかもしれない。*Wt1-cre*マウスと*R26R*マウスを用いて*Wt1*由来細胞系譜追跡を行なったところ、心外膜の他に、細胞の一部は形質転換し心内血管・線維芽細胞・心筋などに分化していることが明らかとなった^{74,75)}。冠動脈形成にはBMPやVEGF、bFGFなどシグナル因子の作用も重要である⁷⁶⁻⁷⁸⁾。

C. 心臓誘導因子と運命決定因子

1. 誘導因子としての分泌性シグナル

ESやiPS細胞をそのまま心臓に移植すると、心臓においてテラトーマを形成する⁷⁹⁾。そのため、これらの幹細胞を効率良く正確に心臓細胞に分化させる技術の確立は再生医学において重要なテーマであり、これまで分泌因子による制御が試されてきた。

ニワトリ胚にFGFまたはBMPをしみ込ませたビーズを移植する実験から、FGF、BMPシグナルが心臓誘導に必須であることが示された。P19

細胞やES細胞を用いた細胞培養系では、BMP投与により心臓初期転写因子であるNkx2-5が誘導されるとともに心筋誘導が引き起こされることが報告されている^{80,81)}。FukudaらはBMPシグナルのアンタゴニストに着目し、Nogginで前処理した胚葉体をBMPで刺激したところ、96%という非常に高効率で心筋分化が引き起こされることを報告している⁸²⁾。他のBMP阻害物質であるGlemlin処理を行なっても同様の結果が得られており、分化以前にBMP影響下にある細胞は、心筋分化を引き起こせない状態になっていると考えられる⁸³⁾。また、P19細胞はレチノイン酸やTGF β 1の投与によって心筋分化誘導が引き起こされる^{84,85)}。

しかしながら、これらの分泌因子は微妙な濃度変化によって神経など他の組織細胞にも分化する可能性があることから、今後臨床応用を目指すためには繊細な技術革新が必要である⁸⁶⁾。

Mesp1由来の細胞は骨格筋や平滑筋など中胚葉性細胞系譜の上流に位置することから、Mesp1系譜から心臓運命が特定されるメカニズムを解明する試みが幾つかの研究グループによってなされてきた。その中で、Mesp1由来細胞は、WntインヒビターであるDkk1存在下で心臓へと効率良く分化することが明らかとなった⁸⁷⁻⁸⁹⁾。同様に、ヒトES細胞を用いた研究においてもKDR (Flk1) low/cKit-/DKK+の細胞集団は心筋へと分化することが報告されている⁹⁰⁾。KomuroらのグループはカノニカルWntシグナルのインヒビターであるIGFBP4を投与することにより、P19CL6細胞における心筋分化誘導が通常より10倍高く引き起こされることを報告している⁹¹⁾。カエル胚においてIGFBP4の機能をsiRNAやmorpholinoを用いて阻害すると心臓主要遺伝子であるNkx2-5, Gata4, α 型ミオシン重鎖遺伝子の発現が消失するが、IGFBP4を強制発現させても異所的な心筋誘導は引き起こせなかった。このこと

から、IGFBP4は心筋分化の促進、成熟に重要な因子であると考えられる。この一連の結果から、マウス胎生7.0日胚以前に発現が完全に消失するMesp1と、心臓誘導・心筋分化を引き起こす転写プログラムとの間には時空間的なギャップがあることが示唆された。よって、Mesp1下流因子で、Wnt非存在下という条件で活性化される因子を特定することが今後の課題と考えられる²⁹⁾。

2. 主要核内転写調節因子

特定の遺伝子を強制発現させることによって異所的に拍動する心臓を作ろうという試みは、多くの研究者によってなされてきた。ReiterらはゼブラフィッシュGata5を遺伝子導入することによって、異所的にNkx2-5の発現を誘導している⁹²⁾。カエル胚においてはGata4を強制発現させることにより、心筋誘導を引き起こすという報告もある⁹³⁾。しかしながら、Gata遺伝子は内胚葉においても機能しており、2次的な前後軸を形成することが明らかとなっている。SmallらはMyocardinをカエル胚に導入することによって、 α 型心アクチンを誘導できることを報告している⁹⁴⁾。しかし、Myocardinのみでは拍動する心筋は得られず、むしろ平滑筋分化を促進することが明らかとなった。

Tbx遺伝子を強制発現させた研究も幾つか報告されている。ニワトリ胚でTbx5を強制発現させるとTbx5の発現領域に依存して心室中隔の形成位置がシフトする^{41,95)}。また、カエル胚にTbx5を強制発現しても異所的な心筋誘導は引き起こさないが、正常よりかなり早期に心筋収縮因子の一つTropomyosinの誘導を引き起こす⁹⁶⁾。HiroiらはTbx5とNkx2-5、山田らはNkx2-5とGata4の組み合わせでp19細胞またはマウスES細胞における心筋分化が促進されると報告している。このことから、Tbx5, Nkx2-5, Gata4は心筋の必須因子であると予測される^{46,97)}。

筆者は、これらの遺伝子の組み合わせによって心筋分化を誘導できるのではないかと考え研究を始めることにした。しかしながら、様々な転写因子を組み合わせても心筋分化誘導はおろか、心臓初期因子マーカーの発現誘導さえも引き起こすことは出来なかった。

3. 転写共役複合体がマスター因子になるのか？

筆者らは転写因子が機能する上でクロマチン構造状態が重要な鍵を担っていると考え、初期心臓発生時期に心臓領域特異的に発現するクロマチン関連因子を探索したところ、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体が心発生に重要である知見を得た⁵⁰⁾。さらに、SWI/SNF-BAF60c複合体は心臓転写因子Tbx5, Nkx2-5, Gata4, RBPjkと

タンパク質間で強固に会合して下流の遺伝子発現制御を担っていることが明らかとなった^{7,98)}。これらの結果はSWI/SNF-BAF60cがクロマチン構造を変化させ、Tbx5/Nkx2-5/Gata4が機能する環境を提供していると考えられる^{99,100)}。もちろん、クロマチン因子に変異が生じるとマウスやヒトの心機能においても異常が生じる (Takeuchi, et al. Nat Comms. in press 2010; 文献8)。筆者はこれら3遺伝子にBaf60cを加えた4遺伝子をマウス胚中胚葉性細胞に強制発現させると異所的に拍動する心筋が得られ、さらに培養を続けると心筒様構造まで形成されることを明らかにした (図3, 図4a, 4b)。Nkx2-5はGata4とBaf60cによって誘導を受けるが、Gata4/Baf60cのみでは拍動する心臓誘導には至らなかった (図4c, 4d)。結果的には3因子 (Tbx5/Gata4/Baf60c)

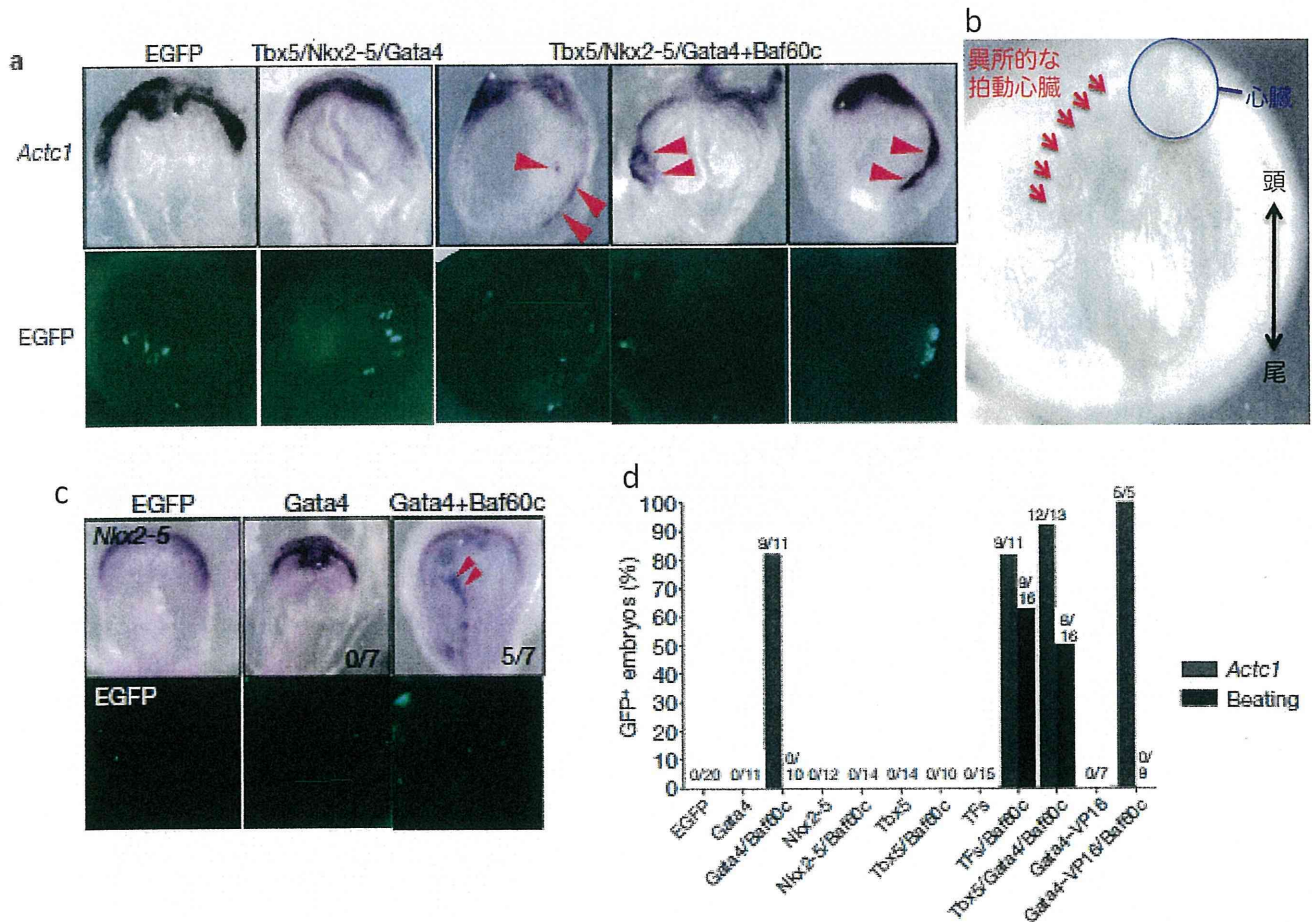


図4 3因子 (Tbx5, Gata4, Baf60c) による拍動する心臓細胞の誘導

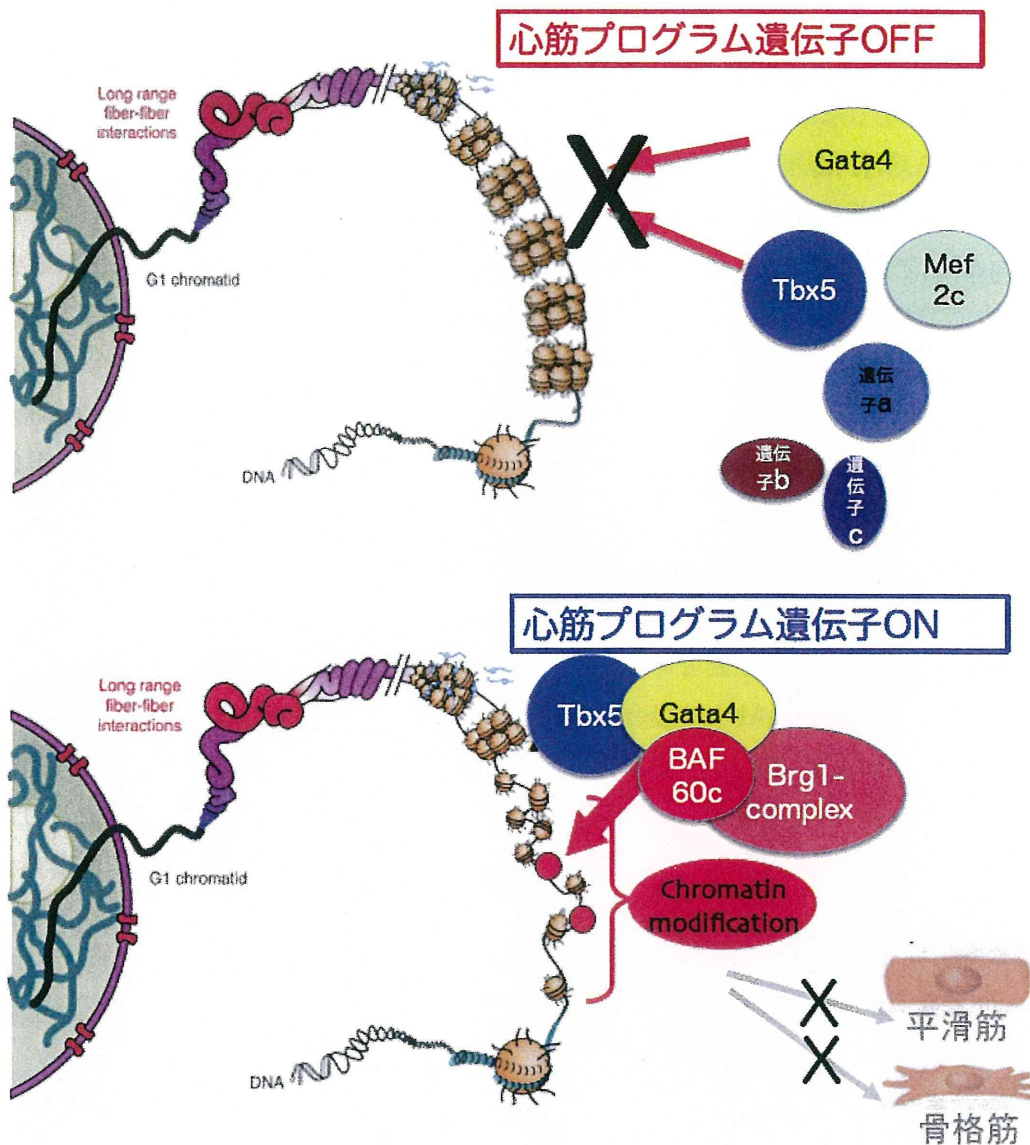


図5 心筋プログラムを開くクロマチン因子

で中胚葉性細胞から心筋分化誘導が可能となった (図4b, 4d). 今後は, 心筋タイプや刺激伝導系分化制御, そしてクロマチン因子の恒常的な発現が心筋分化に与える影響を調べていく必要があると思われる. この研究の過程で, In vivo ChIP法を用いてBrg1のゲノム上制御領域の探索を行ったところ, Nppa, 心トロポニンプロモーター上にあるGata4結合領域近傍を制御していることが明らかとなり, Baf60c依存的にこのプロモーター上にGata4が結合してくることが示された (図5).

エピジェネティック因子のこのような知見は近年多く報告されている. Monzenらはクロマチン構造を変換する転写因子HMGA2の機能を阻害することによりNkx2-5の発現が抑制され心筋分化が阻害されることを示している¹⁰¹⁾. HMGA2はNkx2-5のプロモーター上に直接結合しその転写制御にも関わっている. また, PolycomファミリーのRae28もNkx2-5の発現調節を行ないながら, 心房心室中隔の形成に深く関わっている¹⁰²⁾. ヒストンメチル化因子であるWHSC1がNkx2-5と協調的に作用して心房中隔形成に関与

することも報告された¹⁰³⁾。

SWI/SNF-PBAF複合体の主構成因子Baf180は心臓後期の成熟期において心臓壁形成に関わることが示されている¹⁰⁴⁾。

IedaらはGata4, Tbx5, Mef2cの3因子によってThy1陽性の線維芽細胞が直接心筋に分化することを突き止めた⁶⁾。さらに、「3因子」ルールは、山中ファクターであるOct3/4, Klf4, NanogによるiPSだけでなく、MeltonらもNgn3/Pdx1/Mafaによって膵臓β細胞を樹立している^{105,106)}。

この一連の結果からいえることは、転写因子は特定の因子との組み合わせによって特異な細胞分化を決定出来、かつ、誘導出来るということである。

むすび

本章では、心臓発生における領域特異的なマーカー遺伝子、因子を取り上げながら、心臓を構成する細胞集団がどのような制御を受け派生し分化してくるのかを概説してきた。1990年代の“領域”特異的なマーカー遺伝子研究から、2005年以降は個々の“細胞”を特徴付ける遺伝子マーカー探索と共役複合体形成による“特定細胞の樹立”へと研究内容が変化してきている。これは、より一般社会に還元出来る臨床研究を意識した結果であることは言うまでもない。もちろんこのようなトランスレーショナルリサーチ研究は重要なことであり、詳細な点については他稿をご覧頂きたい。しかし、発生生物学、分子生物学、分子生理学分野から本領域を見つめる研究も重要であり、基礎からの視点と臨床からの視点がタッグを組むような融合研究が要求されてきていると感じられる。現在、心筋(Tbx5/Gata4/Baf60cまたはGata4/Maf2c/Tbx5)誘導因子だけでなくiPS樹立における山中因子、Meltonらによる膵臓β細胞誘導因子は3遺伝子と比較的少ない(?)組み合わせ

で特定の細胞を樹立出来ているが、ヒト細胞への応用や臨床応用への安全面対策において、これからはより複雑性が増すと考えられる。今後の課題は大きく3点挙げられる。一つは、この3因子がヒト細胞においてもマスター制御因子となり得るのか、そして心機能を保つのか。現在国内外の多くの研究室でその高度な機能保存性について研究がなされており、著者も貢献出来ると考えている。二つ目は、より臨床応用を目指す為には、心筋誘導だけでなくより複雑な分化経路の理解(心室筋、心房筋、ペースメーカー細胞などの刺激伝導系、血管との相互作用、交感神経系の支配)とその増殖メカニズムの理解が求められ、様々な細胞の機能連携を維持した心筋シート研究が必要であると考えられる。三つ目は心臓前駆細胞と心臓幹細胞の理解と樹立であろう。そのためには、より一層、両研究者の融合する研究チームの立ち上げが求められる。

〈謝辞〉

末筆であります。本項を執筆する機会を頂きましたことにおきまして、企画監修の先生方に深謝致します。不整脈関連の文献に関しまして、東京医科歯科大難治研究所教授古川哲史先生に助言を頂きましたこと感謝致します。また、本章挿絵の作製に関しまして研究支援員の石原理加さんに感謝致します。

文献

- 1) Basson M. Cardiovascular Disease. Nature. 2008; 451: 903-4.
- 2) Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. Nature. 2008; 451: 943-8.
- 3) Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, et al. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? Development. 2008; 135: 193-205.

- 4) Wu SM. *Mesp1* at the heart of mesoderm lineage specification. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 1-2.
- 5) Harvey RP. Regenerative medicine: Heart redevelopment. *Nature*. 2010; 467: 39-40.
- 6) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010; 142: 375-86.
- 7) Takeuchi JK, Bruneau BG. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature*. 2009; 459: 708-11.
- 8) Hang CT, Yang J, Han P, et al. Chromatin regulation by *Brg1* underlies heart muscle development and disease. *Nature*. 2010; 466: 62-7.
- 9) Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*. 1991; 113: 891-911.
- 10) Tam PP, Parameswaran M, Kinder SJ, et al. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development*. 1997; 124: 1631-42.
- 11) Kirby M. *Cardiac Development*. Oxford: Oxford University Press; 2007.
- 12) Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 2005; 6: 826-35.
- 13) Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR. Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 364-77.
- 14) Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell*. 2006; 126: 1037-48.
- 15) 竹内 純, Bruneau BG. Molecularな視点から心臓発生, 疾患のメカニズムを紐解く〜クロマチンリモデリングファクターとモディフィケーションファクター〜. *細胞工学*. 2007; 26: 799-805.
- 16) Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 2002; 90: 509-19.
- 17) Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol*. 2010; 90: 1-41.
- 18) 竹内 純, 小柴和子. 心臓誘導と心筋分化—マスター因子は存在するか. *医学のあゆみ*. 2009; 229: 711-9.
- 19) Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from *Fgf10*-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. 2001; 1: 435-40.
- 20) Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, et al. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol*. 2001; 238: 97-109.
- 21) Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, et al. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 2001; 128: 3179-88.
- 22) Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003; 5: 877-89.
- 23) Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol*. 1992; 20: 1391-6.
- 24) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1993; 392: 293-6.
- 25) Kirby ML, Waldo KL. Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation*. 1990; 82: 332-40.
- 26) Wei Y, Mikawa T. Fate diversity of primitive streak cells during heart field formation in ovo. *Dev Dyn*. 2000; 219: 505-13.
- 27) Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from *Tbx18* epicardial cells. *Nature*. 2008; 454: 104-8.
- 28) Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008; 454: 109-13.
- 29) Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, et al. *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*. 1999; 126: 3437-47.
- 30) Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. *Mesp1* expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 2000; 10:

- 345-52.
- 31) Inman KE, Downs KM. Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation. *Gene Expr Patterns*. 2006; 6: 783-93.
- 32) Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*. 2006; 11: 723-32.
- 33) Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006; 127: 1137-50.
- 34) Wu SM. *Mesp1* at the heart of mesoderm lineage specification. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 1-2.
- 35) Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, et al. An *Nkx2-5/Bmp2/Smad1* negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*. 2007; 128: 947-59.
- 36) Sun Y, Liang X, Najafi N, et al. *Islet 1* is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol*. 2007; 304: 286-96.
- 37) Brown CB, Wenning JM, Lu MM, et al. Cre-mediated excision of *Fgf8* in the *Tbx1* expression domain reveals a critical role for *Fgf8* in cardiovascular development in the mouse. *Dev Biol*. 2004; 267: 190-202.
- 38) Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, et al. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol*. 2005; 287: 134-45.
- 39) Brade T, Gessert S, Kühl M, et al. The amphibian second heart field: *Xenopus islet-1* is required for cardiovascular development. *Dev Biol*. 2007; 311: 297-310.
- 40) de Pater E, Clijsters L, Marques SR, et al. Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart. *Development*. 2009; 136: 1633-41.
- 41) Xu H, Morishima M, Wylie JN, et al. *Tbx1* has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development*. 2004; 131: 3217-27.
- 42) Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, et al. *Tbx3* controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev*. 2007; 21: 1098-112.
- 43) 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*. 2001; 106: 709-21.
- 44) 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*. 2006; 38: 175-83.
- 45) Koshiba-Takeuchi K, Mori AD, Kaynak BL, et al. Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature*. 2009; 461: 95-8.
- 46) Takeuchi JK, Mileikovskaia M, Koshiba-Takeuchi K, et al. *Tbx20* dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development*. 2005; 132: 2463-74.
- 47) Stennard FA, Costa MW, Lai D, et al. Murine T-box transcription factor *Tbx20* acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development*. 2005; 132: 2451-62.
- 48) Stennard FA, Harvey RP. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development*. 2005; 132: 4897-910.
- 49) Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, et al. T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 646-60.
- 50) Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, et al. *Tbx5* associates with *Nkx2-5* and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet*. 2001; 28: 276-80.
- 51) Gary V, Kathiriya IS, Barnes R, et al. *GATA4* mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with *TBX5*. *Nature*. 2004; 424: 443-7.
- 52) Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, et al. *Mef2c* is a direct transcriptional target of *ISL1* and *GATA* factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*. 2004; 131: 3931-42.
- 53) von Both I, Silvestri C, Erdemir T, et al. *Foxh1* is essential for development of the anterior heart

- field. *Dev Cell*. 2004; 7: 331-45.
- 54) Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, et al. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature*. 2004; 432: 107-12.
- 55) Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell*. 2004; 117: 373-86.
- 56) McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, et al. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development*. 2005; 132: 189-201.
- 57) Moses KA, DeMayo F, Braun RM, et al. Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice. *Genesis*. 2001; 31: 176-80.
- 58) Ma Q, Zhou B, Pu WT. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol*. 2008; 323: 98-104.
- 59) Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, et al. Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 43: 677-85.
- 60) Maitra M, Schluterman MK, Nichols HA, et al. Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development. *Dev Biol*. 2009; 326: 368-77.
- 61) Xin M, Davis CA, Molkentin JD, et al. A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 11189-94.
- 62) Peterkin T, Gibson A, Patient R. Redundancy and evolution of GATA factor requirements in development of the myocardium. *Dev Biol*. 2007; 311: 623-35.
- 63) Holtzinger A, Evans T. Gata5 and Gata6 are functionally redundant in zebrafish for specification of cardiomyocytes. *Dev Biol*. 2007; 312: 613-22.
- 64) Zhao R, Watt AJ, Battle MA, et al. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol*. 2008; 317: 614-9.
- 65) Agnihotri S, Wolf A, Picard D, et al. GATA4 is a regulator of astrocyte cell proliferation and apoptosis in the human and murine central nervous system. *Oncogene*. 2009; 28: 3033-46.
- 66) Haworth KE, Kotecha S, Mohun TJ, et al. GATA4 and GATA5 are essential for heart and liver development in *Xenopus* embryos. *BMC Dev Biol*. 2008; 8: 74.
- 67) Watt AJ, Zhao R, Li J, et al. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol*. 2007; 7: 37.
- 68) Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, et al. Endothelin receptor type A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field and is later implicated in chamber myocardium formation. *Development*. 2010; 137: 3823-33.
- 69) Männer J, Pérez-Pomares JM, Macías D, et al. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169: 89-103.
- 70) Wessels A, Pérez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 276: 43-57.
- 71) Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 2006; 127: 1151-65.
- 72) Sun Y, Liang X, Najafi N, et al. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol*. 2007; 304: 286-96.
- 73) Zhou B, von Gise A, Ma Q, et al. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 375: 450-3.
- 74) Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008; 454: 109-13.
- 75) Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet*. 2010; 42: 89-93.
- 76) Ishii Y, Garriock RJ, Navetta AM, et al. BMP signals promote proepicardial protrusion

- necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Dev Cell*. 2010; 19: 307-16.
- 77) Tomanek RJ, Ratajska A, Kitten GT, et al. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn*. 1999; 215: 54-61.
- 78) Wada AM, Reese DE, Bader DM. Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Development*. 2001; 128: 2085-93.
- 79) Moretti A, Bellin M, Jung CB, et al. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J*. 2010; 24: 700-11.
- 80) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J*. 2004; 68: 691-702.
- 81) Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 7096-105.
- 82) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 607-11.
- 83) Kami D, Shiojima I, Makino H, et al. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS One*. 2008; 3: e2407.
- 84) Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29: 1525-39.
- 85) Lim JY, Kim WH, Kim J, et al. Involvement of TGF-beta1 signaling in cardiomyocyte differentiation from P19CL6 cells. *Mol Cells*. 2007; 24: 431-6.
- 86) Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000; 28: 713-26.
- 87) Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, et al. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 69-84.
- 88) David R, Brenner C, Stieber J, et al. MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol*. 2008; 10: 338-45.
- 89) Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, et al. Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 55-68.
- 90) Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008; 453: 524-8.
- 91) Zhu W, Shiojima I, Ito Y, et al. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*. 2008; 454: 345-9.
- 92) Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, et al. Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev*. 1999; 13: 2983-95.
- 93) Latinkić BV, Kotecha S, Mohun TJ. Induction of cardiomyocytes by GATA4 in *Xenopus* ectodermal explants. *Development*. 2003; 130: 3865-76.
- 94) Small EM, Warkman AS, Wang DZ, et al. Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development*. 2005; 132: 987-97.
- 95) Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, et al. Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development*. 2003; 130: 5953-64.
- 96) Goetz SC, Brown DD, Conlon FL. TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression. *Development*. 2006; 133: 2575-84.
- 97) Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, et al. Single-cell-derived mesenchymal stem cells over-expressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 2007; 313: 698-706.
- 98) Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, et al. Baf60c is a nuclear Notch signaling component

- required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 846-51.
- 99) Zhu Y, Gramolini AO, Walsh MA, et al. Tbx5-dependent pathway regulating diastolic function in congenital heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 5519-24.
- 100) Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, et al. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 9280-5.
- 101) Monzen K, Ito Y, Naito AT, et al. A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol*. 2008; 10: 567-74.
- 102) Shirai M, Osugi T, Koga H, et al. The Polycomb-group gene *Rae28* sustains *Nkx2.5/Csx* expression and is essential for cardiac morphogenesis. *J Clin Invest*. 2002; 110: 177-84.
- 103) Nimura K, Ura K, Shiratori H, et al. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links *Nkx2-5* to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*. 2009; 460: 287-91.
- 104) Wang Z, Zhai W, Richardson JA, et al. Polybromo protein BAF180 functions in mammalian cardiac chamber maturation. *Genes Dev*. 2004; 18: 3106-16.
- 105) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 106) Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008; 455: 627-32.

参考文献

- a) 山岸敬幸, 白石 公, 編. 先天性心疾患を理解するための臨床心臓発生学. 東京: メジカルビュー社; 2007.
- b) Huston MR, Kirby ML. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and contruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18: 101-10.

ARTICLE

Received 5 Aug 2010 | Accepted 11 Jan 2011 | Published 8 Feb 2011

DOI: 10.1038/ncomms1187

Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development

Jun K. Takeuchi^{1,2,*}, Xin Lou^{3,*}, Jeffrey M. Alexander^{1,4}, Hiroe Sugizaki², Paul Delgado-Olguín¹, Alisha K. Holloway¹, Alessandro D. Mori¹, John N. Wylie¹, Chantilly Munson^{5,6}, Yonghong Zhu³, Yu-Qing Zhou⁷, Ru-Fang Yeh⁸, R. Mark Henkelman^{7,9}, Richard P. Harvey^{10,11}, Daniel Metzger¹², Pierre Chambon¹², Didier Y. R. Stainier^{4,5,6}, Katherine S. Pollard^{1,8}, Ian C. Scott^{3,13} & Benoit G. Bruneau^{1,4,5,14}

Dominant mutations in cardiac transcription factor genes cause human inherited congenital heart defects (CHDs); however, their molecular basis is not understood. Interactions between transcription factors and the Brg1/Brm-associated factor (BAF) chromatin remodelling complex suggest potential mechanisms; however, the role of BAF complexes in cardiogenesis is not known. In this study, we show that dosage of Brg1 is critical for mouse and zebrafish cardiogenesis. Disrupting the balance between Brg1 and disease-causing cardiac transcription factors, including Tbx5, Tbx20 and Nkx2-5, causes severe cardiac anomalies, revealing an essential allelic balance between *Brg1* and these cardiac transcription factor genes. This suggests that the relative levels of transcription factors and BAF complexes are important for heart development, which is supported by reduced occupancy of Brg1 at cardiac gene promoters in *Tbx5* haploinsufficient hearts. Our results reveal complex dosage-sensitive interdependence between transcription factors and BAF complexes, providing a potential mechanism underlying transcription factor haploinsufficiency, with implications for multigenic inheritance of CHDs.

¹ Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, California 94158, USA. ² Cardiovascular Regeneration, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, and Biological Sciences, Graduate School of Sciences, The University of Tokyo Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, JST PRESTO, Japan.

³ Program in Developmental and Stem Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada. ⁴ Programs in Biomedical Sciences and Developmental and Stem Cell Biology, University of California, San Francisco, California 94143, USA. ⁵ Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco, California 94158, USA. ⁶ Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, California 94158, USA. ⁷ The Mouse Imaging Centre, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada. ⁸ Department of Epidemiology and Biostatistics, University of California, San Francisco, California 94107, USA. ⁹ Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada. ¹⁰ Victor Chang Cardiac Research Institute, Darlinghurst, Sydney 2010, Australia. ¹¹ Faculty of Medicine, University of New South Wales, Kensington 2052, Australia. ¹² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, Illkirch 67404, France.

¹³ Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada. ¹⁴ Department of Pediatrics, University of California, San Francisco, California 94143, USA. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.G.B. (email: bbruneau@gladstone.ucsf.edu).

The transcriptional regulation of organogenesis has been well studied, and in the developing heart, combinatorial interactions between transcription factors are key to robust gene regulation^{1,2}. Importantly, disease-causing mutations in several cardiac transcription factors are the underlying cause of human congenital heart defects (CHDs)^{2,3}. Most of these mutations are predicted to cause haploinsufficiency; however, the mechanistic basis for the aberrant gene expression that results from reduced transcription factor dosage is not known.

Mutations in cardiac transcription factor genes, such as *TBX5*, *NKX2-5* and *GATA4*, all cause dominant inherited human CHD. These factors physically interact with each other, providing an effective mechanism for specific target activation and a potential explanation for their common disease-related haploinsufficiency⁴⁻⁶. *Tbx5*, *Nkx2-5* and *Gata4* also interact with the Swi/Snf-like Brg1/Brm-associated factors (BAF) chromatin remodelling complexes, in part via Baf60c, a cardiac-enriched subunit of the BAF complexes⁷. This interaction is key for the *de novo* induction of cardiac differentiation from embryonic mesoderm⁸, and depletion of Baf60c function leads to impaired heart development⁷.

Identification of Baf60c and other BAF complex subunits that co-assemble to form cell-type-specific complexes has revealed the importance of BAF complexes as instructive factors in differentiation, rather than simply as chromatin-unwinding machines^{7,9-11}. These specific BAF complexes perform discrete functions related to lineage specification and precursor differentiation. However, little is known about dosage sensitivity of tissue-specific BAF complexes or their links to DNA-binding transcription factors that are involved in similar processes.

Mammalian BAF complexes include one of the two ATPases, Brm or Brg1 (ref. 10). Brm is dispensible for development, whereas Brg1 (also known as Smarca4) is absolutely essential for broad aspects of development in early mouse embryogenesis^{12,13}. Thus, disrupting the function of Brg1 provides insights into the global function of BAF complexes during development. In the present study, we examined the role of *Brg1* in heart development in mouse and zebrafish and

tested its potential role in modulating the function of disease-related cardiac transcription factors. Our results reveal a dosage-sensitive interdependence between transcription factors and BAF complexes that modulates several aspects of heart formation. We conclude that the disruption of a delicate balance between CHD-causing transcription factors and BAF complexes is likely to be a mechanistic cause of CHDs because of transcription factor haploinsufficiency.

Results

Brg1 is critical for mouse heart development. To assess the importance of Brg1 in the developing mammalian heart, we deleted *Brg1* in developing ventricular myocytes, with a loxP-flanked *Brg1* allele (referred to here as *Brg1*^{fl})¹⁴ and *Nkx2.5::Cre*, which is expressed mainly in ventricular myocytes from E8.5 onwards, with rare sporadic activity in endocardial cells^{15,16} (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1). This *Brg1* deletion led to highly variable defects in heart formation (Fig. 1b,c), perhaps partly because of variable and incomplete activity of the Cre-expressing transgene (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1). Most embryos did not survive past E10.5; however, a few (two pups from over ten litters) *Nkx2.5::Cre;Brg1*^{fl/fl} mice were born alive. Severely affected embryos had a loss of normal ventricular chamber morphology (Fig. 1b), whereas the least severely affected, which survived to birth, had dilated disorganized ventricles, ventricular septation defects and a double outlet right ventricle (Fig. 1c). Most embryos had reduced chamber size and impaired looping (Fig. 1d). Expression of several cardiac genes was defective in *Nkx2.5::Cre;Brg1*^{fl/fl} embryos (Fig. 1d), including *Nppa* (a marker of chamber myocardium), *Tbx5* (a transcription factor that regulates *Nppa*) and the trabecular growth factor *Bmp10*. Reduced *Bmp10* expression has also been shown in the deletion of *Brg1* using *Sm22a::Cre*, and has been determined to be a critical downstream effector of Brg1-dependent gene regulation¹⁷. Our deletion using *Nkx2.5::Cre*, although variable in its effect, uncovers a broader Brg1-dependent programme of gene expression than that observed with *Sm22a::Cre*, most likely because of the earlier expression of *Nkx2.5::Cre*. Other cardiac genes, such as *Nkx2-5* and *Actc1*, were

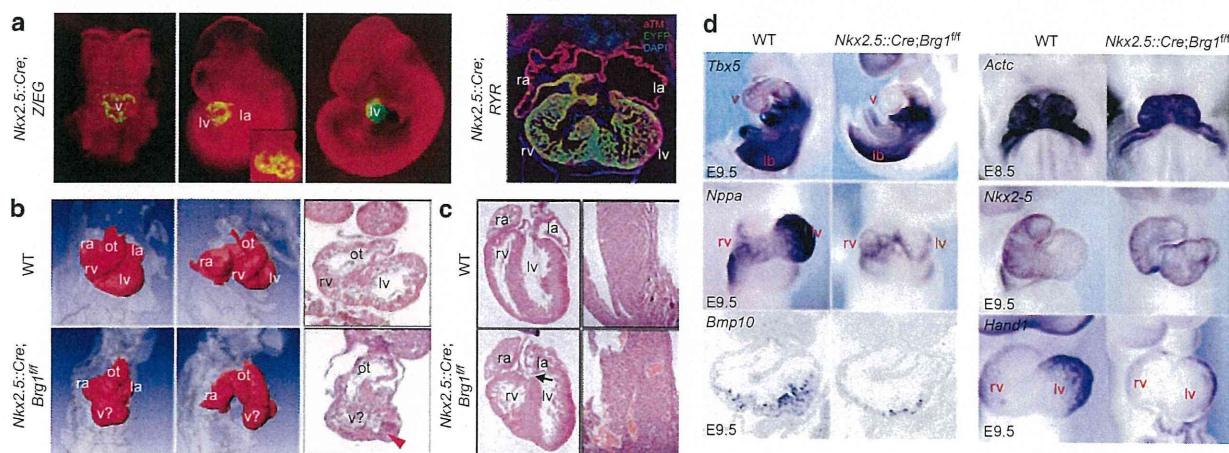


Figure 1 | Brg1 is required for early mouse heart formation. (a) Activity of the *Nkx2.5::Cre* transgene, using the Z/EG or RYR reporter, at E8.5, 9.5, 11 and 12.5. Inset for E9.5 embryo shows a ventral four-chamber view. For whole-mount pictures, green signal is the activity of the Z/EG reporter, whereas red signal is the bright-field illumination through a red filter. For the RYR reporter, a cryosection stained for anti-EYFP (green), alpha-tropomyosin (red) and 4,6-diamidino-2-phenylindole (blue) is shown. Original magnification: $\times 25$ (whole-mount pictures), $\times 100$ (sections). (b) Frontal view of OPT reconstructions (left panels), lateral view of OPT reconstructions (middle panels) and histology (rightmost panels) of WT and *Brg1* mutant (*Nkx2.5::Cre;Brg1*^{fl/fl}) mice at E9.5. Arrowhead shows thickened ventricular wall. (c) Histology of postnatal day (P) 1 hearts. Arrow shows membranous ventricular septal defect and double outlet right ventricle in the *Nkx2.5::Cre;Brg1*^{fl/fl} heart. Close-up of the interventricular septum (right panels) shows disorganized septum formation. Original magnification: $\times 100$. (d) Gene expression in WT and *Nkx2.5::Cre;Brg1*^{fl/fl} mice at E8.5 (*Actc1*) or E9.5 (all other genes) shows decreased *Tbx5*, *Nppa*, *Bmp10* and *Hand1* expression. la, left atrium; lb, limb bud; lv, left ventricle; ra, right atrium; rv, right ventricle; v, ventricle; v?, ventricle of ambiguous identity.