

201110026A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

後天的心疾患・不整脈解析モデルとしての  
エピジェネティック変異

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 竹内 純

平成24（2012）年3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

後天的心疾患・不整脈解析モデルとしての  
エピジェネティック変異

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 竹内 純

平成24（2012）年3月

# 目次

## I. 総括研究報告書

後天的心疾患・不整脈解析モデルとしてのエピジェネティック変異

竹内 純 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 10

総括研究報告書

後天的心疾患・不整脈解析モデルとしてのエピジェネティック変異

研究代表者： 竹内 純 (東京大学分子細胞生物学研究所・准教授)

I. 総括研究報告

【研究要旨】

我々が健康に生活を送っていく際、心機能維持は重要なテーマである。毎年心不全における死亡者は16%以上にも上り、死亡原因の第2位である。この最大の原因の一つとしてエピジェネティック (非遺伝性) な影響による重篤化が考えられる。本研究は、ヒト心不全患者からの遺伝子プロファイルから後天的に不整脈、心肥大を引き起こす可能性のあるエピジェネティック因子 (12因子) に着目し、一部作製済みマウスを含め、成体でその遺伝子破壊マウスまたは遺伝子過剰発現マウスを作製してきた。心肥大マウスと、ヒト心不全患者の心筋生検から遺伝子発現アレー解析を行ったところ、同様なエピジェネティック因子の発現異常が観察された。さらに、心疾患・不整脈モデルマウスを解析する過程でクロマチン構造変換遺伝子群の発現異常を伴っている結果を得てきた(van Weerd, Koshiba-Takeuchi et al., *Cardiovas. Res.* 2011; Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。さらに、性差関連遺伝子の一つを遺伝子破壊するとヒト心臓緻密化障害に酷似した表現型を示すことが明らかとなった。この結果は、心臓における代謝が損なわれると特異的クロマチン構造も変化することを示しただけでなく、これらの遺伝子発現異常マウスはヒト先天性心疾患モデルだけでなく後天的な心肥大、心筋症モデルマウスや不整脈モデルマウスとなる可能性が高く、詳細な調査が必要である。

研究分担者

塚原 由布子 (東京大学分子細胞生物学研究所：博士研究員)

研究協力者

小柴 和子 (東京大学分子細胞生物学研究所：講師)

Benoit G. Bruneau (UCSF/グラッドストーン研究所：准教授)

David Kaye (BAKER IDI：心臓外科教授)

白髭 克彦 (東京大学分子細胞生物学研究所：教授)

古川 哲史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所：教授)



## 【A. 研究目的】

本研究はヒト心不全患者の心生検からの遺伝子プロファイルから不整脈、心肥大を引き起こす可能性のあるエピジェネティック因子に着目し、成体でその遺伝子破壊マウスまたは遺伝子過剰発現マウスを作製することで、心臓生理異常や遺伝子発現変化をプロファイル化しヒト心不全発症原因の解明につなげるアプローチを行なうことである。本研究終了までには広く研究者、基礎臨床に提供出来るようヒト心疾患発症を引き起こすエピジェネティック因子の単離を目指すことを目的とし、最終的には心筋症発症、心不全発症抑制因子の単離を目指す。

## 【B. 研究背景】

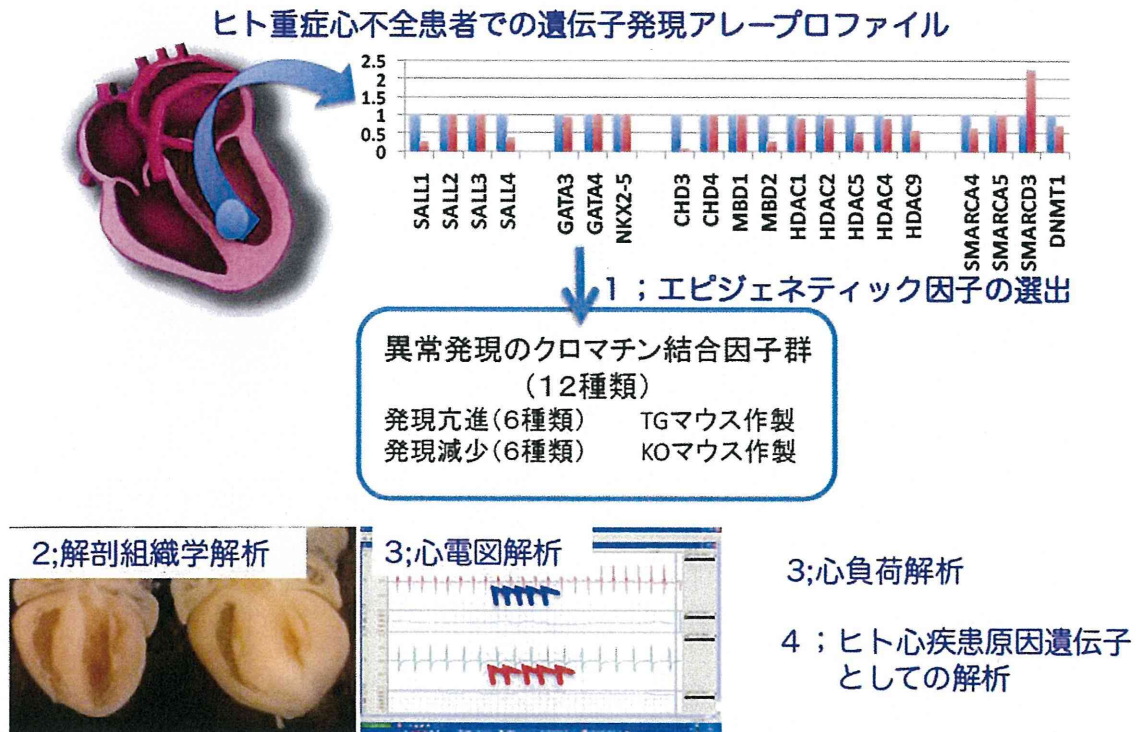
心臓には恒常性を維持するメカニズムが存在し、生理的な維持をする。しかし、そのバランスが崩れると心筋はいずれ異常をきたし、拡張型／肥大型心筋症などの病態を生み、心不全へ至る。この心疾患の原因の一つとしてクロマチン構造変換による異常な遺伝子発現が挙げられるが、その詳細な発症メカニズムは解明されていない。研究代表者はヒト心不全患者生検からの遺伝子プロファイルをもとに、エピジェネティック因子に着目し研究を行ってきた(Takeuchi&Bruneau. *Nature*2009; Takeuchi et al., *PNAS* 2008; Lickert, Takeuchi et al., *Nature* 2004)。また研究代表者は現在2つのクロマチン因子についてモデルマウスの作製に成功しており、クロマチン構造変換遺伝子(Smarcd3)に発現亢進が生じると胎児性遺伝子の発現維持による心筋成熟異常や心筋過増殖が見受けられることを明らかにしている(Koshiba-Takeuchi et al., *submitted* 2012)。つまり、心肥大関連因子の発現以前にクロマチン因子、ヒストン因子群によるゲノムの構造変換が行われている可能性が大きい。また、クロマチン因子Brg1 の遺伝子破壊マウスでは房室結節細胞の脱落と共に不整脈が見受けられる(2011年論文採択: Takeuchi et al., *Nature Commun.*2011)。よって、心疾患発症の可能性のあるエピジェネティック因子の遺伝子破壊マウス、遺伝子過剰発現マウスの作製は非常に重要な研究課題であると考えられ、推進していく必要がある。

上記のようにクロマチン、ヒストン因子群の異常モデルマウスを作製することによって後天的に多発する心疾患の原因を解明でき、さらには疾患回復へのヒントが得られると考えている。よって、残り10遺伝子については遺伝子破壊マウスと過剰発現マウスの作製を試み、心疾患発症の確認を解剖学的、生理学的研究から行っていく。このような考察は極めて独創的であり、国内外で申請者グループのみである。

## 【C. 研究方法】

### 1：ヒト心不全患者と健常者との間での遺伝子発現アレー作製と候補遺伝子選出

D. Kaye博士 (BAKER IDI心臓外科教授) から健常者と心不全患者の各5人の心筋生検を採取し、遺伝子発現アレーを作製した。その中で、異常亢進または減少した遺伝子プロファイルを作製する(図1)。心不全患者心筋の指標として、Nppa/Nppb/STATの発現亢進していることが確認されたサンプルを用いている。その中で、発現変化のあるエピジェネティック因子を選出する(下図1内の1)。



(図1) ヒト心不全患者と健常者心筋生検アレーからの心疾患発症遺伝子の選出方法

### 2：候補遺伝子の遺伝子破壊マウスの作製と機能解析による疾患発症因子の選出

候補遺伝子は遺伝子破壊マウスを作製し、②組織解析、③心電図解析、④TAC/MIによる機能評価、⑤ヒト疾患責任遺伝子としての探索、を行なう(上図1内の1～5)。

### 3：モデルマウスの登録と再生因子または負荷耐性因子の探索

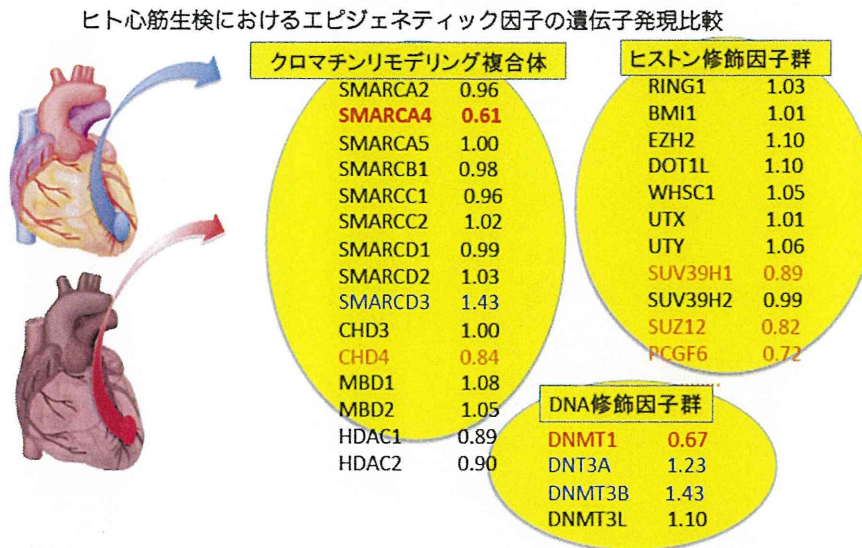
上記候補因子から心疾患発症因子の選出と登録を行なう。さらに、心筋再生能を高める因子と心負荷に対して耐性能を高める因子の選出も探索する。

## 【D. 研究結果】

### 1：候補因子の選出結果

アレープロファイルの結果、13種類のクロマチン-ヒストン修飾因子に発現変化が認められた（下図2では9種類）。

### 重症心不全患者では13種類のエピジェネティック因子の発現異常



(図2) ヒト心筋生検アレー結果の抜粋 (クロマチン-ヒストン修飾因子)

### 2：候補遺伝子の遺伝子破壊マウスを用いた表現型解析

このプロファイルを基に、本研究は心不全発症を亢進させる可能性のあるエピジェネティック因子の中で、興味深い発現変化を呈した、①SWI/SNF-BAF クロマチンリモデリング複合体（特にSmarca4 (Brg 1) と Smarcd3 (Baf60c)、②DNA メチル化因子 (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b)、に着目して研究を行った。さらに、3つめとして図には載せていないが、性差関連因子の発現が亢進または減少していることが明らかとなった。その中で、③男性ホルモン結合因子ARIP4に着目し、その標的領域とモデルマウスを作製し、心臓生体での機能について明らかになった点を報告する。

#### 研究結果1 (クロマチン因子の先天的・後天的遺伝子発現阻害研究)

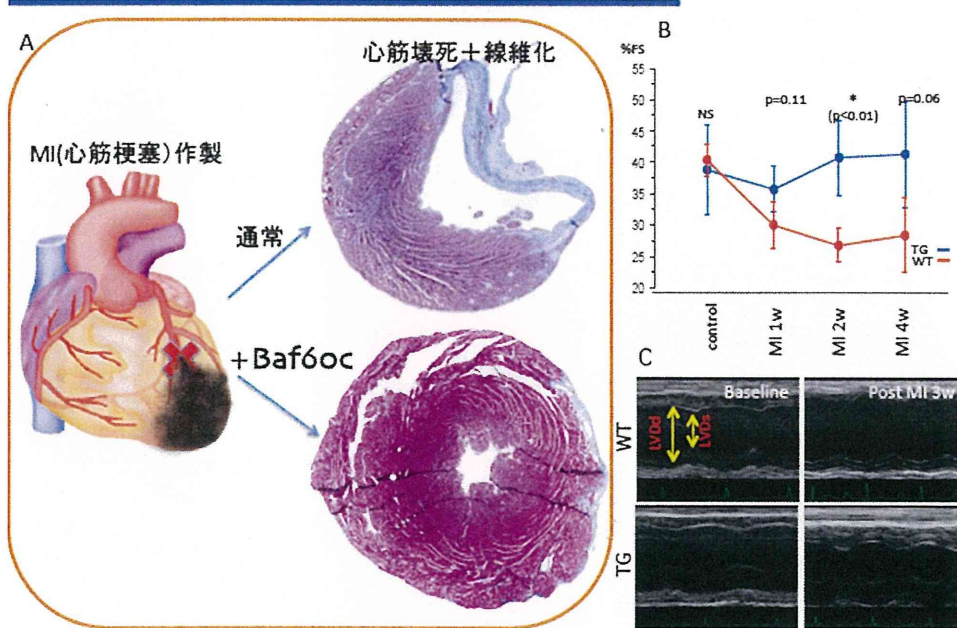
先天的心疾患発症にはクロマチン因子の発現レベルが重要である。クロマチン構造変換複合体コアタンパク Smarca4(Brg1)は心不全患者で40%減少している。この意味を理解する為にBrg1<sup>flox/flox</sup>マウスとEIIAcreマウスと交配し、Brg1<sup>del/+</sup> (Brg 1 欠損) マウスを作製した。Brg1<sup>del/+</sup>マウスは不整脈と洞房不全を呈していた(Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。ことから、後天的心疾患・心不全発症の際におけるクロマチン因子の遺伝子破壊マウスを作成中である。



## 研究結果2 (クロマチン因子の恒常的発現研究)

クロマチンリモデリング複合体の補因子であるBaf60cが恒常的に発現するトランスジェニック (TG) マウスを作製したところ、胎児性遺伝子発現が亢進し、リン酸化ヒストン陽性心筋やki67陽性心筋が多く存在し、心筋成熟が阻害されていると考えられる。興味深い事に、このTGマウスではMI (心筋梗塞) 後の線維化が抑制され、機能心筋で覆われていた (下図3A)。さらに、毎週心エコー解析を行なうと、Baf60c-TGマウスは一週後から心筋収縮率が回復していることが明らかとなった (下図3B, C)。Baf60cTGマウス心室では心トロポニン始め胎時期遺伝子の発現が亢進していることから、このプロモーター領域でChIPを行なったところ、Brg1を含むSWI/SNF複合体が結合している事が明らかとなった。この領域でのBrg1の結合は、心筋成熟に従って消失することから、Baf60c依存的にクロマチン構造改変が生じている事が明らかとなった。さらに、心臓再生可能な両生類やマウス新生児で、心臓先端部を切除し心筋再生を促すと、心筋再生領域でBaf60c陽性細胞が12時間以内で見受けられ、心筋再生完了時には消失する事が分かった。これらの事は、心筋再生能と心筋増殖は深くリンクしており、この活性維持には特異領域でのクロマチン構造の変換が重要である事が示唆された。同時に、マウスとヒトにおいてDNAメチル化がどのようにリセットされるのかを調べていく必要がある。

### クロマチン因子恒常的発現は心筋生存を保護する



(図3) 心筋梗塞 (MI) 後のマウスの心形態と心機能の相違

## 研究結果3 (クロマチン関連因子の遺伝子破壊マウス作製)

現時点で、Snf2h, Dnmt1, Dnmt3a/b, Ring1a/b, ARIP4遺伝子破壊マウスを作製済。全てホモで胎性致死であるが、それぞれ特徴のある異常な表現型を呈していた。Dnmt1はホモで胎生10日目に致死のためヘテロで心



電図計測を行なった。Dnmt3a、3bに関してはシングルホモなら生きるため、Dnmt3aホモ、またはDnmt3bホモで心電図計測を行なった。

#### 研究結果4 (性差と心不全)

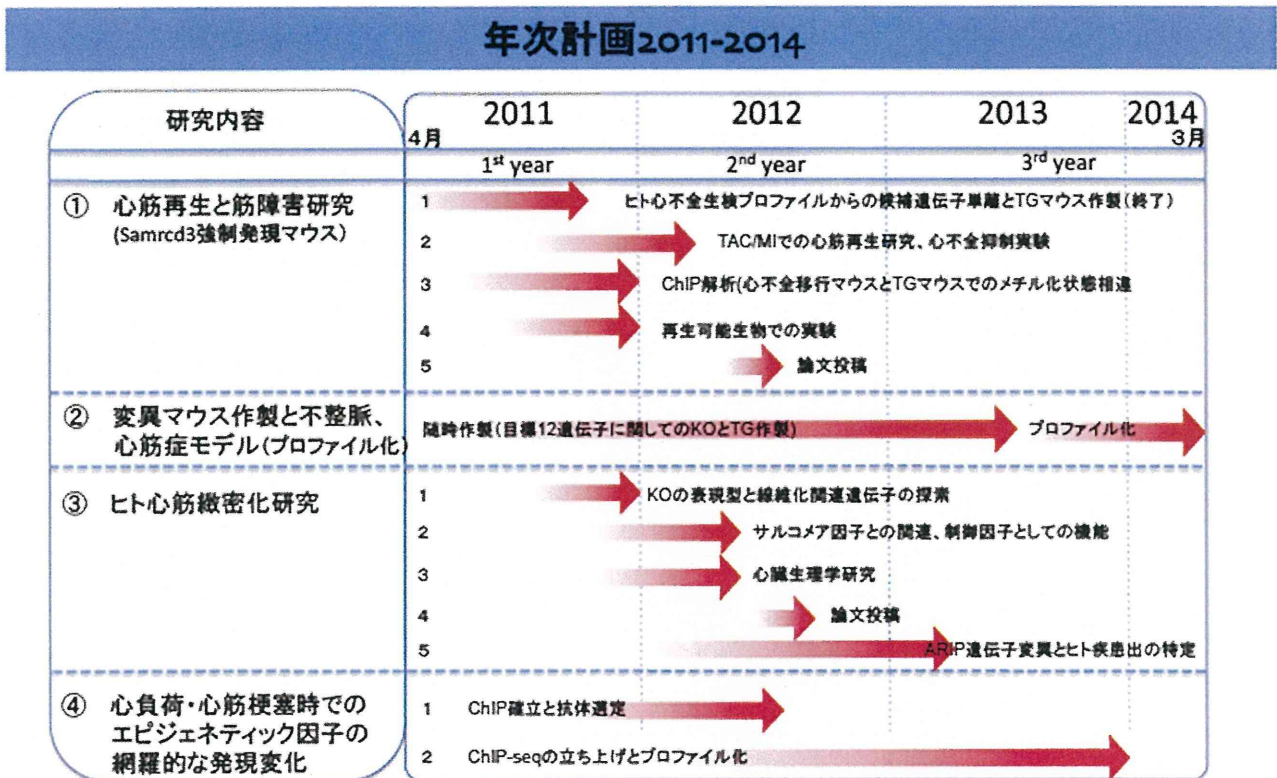
本年度単離された遺伝子の中で ARIP4 遺伝子の研究は、チームを形成し集中して研究する必要がある。ARIP4 遺伝子破壊マウスは心筋緻密化障害が観察され、ヒト non-compaction 表現型と非常に酷似する結果を得た。ARIP は男性ホルモン調節因子でもあることから、雌雄での機能差異も含めて、今後集中的に研究していく必要がある。ヒト責任遺伝子の可能性においても共同研究を依頼し調べている(富山大学医学薬学研究部市田落子准教授、シンシナティ小児病院 Towbin 教授と共同研究開始)。ARIP 遺伝子は心筋サルコメアでも存在することから、サルコメア蛋白との関連や、心筋収縮異常を引き起こす可能性を用いた生細胞初代培養系で調べていく。詳細には、正常心筋と KO マウスからの心筋での収縮異常を東京医科歯科大安田賢二教授と共同研究で解析する。さらに、心筋細胞質での結合パートナーの同定を目指す。このために LC-MS を用いると同時に、サルコメア因子との結合領域の同定と筋収縮を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目指すため、研究員の雇用と引き続き助成が必要である。Arip4 はエピジェネティック因子と共役することから、後天的な心不全リスクを高める因子としても着目している。

#### **【E. 考察】**

心肥大や不整脈は発症頻度が高く心筋梗塞を引き起こし易く突然死に至ることから、心不全に至る可能性のある心疾患モデル生物を作製することは重要な課題であり、原因究明だけでなく機能回復に向けた事業に発展することが可能となる。心筋症、心筋梗塞を招く可能性のある因子として、本申請者はエピジェネティック因子に着目してきた。実際、ヒト心不全生検での遺伝子アレープロファイルではこれら因子の発現に異常が生じており、遺伝子破壊、または過剰発現させることにより心肥大や不整脈を伴い、モデルマウスとして機能する結果を得てきた(Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。これにより、本申請は、成体で発現異常を伴うよう細工した心疾患モデルマウスを作製することを目的としており、このモデルマウスは将来のヒト後天的な心筋梗塞や心不全発症メカニズムを知る上で貴重なモデル生物になると考えている。また、これらのモデルマウスを利用することで、将来的に心不全の機能回復、または心筋梗塞抑制薬剤研究に大きく役立つものと期待される。よって、先天的に遺伝子破壊されたモデルマウスと成体において(後天的に)遺伝子破壊されるマウスを作製することによって、よりヒト心不全発症に近いモデルマウスの作製を試み、研究者や医療に広く提供する。

## 【F. 今後の研究計画】

今後の年次計画を下記に示す。



## 【G. 研究発表】

### 1 : 論文発表

国際科学論文

1. van Weerd JH., Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, and ○Takeuchi JK.

Epigenetic factors and cardiac development.

*Cardiovascular Research* 91, 203–211, 2011. (査読あり)

2. ○Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori AD,

Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Zhou YQ, Yeh RF, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DY, Pollard KS, Scott IC, Bruneau BG.

Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development.

*Nature Commun.* 2011, 2:187, 1-11. (査読あり)

## 総説

3. 塚原由布子、小柴和子、○竹内純、

月刊「Heart View」Vol. 15 No. 8(2011) 特集「血管・心筋再生はどこまでできたか」「心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン制御の役割」

4. ○竹内純、宮川一富田幸子、笹岡陽介、小柴和子

Annual Review 循環器、中外医学社 1-16. (2011) 「心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子」

## 2：インタビュー

2011年6月 朝日新聞「今さら聞けない生物学」

## 3：表彰

2011年5月 ゴットフリード・ワグネル賞2010 ドイツ・イノベーション・アワード

## 4：招待講演

2012年2月：金沢大学セミナー（石川）

2012年2月：福島県立医大次世代ワークショップ（福島）

2012年2月：日本心脈管作動物質学会シンポジウム（秋田）

2011年12月：日本分子生物学会シンポジウム&オーガナイザー[Epigenetics and organogenesis]

2011年12月：国際心臓研究学会(ISHR)シンポジウム [Current Status and Future Perspective in Cardiovascular Regenerative Medicine]

2011年11月：大阪大学蛋白質研究所セミナー「エピジェネティクスと疾患」（阪大、大阪）

2011年10月：東京医科歯科大学難治疾患研究所「難治疾患共同研究拠点」事業（東京）

2011年9月：日本遺伝学会第83回大会ワークショップ（京都大学農学部、京都）

2011年7月：第5回神戸生活習慣病研究会（神戸）

2011年6月：第13回アテロジェネシス研究会（岐阜）

2011年6月：ISSCR 9th Annual Meeting（トロント、カナダ）

2011年4月：GCOE シンポジウム（熊本大学発生医学研究所、熊本）

## II. 研究成果の刊行に関する一覧

### 書籍

著者	タイトル	編集者	書籍名
塚原由布子 小柴和子 竹内純	心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン 制御の役割		Heart View
出版社	出版地	出版年	ページ
メジカルビュー社	東京新宿区市谷本村町 2-30	2011 年	55-63

著者	タイトル	編集者	書籍名
竹内純 宮川-富田幸子 笹岡陽介 小柴和子	心臓発生と心筋分化誘導のマスター因 子	山口徹 高本眞一 小室一成 佐地勉	Annual Review 循環器
出版社	出版地	出版年	ページ
中外医学社	東京新宿区矢来町 62	2011 年	1-16

### 雑誌

発表者	論文タイトル		
Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori AD, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Zhou YQ, Yeh RF, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DY, Pollard KS, Scott IC, Bruneau BG.	Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development..		
発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nature Communications	2:187	1-11	2011

発表者	論文タイトル		
Jan Hendrick van Weerd, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Chulan Kwon, Jun K. Takeuchi.	Epigenetic factors and cardiac development.		
発表誌名	巻号	ページ	出版年
Cardiovascular Research	91	203-211	2011



### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

特集

血管・心筋再生は  
どこまで来たか

識る



Expertise

## 心臓発生にかかわる クロマチン・ヒストン制御 の役割

▶ *Functional roles of chromatin/histone in heart development*

塚原由布子 (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)

小柴和子 (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, 東京大学大学院理学系研究科生物科学)

竹内 純 (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, JST さきがけ「iPS細胞と生命機能」)

心臓細胞への運命決定にかかわる転写因子群, すなわち心臓(特異的)転写因子群は進化の過程で高度に保存され, 先天性心疾患の原因遺伝子となることから心臓発生において重要な役割を担っている。多くの研究者らによって心臓転写因子の同定と機能解析が進められた結果, 心臓転写因子群は特異的なパートナーと協調して心臓区画化形成にかかわる下流遺伝子の発現を制御し, 各細胞系譜への運命決定や分化成熟に働くことが明らかとなった。しかしながら, 心疾患の多様な症状やホメオスタシスの制御など心臓転写因子研究のみでは解き明かせない現象が存在する。これは, 心臓転写因子群がどのような場面においても独立して優先的に機能するわけではなく, 細胞のクロマチン状態によって心臓転写因子群の活性が制御されるためと考えられる。近年, クロマチンの構造変化を引き起こすエピジェネティックな制御機構が次々と明らかになり, 心臓においても心臓発生の時期・領域特異的に機能するエピジェネティック因子への関心が高まっている<sup>1,2)</sup>。本稿では, エピジェネティック因子の概略を交え, エピジェネティック因子が心臓転写因子の制御を介して心臓特異的な機能を発揮するメカニズムについて紹介していく。さらに, 心臓のエピジェネティック研究がもたらす心疾患の新たな治療法への展望を述べたい。

## エピジェネティック因子の概要

クロマチンとよばれるDNAとヒストンからなる高次構造は、遺伝子情報をコンパクトに核内へと収納するとともに、遺伝子の転写活性を制御している。DNAがヒストンに強く巻きついた領域(ヘテロクロマチン)では、転写因子がDNAにアクセスできずに標的因子の転写が抑制される。一方、DNAの巻きつきがゆるんだ領域(ユークロマチン)では、転写因子による標的遺伝子の転写が活性化される。このよう

なクロマチン状態の変化は、クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾とよばれるエピジェネティック因子により制御される。クロマチンリモデリング因子は複数の因子が会合した複合体としてATP依存的に機能し、活性化サブユニットであるATPaseの種類によって、SWI/SNF, CHRAC (ISWI), NuRD, INO80複合体に大別される(図1)。また、ヒストンのN末端はさまざまな翻訳後修飾を受けることにより、遺伝子の転写活性を正負に制御する。その他のエピジェネティクスな制御として、DNAシトシンのメチル化修飾があげ

られる。シトシンが多く含まれるCpG配列はプロモーター領域に多く存在し、メチル化修飾を受けてその下流遺伝子の発現を制御する。また、DNAメチル化はヘテロクロマチン構造への転換を促す働きもある。

## 形態形成におけるクロマチンリモデリング因子

現在までに、さまざまなクロマチンリモデリング因子のノックアウトマウスが作製されている。*Snf5*, *Srg3*,

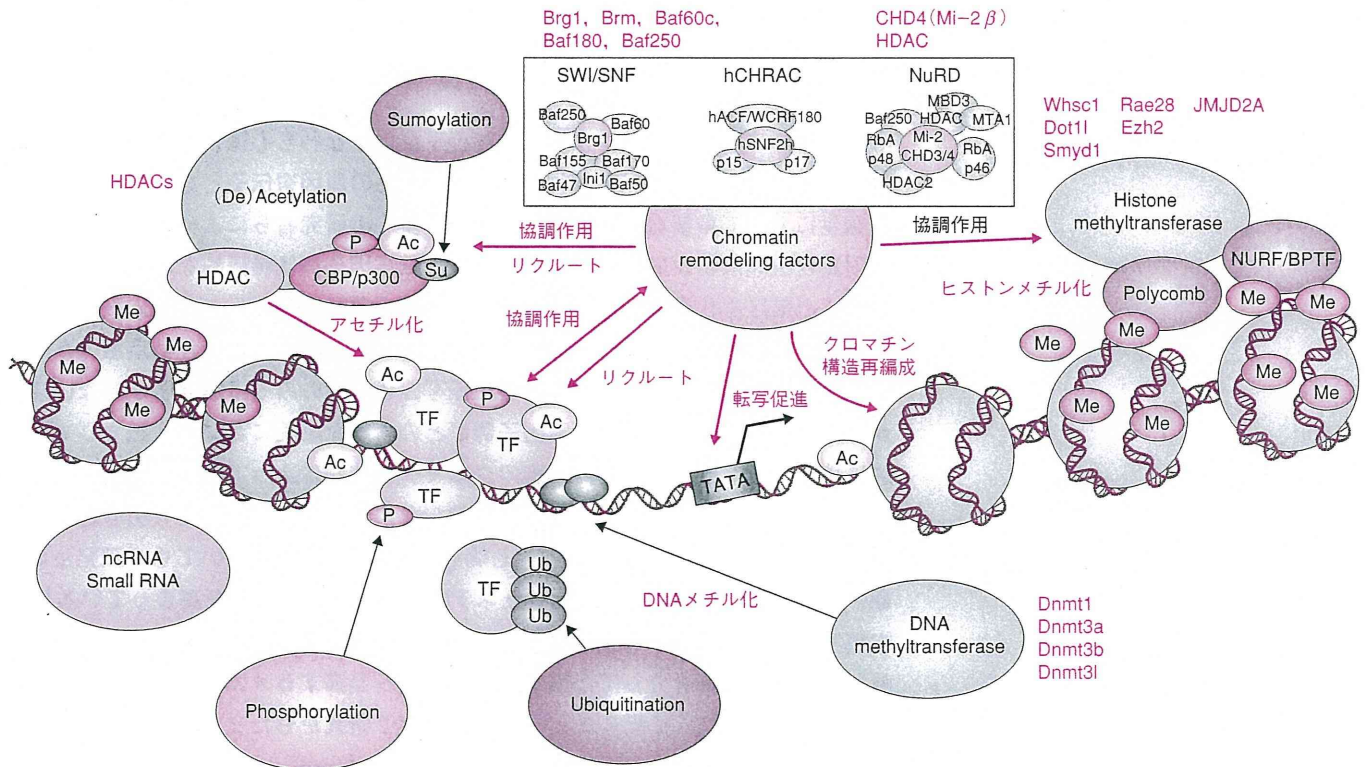


図1 心臓発生・心疾患に深く関与するエピジェネティック因子群



*Baf155*, *Brg1*ノックアウトマウスはいずれも早期致死となるため胚形成以降における機能は明らかとなっていない<sup>3-6)</sup>。また、CHRAC複合体に属する*Snf2h*は心臓や脳など組織特異的に発現するが、*Snf2h*ノックアウトマウスも早期致死となるため器官形成における機能は不明である<sup>7)</sup>。このような結果から、クロマチンリモデリング因子が初期発生に必須であることは明白だが、これら因子の組織特異的な役割については疑問視されていた。しかしながら、近年クロマチンリモデリング因子群の組織形成にかかわる新たな機能が次々と報告されている。

*Brg1*のゼブラフィッシュホモログである*young*の変異体は網膜分化が阻害される<sup>8)</sup>。*Brm*ノックアウトマウスは、細胞増殖に多少の異常が認められるが基本的には正常に発生する<sup>9)</sup>。*Brg1*と*Brm*は協調してマウス表皮とAER形成(肢芽の伸長に必須)に働いている<sup>10)</sup>。興味深いことに、*Brg1*は免疫系においては*Baf57*とともにT細胞の運命決定にかかわることから<sup>11,12)</sup>、さまざまな因子との会合が組織特異性を生み出していると考えられる。また、*Baf45A*は神経幹細胞に必須であることも報告されている<sup>13)</sup>。

Chromodomain Helicase DNA binding protein(CHD)は、DNAの二重らせんを紐解くhelicaseの一種である。CHDファミリーに属するCHD7は*Sox*の標的因子の転写活性を制御するため、*Sox*が責任遺伝子として発症する無眼球症候群患者にCHARGE症候

群様の奇形を引き起こす原因となる<sup>14)</sup>。

### 心臓発生と先天性心疾患におけるクロマチンリモデリング因子

#### (1)SWI/SNF-BAF複合体

SWI/SNF複合体は、酵母の“mating type switching and sucrose non-fermenting”変異株から単離され、ATP依存的にクロマチン状態を変化させる<sup>15)</sup>。哺乳類SWI/SNFホモログは*Brahma-related gene 1(Brg1)*と*Brm*という2つのATPaseをコア因子として、そのまわりに約10種類のBAF(Brg1/Brm associated factor)因子が取り巻いた巨大な複合体(2MDa)を形成している<sup>16)</sup>。哺乳類SWI/SNFは自身によってヌクレオソームを解いた後、転写開始点にポリメラーゼIIを引き寄せる機能が知られている<sup>17)</sup>。さらに、*Brg1*は転写因子*Gata*と直接会合し、*Gata*の下流遺伝子の発現を制御する<sup>18,19)</sup>。

#### ●Brg1/Brm

BAFサブユニットをもつSWI/SNF複合体(SWI/SNF-BAF)は、11のサブユニットのアレンジにより多様な機能を発揮する。

SWI/SNF-BAF複合体のATPaseである*Brg1*はさまざまな器官形成に関与し<sup>6,11,13,20,21)</sup>、心臓でも特異な機能をもつことがTakeuchiとBruneauらによって報告されている<sup>22)</sup>。*Brg1*のヘテロ欠損型マウスで認められる左室低形成は、*Brg1*と心臓転写因子*Tbx5*の発現量のバランスが崩れることが原

因と考えられる<sup>23)</sup>。また、Holt-Oram症候群の表現型は多岐にわたるが、その原因の1つが*Brg1*による*Tbx5*の転写活性調節であった。このようにクロマチンリモデリング因子による心臓転写因子の制御機構の解明は、心疾患の多様な表現型を紐解くテキストとなる。また、*Brg1*は胎仔期の心筋で*β-myosin heavy chain(β-MHC)*を発現させ、成体心筋においては*α-MHC*の発現を抑制する<sup>24,25)</sup>。さらに、成体心筋ではストレスに応答して発現した*Brg1*が*β-MHC*の発現を誘導することから、*Brg1*は胎仔性心筋の維持に働くと考えられる<sup>24,25)</sup>。

#### ●Baf60ファミリーメンバー

SWI/SNF複合体を形成するサブユニットには60kDaの3つのアイソフォーム*Baf60a*, *Baf60b*, *Baf60c*が存在し、それぞれ別の遺伝子(*Smarca1*, *Smarca2*, *Smarca3*)にコードされている。*Baf60c*は発生初期の心臓特異的であるが<sup>16,26)</sup>、その他のサブファミリーである*Baf60a*と*Baf60b*は初期心臓には発現しない<sup>16,27)</sup>。*Baf60c*のノックダウン胚では流出路の短縮、右室・両心房の低形成、房室管の欠損など多くの異常が認められる<sup>26,27)</sup>。このとき、動脈幹に発現する遺伝子(*Bmp4*, *Pitx2*, *Fgf10*)は一様に減少する。また、心臓転写因子*Nkx2-5*, *Tbx5*, *Gata4*の発現は維持されるが、これらの標的因子である*Nppa*, *Bmp10*, *Irx3*(肉柱形成に必須)は完全に消失する。SWI/SNF複合体は*Baf60c*依存的に*Tbx5*, *Nkx2-5*, *Gata4*と会合し、CBP/P300



とも特異的な条件下で会合する。Baf60cは心臓転写因子群とSWI/SNF複合体を架橋することにより巨大な転写複合体の要となって、特異的な下流遺伝子の発現調節にかかわっている<sup>22,28,29</sup>。Baf60cはNotchとも会合するが、この場合は心臓因子の誘導は起こらず、初期胚のノードにおいて*Nodal*の発現を制御して左右軸形成に重要な役割を担っている<sup>27</sup>。

#### ●Polybromo (Baf180)

Baf180は、SWI/SNF-PBAF複合体のサブユニットであり、核内受容体であるRXR $\gamma$ による転写活性を促す<sup>30</sup>。*Baf180*の欠損は早期致死とはならないが、RXR $\alpha$ 欠損マウスと同様に柵状構造のない薄い心筋壁が認められる<sup>31</sup>。Baf180は心外膜に発現しており、心臓形成や冠形成においてSWI/SNF-Baf60c複合体とは別個に機能すると考えられる<sup>27</sup>。

#### ●ARIDファミリーメンバー (Baf250 ; ARID1とBaf200 ; ARID2)

Baf250はBaf250a, Baf250b, Baf250cの3タイプのアリソフォームが存在し、そのなかでもBaf250aとBaf250bは胚性幹細胞特異的な複合体esBafや神経幹細胞特異的な複合体npBafの補因子として機能する。

Baf250aはマウス胎齢6.5日目に致死となることから初期発生にかかわる重要な因子であるが、心臓特異的なBAF複合体の必須因子となることから、心臓においてもなんらかの機能をもつことが予想される<sup>4,5,32</sup>。

## (2)ヌクレオソームリモデリング・ヒストン脱アセチル化(NuRD)複合体

NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase) 複合体はヒストン脱アセチル化酵素を含むことから転写抑制に働き<sup>33</sup>、初期発生においては細胞のパターンニングと分化を調節している<sup>34,35</sup>。現在までにNuRD複合体を構成するMTAサブユニットのアリソフォーム(MTA1, MTA2, MTA3)の相違から3種類のNuRD複合体が報告されている。また、この複合体はメチル化シトシン特異的に結合するMBDサブユニットを含み、複雑で強力な転写抑制複合体を形成している。NuRD複合体のコア因子であるCHDは現在までに9種類が報告されており、とりわけCHD1, CHD3 (Mi-2 $\alpha$ ), CHD4 (Mi-2 $\beta$ )は胚性幹細胞の維持に必須である<sup>32</sup>。NuRD複合体はヒストンメチル基転移酵素であるWhsc1や<sup>36</sup>、心室中隔形成にかかわる心臓転写因子*Sall4*との結合を介して<sup>37,38</sup>、心臓発生になんらかの機能を担っていることが推測される。

## 心臓におけるヒストンモディフィケーション

ヒストンは、可逆的なアセチル化、メチル化修飾や、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化、リボシル化修飾を受けてクロマチン状態を変化させ、転写活性を制御する(図1)。最近ではヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylases ;

HDACs)やヒストンアセチル基転移酵素 (histone acetyltransferases ; HATs)が心臓の遺伝子発現を制御することが明らかとなり、HDACファミリー異常による先天性心疾患との関連が注目されている。また、ヒストンのメチル化修飾も転写活性を制御する機構として重要視されている<sup>39,40</sup>。

## (1)ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs), アセチル基転移酵素 (HATs)

心臓形成において、いくつかの転写因子はHDAC依存的に機能する。例えば、SET, MYNDドメインをもつmBopはHDACに依存して*Hand2*の発現を制御し、mBopは*Irx5*と会合してHDACを誘導する<sup>41,42</sup>。serum response factor (SRF)は心臓発生の主要因子であり、HAT活性をもつTIP60と会合すると心臓特異的な転写活性を補助し、HDAC4と会合すると一転して転写抑制因子として機能する<sup>43,45</sup>。ホメオドメイン蛋白質のHopとHDAC2の複合体は、SRFとの結合を介してプロモーター上に結合し、転写を抑制する<sup>46</sup>。さらにHDAC2はGata4の脱アセチル化を促進し心筋増殖を抑制する<sup>47</sup>。HAT, p300, PCAFを誘導するTAZ因子は*Tbx5*と特異的に結合することにより*Nppa*の転写を亢進するだけでなく、YAP/TAZ複合体は $\beta$ カテニンシグナルを調節し心筋増殖を制御する<sup>48,49</sup>。

## (2)ヒストンメチル基転移酵素

Whsc1は*Nkx2-5*と結合して*Nkx2-5*

の転写活性を抑制し、一方ではヒストンH3リシン36のトリメチル化(H3K36me3)修飾により*Nkx2-5*とそのターゲット遺伝子の発現を負に制御するとも考えられている<sup>36)</sup>。ヒト、マウスにおいて*Whsc1*の変異は、*Nkx2-5*の変異と同様に心房・心室の中隔欠損が認められる<sup>36,50)</sup>。

*DOT1L*はヒストンH3K79のメチル化修飾に働く酵母*DOT1*の哺乳類ホモログであり、心臓特異的に欠損させたマウスでは心腔肥大と収縮不全、刺激伝導系の異常が認められ致死率が上昇する<sup>51)</sup>。*DOT1L*は心筋の生存に重要な*Dystrophin*の転写を制御し、拡張型心筋症の原因遺伝子となる<sup>51)</sup>。

*Smyd1*は組織特異的に発現するリシンメチル基転移酵素の一種であり、SETドメインを介したヒストンのメチル化修飾によって転写抑制に働く<sup>41)</sup>。*Smyd1*欠損マウスは、心筋未成熟による右室欠損が起これる重篤な心形成不全となる<sup>41)</sup>。ゼブラフィッシュでは、*Smyd1*が心筋収縮や筋線維の成熟に必須となることから<sup>52)</sup>、心臓発生における*Smyd1*の機能は高度に保存されている。

### (3) high mobility group (HMG)

#### 蛋白質

クロモソーム蛋白質であるHMGは、クロマチン構造変換やプロモーター/エンハンサー領域における多量の転写因子との複合体形成を介して、ターゲット遺伝子の転写を制御する<sup>53)</sup>。HMGの一種である*HMGA2*は、胎仔心臓特異

的に発現して心筋分化を促進する<sup>53)</sup>。また、*Nkx2-5*のプロモーター領域には*HMGA2*の結合領域があり、*HMGA2*はBMPにより誘導された*Smad1/4*と複合体を形成して*Nkx2-5*の転写を促進している<sup>53)</sup>。

### (4) Polycom 遺伝子群

*Rae28*は*Nkx2-5*の発現を制御し、心房心室中隔形成にかかわっている<sup>54)</sup>。*YY1*は抑制因子*Ezh2*のCarGボックスを認識して*MHCIIb*や*MCK*のプロモーター上に*Ezh2*をリクルートすることで、心筋分化を抑制すると考えられている<sup>55)</sup>。現在のところ、*in vivo*でpolycom 遺伝子群が直接的に心臓発生にかかわる記述はないが、*in vitro*においては心筋分化マーカー遺伝子である*Mlc2*、*B型natriuretic peptide*、心臓特異的*α-actin*などの発現制御にかかわるといふ興味深い報告がなされている<sup>56-58)</sup>。

### 心筋のdefined factorとしての エピジェネティック因子

*MyoD*による骨格筋の誘導や<sup>59,60)</sup>、*myocardin*による平滑筋への分化誘導の成功により<sup>61,62)</sup>、単一の転写因子が特定の細胞への分化誘導を支配する「マスター因子」となることが示された(図2)。心臓においてもさまざまな心臓主要転写因子(*Tbx5*, *Gata4*, *Nkx2-5*, *Mef2c*, *Hand1*, *Hand2*…)による検討がなされたが、単一の心臓転写因子では心筋はおろか心臓誘導さえもでき

なかった。近年、複数の「defined factors (特定因子群)」によりiPS細胞が樹立されたことがきっかけとなり、心臓においても心筋分化を促す「defined factors」の探索が進められ、心臓主要転写因子*Gata4*, *Nkx2-5*, *Tbx5*の組み合わせをもってしても心筋の分化誘導には不十分であることがわかった<sup>22,27)</sup>(表1)。驚くべきことに、スクリーニングの結果見出された心臓特異的なクロマチンリモデリング因子*Baf60c*を*Gata4*, *Tbx5*とともに強制発現させると、中胚葉性由来の側板中胚葉細胞に異所的に拍動する心臓が誘導された<sup>22,26)</sup>(図3a)。このとき、*Baf60c*によるクロマチン状態の変化が、*Gata4*, *Tbx5*による心筋トロポニン遺伝子のプロモーター領域への結合を促進させることが*in vivo* ChIP法により示された<sup>22)</sup>(図3b)。

最近では、Iedaらにより心臓の線維芽細胞から機能的な心筋へとリプログラムする因子が同定された<sup>63)</sup>(詳細は特集9「ダイレクトリプログラミングによる心筋細胞誘導法の確立と臨床応用への展望」に記載されているので参考にしてもらいたい)。興味深いことに線維芽細胞から心筋への分化転換には*Gata4*と*Tbx5*は必要であるが、*Baf60c*に代わって心臓転写因子*Mef2c*が必要であった<sup>63)</sup>。誘導された心筋のメチル化解析により、心筋遺伝子のプロモーター領域においてH3K27me3レベルが低下し、H3K4me3レベルが増加しており、具体的な因子は不明であるが、なんらかのエピジェネティクスな修飾を受けて



いると考えられる。これらの知見により、エピジェネティックな制御のもとで心臓転写因子を組み合わせたことの重要性が示された。

### エピジェネティック因子による心筋再生へのアプローチ

心疾患の高い罹患率と死亡率は全世界に共通であり、その原因として心臓の再生能が低いことがあげられる。そこで、病変部の死滅した心筋に代替する新しい心筋ソースとして、ES細胞やiPS細胞などの多能性細胞から分化させた心筋を治療に用いる試みがなさ

れている<sup>53,64,65</sup>。iPS細胞は、患者の細胞に由来するため免疫応答反応を防ぐ利点があるが<sup>66</sup>、未分化なiPS細胞の移植はテラトーマ形成の危険があるため、純粋な心筋のみを移植する必要がある<sup>67</sup>。また最近では、胎仔の心臓前駆細胞を霊長類の心臓病変部へと移植したところ、生着して心筋へと分化したことから心臓前駆細胞の有効性が示された<sup>68</sup>。しかしながら、iPS細胞の樹立・分化誘導には長期間を要すること、また心臓前駆細胞の入手は困難であることなど、医療応用への課題は多く残されている。これらの解決策として、エピジェネティック因子による心筋誘導法が大いに期待される。患者

由来の細胞からiPS細胞を介さずに直接に心筋を誘導するリプログラム因子として心筋の作製過程を大幅に短縮できる。さらに、心臓の病変部やその近傍に直接因子を導入することにより、まさに病変部で新しい心筋を再生できる可能性がある。このように、エピジェネティック因子は今後の医療応用への展開が望まれるが、その有効性や安全性については慎重に検討を進めなくてはならない。その礎として、心臓の発生学、細胞生物学などの基礎研究分野において、エピジェネティックな制御メカニズムに対する一層の理解が重要となっている。

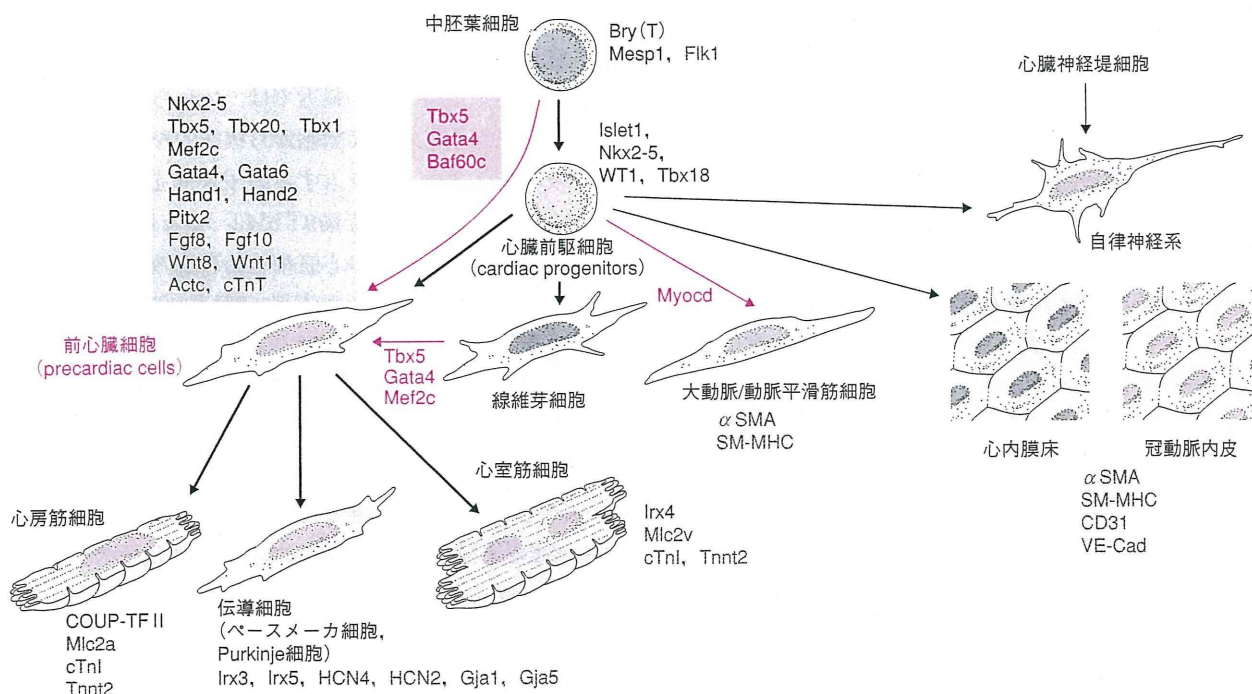


図2 心臓構成細胞と細胞種特異的な遺伝子

Tbx5	Gata4	Gata1	Nkx2-5	Baf60c	Baf60b	<i>Actc1, Myl7</i> 発現誘導	拍動誘導
+	-	-	-	-	-	×	×
-	+	-	-	-	-	×	×
-	-	+	-	-	-	×	×
+	+	-	-	-	-	×	×
+	-	+	-	-	-	×	×
-	-	-	+	-	-	×	×
+	-	-	+	-	-	×	×
-	+	-	+	-	-	×	×
+	+	-	+	-	-	×	×
-	+	-	-	+	-	○	×
-	+	-	-	-	+	○	×
-	-	+	-	+	-	○	×
-	-	+	-	-	+	×	×
+	+	-	+	+	-	○	○
+	+	-	+	+	-	○	○
+	+	-	-	+	-	○	○

表1 心筋defined factorの同定

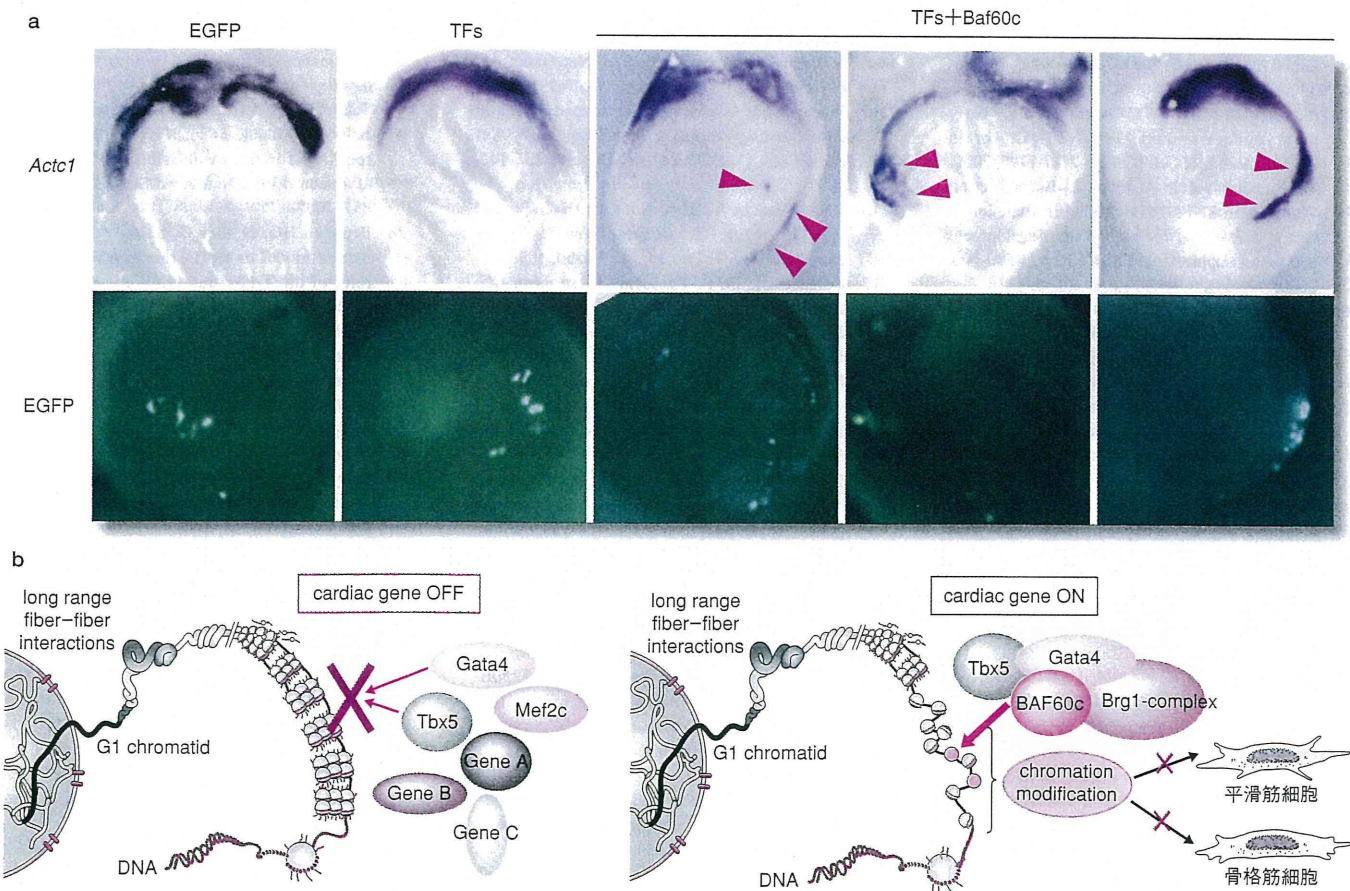


図3 心臓転写因子とBaf60cによる異所的な心筋誘導 (a) と Baf60c 依存的な心臓転写因子のリクルートメント (b)