

■ おわりに—エピジェネティクスから何を知るのか？ 不可逆を可逆化させる？

本稿では3つのことに焦点を当てて述べてきた。エピ因子は①運命決定因子として転写因子とともにふるまう、②疾患発症の際の重篤性に深く関わる、③細胞の可塑性を担う。

概念図1は国内で大ブレイクしたあるテレビドラマを筆者が海外留学時唯一の楽しみとして観ていたとき以来、2007年から講演させていただく機会がある度に使わせていただいているスライドを元としている。心地良いハーモニーは指揮者からの一方的な指揮から生まれるものではない。演奏者から指揮者へのフィードバックもある。つまり、両者が持ちつ持たれつの関係になったときに、“カンタービレ”な演奏ができるのである。

エピジェネティック因子は、組織再生=不可逆を可逆化させる大きな切り札である。将来、エピジェネティック因子を巧みに利用することで、器官再生のみならず、心筋梗塞からの心不全予防、がん化抑制、認知症抑制、炎症抑制などの効果が期待される。そのためには、われわれはまだまだ発生学を理解していかないといけないだろう。

謝辞

本概論を書くにあたって、多くの先生に支えていただいた。ときにはお叱りを受けることもあったが、それだけ各臓器・組織への理解にエピ因子が深く根をおろしていることを勉強させていただいた。古関明彦先生（理化学研究所）、小柴和子先生（東京大学）、岡田由紀先生（東京大学）には、本誌内容に関して校閲していただき深謝したい。また、各臓器形成に関わる因子に関して、以下の先生方には貴重なお時間を割いて多大な助言をいただいた。この場を借りて深く感謝したい。大川恭行先生（九州大学）、近藤寿人先生（大阪大学）、中島欽一先生（奈良先端科学技術大学院大学）、鈴木敦史先生（九州大学）、西中村隆一先生（熊本大学）、糸 昭苑先生（熊本大学）、佐藤俊朗先生（慶應義塾大学）、相賀裕美子先生（国立遺伝学研究所）、丹羽仁史先生（理化学研究所）。

文献

- 1) Harada, A. et al. : EMBO J., 31 : 2994-3007, 2012
- 2) Takeuchi, J. K. & Bruneau, B. G. : Nature, 459 : 708-711, 2009
- 3) Namihira, M. et al. : Dev. Cell, 16 : 245-255, 2009
- 4) Hirabayashi, Y. et al. : Neuron, 63 : 600-613, 2009
- 5) Román-Trufero, M. et al. : Stem Cells, 27 : 1559-1570, 2009
- 6) Zhao, Y. et al. : Nature, 436 : 214-220, 2005
- 7) Takeuchi, J. K. et al. : Nat. Commun., 2 : 187, 2011
- 8) Hang, C. T. et al. : Nature, 466 : 62-67, 2010
- 9) Takahashi, K. & Yamanaka, S. : Cell, 126 : 663-676, 2006
- 10) Ieda, M. et al. : Cell, 142 : 375-386, 2010
- 11) Sekiya, S. & Suzuki, A. : Nature, 475 : 390-393, 2011

Profile

著者プロフィール

竹内 純：1996年、東北大学理学部卒業（井出宏之名誉教授）、2000年、奈良先端科学技術大学院大学（小椋利彦；現・東北大学加齢医学研究所教授）にて博士号取得、'02～'06年、トロント小児病院、'06～'07年、UCSFグラッドストーン研究所（Benoit Bruneau 准教授）、'07～'10年、東京工業大学グローバルエッジ研究院、'10年より現職（東京大学分子細胞生物学研究所准教授）。形作りの美しさのなかにある「繊細さ」と「逞しさ」の魅力をもつ言葉で理解し、細胞・組織がもつ、またはかつてもっていた万能的な能力「可塑性と可逆性」システムの理解をめざしたい。この理解には心臓は非常に優れたモデル系の1つであろう。

心臓発生と心疾患のエピジェネティクス

クロマチンリモデリング因子・ヒストン修飾因子が織りなす複雑な臓器発生機構のモデルとして

中村 遼, 塚原由布子, 竹内 純

分子生物学を用いた心臓転写因子の理解により, 心臓発生研究や先天性心疾患研究は大いに進歩した. しかしながら, さらに転写因子のみでは説明のできない疑問, 解き明かせない部分も生じてきた. 最近の研究によって, エピジェネティック因子は時期・領域特異的に機能しているだけでなく, 特定の転写因子と協調的に作用することで細胞運命決定や細胞可塑性, 心臓特異的転写因子群が原因となる心疾患重篤化に関与していることが明らかになってきた. エピジェネティック因子こそが, 発生学と再生医学との橋渡しとなり, 両者の間にある未解決な課題を解決すると考えられる. 本稿では, 心臓発生におけるエピジェネティック因子の重要性と心疾患との関連性について最新の知見を交えて紹介したい.

キーワード ● クロマチンリモデリング, 心臓転写因子, 心疾患, ヒストン修飾, 機能性 RNA

はじめに

心臓は全身のなかで最も早期に機能しはじめる臓器であり, 胎生期より血液のポンプ機能を担っている. 側板中胚葉より誘導された心原基は, 細胞移動による心筒形成, ルーピング (屈曲形成), 区画化形成というダイナミックな形態変化を経て2心房2心室を有する心臓へと成熟していく (図1)¹⁾²⁾. この過程において, 分化誘導された心筋, 内皮細胞, 線維芽細胞を含む10種類以上の細胞群が連携して働くことにより, 心筋の緻密層や肉柱構造の形成, 中隔形成など血流制御に重要となる内部構造を構築する.

心臓特異的転写因子群 (Tbx5, Gata4, Nkx2.5, SRF など) は, 心臓の形態形成や機能獲得に中心的な役割を果たす因子群であり, それゆえヒト心疾患の責任遺伝子としても報告される. 一方, 現在までにさま

ざまなエピジェネティック因子のノックアウトマウスが作製されたが, その多くは早期致死となるため, 心臓を含めた器官形成における役割については長らく不明であった. 現在, エピジェネティック因子の形態形成における重要性や組織・細胞特異的な機能が次々と報告されているが, クロマチン因子の組織特異的な機能についてはじめて報告したのはわれわれの心臓発生における論文であろう^{3)~5)}. さらに興味深いことに, クロマチンリモデリング因子の1つであるBrg1は免疫系においてはBaf57とともにT細胞の運命決定に関わり⁶⁾, マウス表皮と肢芽形成においてはBrmと協調して働いている⁷⁾. これらの知見から, クロマチンリモデリング因子はパートナー因子の組み合わせによって機能を使い分け, 組織特異性を生み出していると考えられる. エピジェネティック因子群の発現異常が先天性心疾患・後天的なヒト疾患に酷似した現象を引き起こ

Epigenetic factors in cardiac development and diseases

Ryo Nakamura¹⁾²⁾/Yuko Tsukahara²⁾/Jun K. Takeuchi^{1)~3)}: Department of Biological Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo¹⁾/Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo²⁾/“Understanding Life by iPS Cells Technology”, PRESTO, JST³⁾ (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻¹⁾/東京大学分子細胞生物学研究所²⁾/JST さきがけ「iPS細胞と生命機能」³⁾)

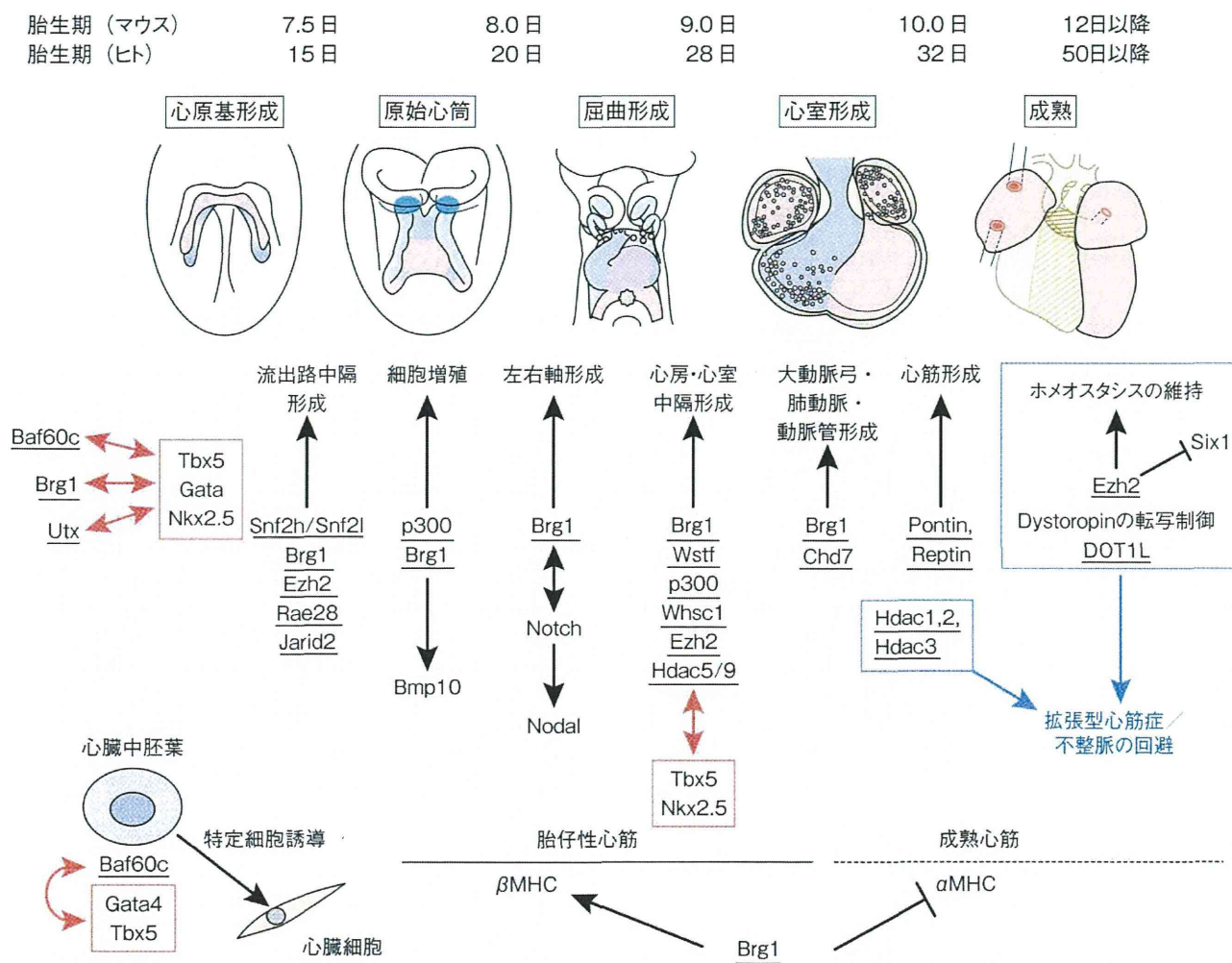


図1 マウス・ヒトの心臓発生過程・先天性心疾患に関わるクロマチンリモデリング因子・ヒストン修飾因子
心臓発生において、多くのエピジェネティック因子群(下線)がTbx5, Gata4, Nkx2.5を含む心臓特異的転写因子群(□)の制御を介し(→), 時期・領域特異的に機能する。さらに、心筋分化誘導因子や成熟後の心機能維持因子(□)として重要な役割を担う

すことも報告され、エピジェネティック因子の心臓特異的な役割、心臓発生および心疾患との関連性は非常に興味深い。

本稿でははじめに、心臓発生・心疾患におけるクロマチンリモデリング因子について解説したい。

1 心発生・心疾患におけるクロマチンリモデリング複合体

クロマチンリモデリング因子は複数の因子が会合し、ATP依存的に機能する。活性化されるATPaseの違いによって、SWI/SNF, CHRAC (ISWI), NuRD,

INO80複合体に大別され、心臓における機能が多数報告されている(表)⁸⁾。

① SWI/SNF-BAF型複合体

哺乳類のSWI/SNF複合体は少なくとも11のサブユニットから構成され、Brg1 (Brahma-related gene 1) とBrmという2つのATPaseをコア因子として、その周りに約10種類のBAF (Brg1/Brm associated factors) 因子が取り巻いた巨大な複合体を形成している⁹⁾。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Pol IIを引き寄せる機能が知られている¹⁰⁾¹¹⁾。このような機能はクロマチン構造変換複合体では共通に予想されるものであるが、さら

表 クロマチンリモデリング因子群と心臓発生・心機能

サブファミリー	因子	遺伝子改変型	表現型	コメント
大動脈・流出路の発達				
SWI/SNF	Brg1	平滑筋細胞特異的欠損マウス	1/3の割合で大動脈閉存症が発症	myocardinと相互作用し平滑筋収縮関連遺伝子を活性化
		二次心臓形成領域特異的欠損マウス	流出路・右室低形成, 胎生致死 (E10.5)	Bmp10を活性化し細胞増殖を促進
CHD	Chd7	ヘテロ型欠損マウス	動脈弓の障害	咽頭外胚葉においてTbx1と作用し動脈弓形成を制御
		ノックダウン胚 (カエル)	総動脈幹の位置異常	BRG1/PBAFと結合しSox9, Twist, Slug, 神経堤細胞を活性化
心筋発達・心臓区画化				
SWI/SNF	Brg1	内皮細胞特異的欠損マウス	肉柱低形成, 心ゼリーの消失, 胎生致死 (E10.5~11.5)	Adamts1の発現を抑制し心ゼリーの不完全な分解を阻止. 肉柱形成を促進
		心筋特異的欠損マウス	心筋層の菲薄化, 心室中隔欠損, 胎生致死 (E11.5)	Bmp10を活性化し心筋増殖を促進. Brg1/HDAC/PARP複合体がMHCアイソフォームの発現を制御
		点変異体のノックダウン胚 (ゼブラフィッシュ)	ルーピング異常, 心筋低形成, 収縮力低下	心臓発達におけるBrg1の機能はゼブラフィッシュにおいても保存されている
	Baf60c	心臓特異的欠損マウス	ルーピング異常, 両心室の低形成, 流出路の短縮, 胎生致死 (E10~11)	Baf60cは心臓転写因子と作用し多数の心臓遺伝子を制御. ルーピング形成に関してはNotchと作用し, Nodalの発現を制御
		非心臓性中胚葉における過剰発現	非心臓性中胚葉から成熟心筋への分化誘導	Tbx5, Nkx2.5, Gata4と相互作用し胎仔性遺伝子群の発現を促進
		過剰発現 (ゼブラフィッシュ胚)	心臓の肥大化	Baf60cはGataと作用し心臓関連遺伝子群を活性化
ISWI	Wstf	Wstf欠損マウス	心室・心房中隔欠損, 肉柱低形成, 大動脈縮窄	
INO80	Pontin, Reptin	Pontin ノックダウン胚 / Reptin 機能獲得型変異体胚 (ゼブラフィッシュ)	心筋過形成	PontinとReptinは拮抗的に β -catenin経路を制御し心筋増殖を統制

にBAF複合体は複合体自身の構成因子の変化と転写因子などのパートナー因子の変化により一層の機能特異性を生み出す⁸⁾. すなわち, 特定の標的因子のプロモーター上で機能することにより, SWI/SNF-BAFは組織・細胞特異的な分化や成熟に大きな影響を与えていると考えられている.

i) BAF複合体のコア因子Brg1/Brm

Brg1 (遺伝子名Smarca4)はSWI/SNF-BAF複合体のコア因子であり, さまざまな器官形成に関与し心臓でも特異な機能をもつ.

Brg1ヘテロ欠損型マウスは左心室低形成を生じる (図2A). また, 心電図の解析結果から顕著な房室結節機能異常が見受けられ (図2B)¹²⁾, この結果は, Brg1の発現量の低下が心臓病の発症に直接的に関与することを強く示唆する. Brg1は心臓転写因子Tbx5, Gata4, Nkx2.5, Tbx20とタンパク質間において相互

作用する³⁾. Brg1は種を超えて保存されており, ゼブラフィッシュにおいてもBrg1はTbx5, Gata5と相互作用することが確認されている¹³⁾. 他に, Tbx5欠損による表現型に酷似した左室低形成を伴うことから, Brg1およびTbx5の単一ヘテロマウスの表現型を比較したところ, 左室低形成がそれぞれ30~40%程度見受けられた. ところが, Brg1; Tbx5ダブルヘテロマウスでは, ほぼ100%の割合で重度な左室低形成が観察され, さらに心室中隔が完全に欠損する (図3A). 他にもクッション形成不全, 心房壁・心室壁の菲薄といったヒトの先天性心疾患に共通する重篤な表現型が認められた³⁾. これら一連の知見は, クロマチン因子Brg1の発現量の差が特定の先天性心疾患の重篤化に直結することを表している (図3B). さらに興味深いことに, Brg1とTbx5は心臓だけでなく上肢においても強く発現するが, Tbx5; Brg1ダブルヘテロマウスで

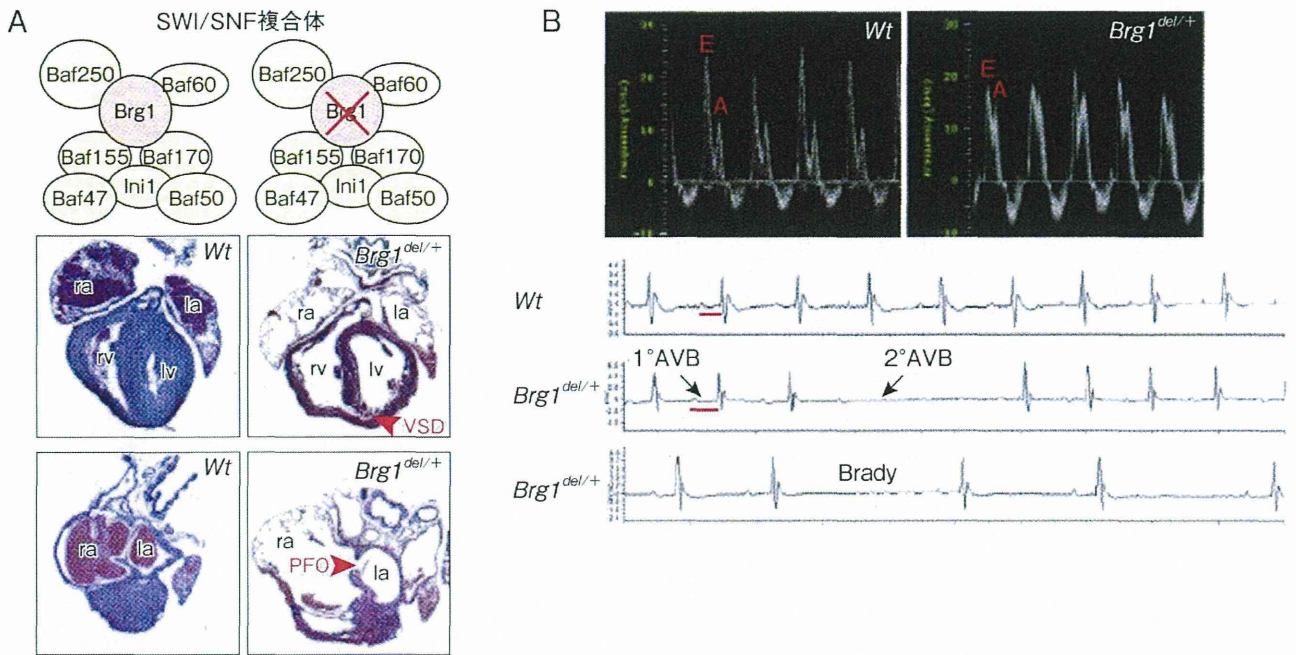


図2 クロマチンリモデリング因子Brg1の心臓における機能

A) Brg1ヘテロ欠損型マウスは、先天的左室低形成、心筋層の菲薄化、心房・心室中隔欠損を生じる。la：左心房、lv：左心室、ra：右心房、rv：右心室、VSD：心室中隔欠損、PFO：卵円孔開存（心房中隔の一部欠損）。B) Brg1ヘテロ欠損型マウスは房室結節機能異常に伴う心収縮異常と不整脈を呈す。上段：成体マウスの心エコー検査。Brg1ヘテロマウスは、E/A比率が低下し心弛緩が認められる。E：E波（左室流入拡張早期波）A：A波（心房収縮期派）。下段：心電図。Brg1ヘテロマウスはAVB、QRS波の延長（伝導遅延）、洞結節機能不全による不整脈を生じる。AVB：房室ブロック、Brady：徐脈性不整脈

は上肢異常においては心臓と異なり重篤化しない。Tbx5変異は心臓および上肢の異常をきたすヒトHolt-Oram症候群原因遺伝子であり、四肢の発生異常の重篤化においてはまた別のメカニズムが存在するのかもしれない。

また、Brg1は胎仔性心筋成熟においても重要な役割を担っている。胎仔期の心筋ではサルコメア構造の構成因子であるミオシン重鎖型が β -myosin heavy chain (β MHC, Myh7)であるが、成体心筋では α -myosin heavy chain (α MHC, Myh6)へと置き換わる。胎仔期において、Brg1はTbx5/Gata4/p300などと相互作用することにより β MHCを誘導し、 α MHCのプロモーター上ではHDACやPARPとの相互作用により α MHCの発現を抑制していることが明らかとなった¹⁴⁾。マウスやラットでは大動脈狭窄により人工的に心臓に負荷をかけることで心肥大を引き起こすことができるが、この心負荷マウスではミオシン重鎖型が α MHCから β MHCへと変化する。この“先祖帰り”と

よばれる現象も先述のBrg1/HDAC/PARPを介した α MHC抑制機構が働いていることが明らかとなった¹⁴⁾。驚くべきことに、ヒト肥大型心筋症患者の一部ではBrg1の発現量が2倍程度亢進されており、その値は疾患の重症度およびミオシン重鎖型の変化と相関することがわかった¹⁴⁾。

前述の2つの事例は、Brg1の発現量の増減が心筋症を呈することを示しており、生体心臓においてはこのバランスが精密に保たれている。

ii) Baf60ファミリーメンバー

SWI/SNF複合体を形成するBaf60サブユニットには、Baf60a、Baf60b、Baf60cの3つのアイソフォームが存在し、それぞれ別の遺伝子(Smarcd1, Smarcd2, Smarcd3)にコードされている。Baf60cは原腸形成後期、心臓前中胚葉から心臓発生初期にかけて特異的に発現する³⁾。一方、Baf60a、Baf60bは心発生初期には発現しない。Baf60cノックダウン胚は、流出路の短縮、右室・両心房の低形成、欠損など極度の奇形が生じる³⁾。

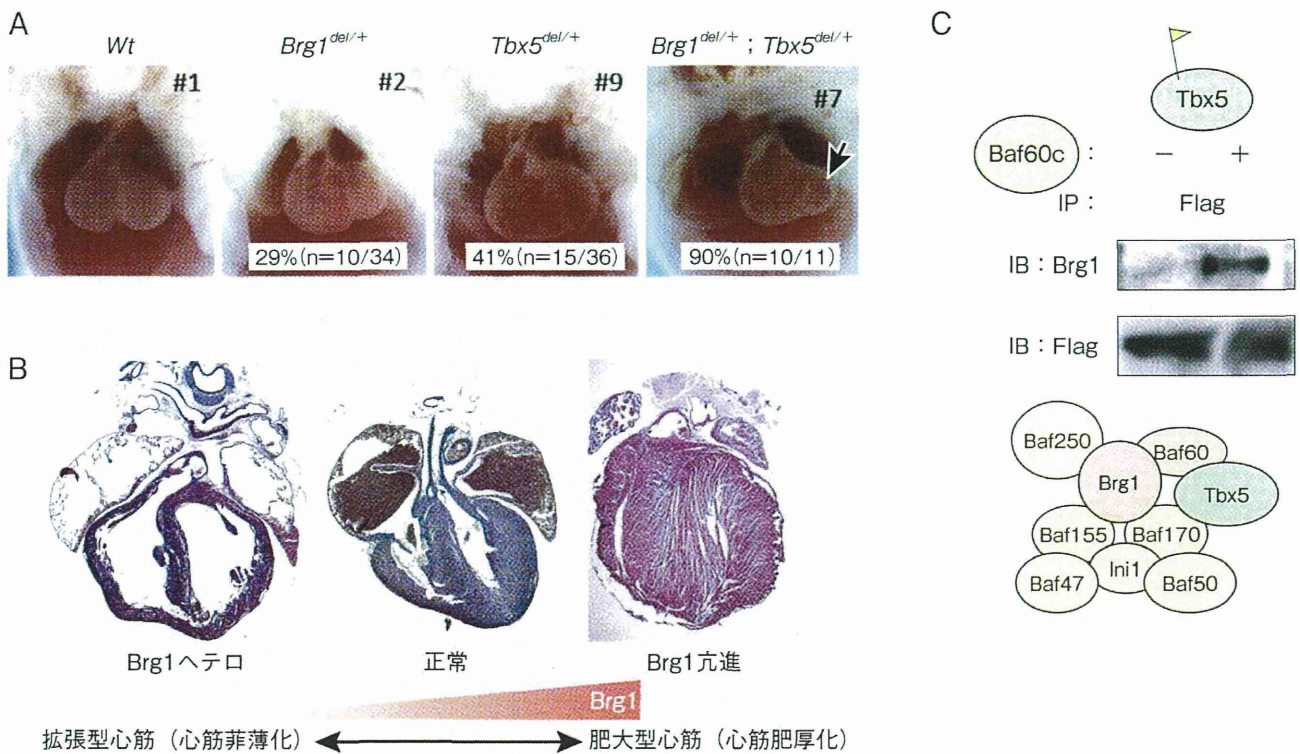


図3 先天性心疾患の重篤性にクロマチンリモデリング因子の存在が深く関わる
 A) クロマチンリモデリング因子Brg1は心臓転写因子Tbx5の機能亢進に働き、両者のダブルヘテロマウスは重篤な先天性心疾患を呈す。➤: 左室低形成。B) Brg1の発現量が、心筋形成を制御する。C) Brg1は、Baf60c存在下で心臓転写因子Tbx5と相互作用する

このとき、心臓転写因子である Tbx5, Gata4, Nkx2.5 の発現は維持されるが、これらの標的因子である Nppa, Bmp10 は完全に消失した³⁾。この理由として、われわれは心臓転写因子が Baf60c 存在下において機能しているのではないかと仮説を立て、Nppa-luc, Nkx2-5-luc を用いたプロモーターアッセイにより、Baf60c が Tbx5 や Gata4 の転写活性を促進していることを示し、クロマチンリモデリング因子の新たな機能を提唱した。さらに、Baf60c 存在下で Tbx5 と Brg1 が相互作用することも明らかとなり、クロマチンリモデリング因子は単にクロマチン構造の open/close の機能だけでなく、Tbx5, Gata4, Nkx2.5 と会合することによって標的 downstream 遺伝子の発現制御に関わる、つまり転写因子に似た機能をも、もちあわせていると考えられる (図3 C)。

Baf60c のもう 1 つの機能として左右軸の決定があげられる。Baf60c は Notch との結合を介して初期胚で Nodal の発現を制御し、心臓のルーピングなど左右軸

形成においても重要な機能を担っている¹⁵⁾。

iii) 運命決定因子としての顔をもつ Baf 因子

線維芽細胞から骨格筋細胞を誘導する bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子 MyoD や平滑筋を誘導する myocardin の発見によって、特定因子が細胞運命を制御するマスター因子となりうることを示された^{16) 17)}。心臓においてもマスター因子が存在することが期待されたが、単一の心臓転写因子のみでは心臓誘導さえも起こらず、代表的な心臓転写因子 3 因子 (Tbx5, Gata4, Nkx2.5) の組み合わせにおいても心筋誘導は起こらなかった。しかしながら、Tbx5, Gata4 とともにクロマチンリモデリング因子 Baf60c を組み合わせると、心筋遺伝子 Actc1, Myl7 の発現誘導および拍動心筋が観察された¹⁸⁾。さらに *in vivo* ChIP 解析より、導入された Baf60c がクロマチン構造を紐解き、Gata4 の心筋遺伝子プロモーター領域への結合を促進していることが示された。

現在、新たな再生医療の治療戦略として、ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞から心筋を分化誘導する試みがなされている。しかし、これらの多能性幹細胞は樹立に時間を要することや未分化な状態で移植するとテラトーマ（奇形腫）を形成してしまうこと、さらに倫理的な問題など乗り越えるべき課題が多い。そこで新たなアプローチとしてエピジェネティック因子による心筋誘導法が期待される。患者由来の細胞から心筋へとダイレクトにリプログラムし移植ソースとするほか、心臓病変部やその近傍に直接エピジェネティック因子を導入することにより、病変部に心筋を再生させる新規治療法への発展が期待される

② ISWI 複合体と心筋発達

哺乳類のISWI (Imitation-SWI) 複合体は、NURF, ACF, CHRAC, NoRC, WICHの5種類が存在し、Snf2hとSnf2lの2種類のATPaseのいずれかを含んでいる。Snf2h, Snf2lは心臓発生期に発現するが、Snf2h欠損マウスはE5.5～E7.5の間で致死となるため心形成における機能は不明であった¹⁹⁾。近年、Snf2hを含むWICH [Wstf (Williams syndrome transcription factors)-ISWI chromatin remodeling] 複合体の構成因子であるWstf欠損マウスが、大動脈縮窄、心室肉柱の低形成、心室・心房中隔欠損を発症することが報告され²⁰⁾、WICH複合体が心臓発生に重要であることが示唆された。

③ 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 (HDAC: **2****4**でも記述) と巨大なクロマチンリモデリングタンパク質であるCHD (chromatin helicase DNA-binding protein) を含み、一般には転写抑制に働くとされている。CHDファミリーは現在9種類が報告されており、Chd7はカエル胚を用いた実験より、Brg1/PBAFと結合し、Sox9, Twist, Slugの発現および神経堤細胞の活性化を制御することが報告されている²¹⁾。Chd7ヘテロ欠損マウスは動脈弓の形成阻害が認められ、Chd7は咽頭外胚葉でTbx1と作用し、動脈弓形成を制御する²²⁾。NuRD複合体は、心室中隔形成に関与する心臓転写因子Sall4²³⁾²⁴⁾と結合する。また、Sall4はH3K36me3特異的メチル基転移酵素であるWhsc1 (Wolf-Hirschhorn

syndrome candidate 1) と結合し²⁵⁾、これらの因子の変異体がヒトの先天性中隔欠損を発症することから、心臓発生において何らかの機能をもつと推測される。

④ INO80 複合体と心筋発達

INO80クロマチンリモデリング複合体はINO80, SRCAP, p400/Tip60の3種類が存在し、それぞれの複合体が、Pontin (alias Rvb1, Tip49, Tip49a) と Reptin (alias Rvb2, Tip48, Tip49b) という2つのDNAヘリカーゼを有する²⁶⁾。ゼブラフィッシュにおいてPontinのノックダウン胚およびReptinの活性化型変異体は心筋過形成が生じる。PontinとReptinは拮抗して心筋発達を制御し、その一部は β -catenin経路を介することが報告されている²⁷⁾。

2 ヒストン修飾因子と心発生・心疾患

ヒストン修飾因子にはヒストンメチル化・脱メチル化因子群とヒストンアセチル化・脱アセチル化因子群があげられる。本項では、そのなかでも心臓発生・心疾患に深く関与が報告されている因子群について概説する。

① ポリコーム群タンパク質抑制性複合体と心発生・心疾患

ポリコーム群タンパク質は2種類のポリコーム抑制性複合体PRC1, PRC2 (polycomb repressive complex-1, 2) を構成する。PRC2はヒストンメチル化酵素、Ezh1, Ezh2を含み、標的遺伝子領域においてヒストンH3K27をメチル化する。PRC1はH3K27me3を認識して結合し、ユビキチン化修飾によるクロマチン構造変換を介して遺伝子サイレンシングに働く。

哺乳類PRC1構成因子の1つ、Rae28はNkx2.5の発現を制御し、流出路の中隔形成に必須である。Rae28欠損マウスは、Fallot症候群、両大血管右室起始症、大動脈弁閉鎖を引き起こす²⁸⁾²⁹⁾。

Senp2はPRC1構成因子であるPc2/CBX4を脱SUMO化し、H3K27me3へのPRC1の結合を阻害する。Senp2欠損マウスは心内膜床の低形成、心筋層の菲薄化を生じ胎生致死となる。Senp2の減少は、SUMO化Pc2/CBX4を増加させ、プロモーター上へPRC1を集積させる。その結果、心臓発生に必須な転写因子Gata

の発現が抑制される³⁰⁾。

また、PRC2に含まれるヒストンメチル化酵素 Ezh2 を心臓発生初期に特異的に欠損させたマウスでは、心室中隔欠損、心筋緻密化障害、肉柱過形成といった先天性心臓形成異常が生じ、心臓発生における PRC2 の重要性を示唆している³¹⁾。

さらに、Ezh2 はエピジェネティックな制御により Six1 の発現を抑制している³²⁾。ホメオドメイン転写因子 Six1 は骨格筋遺伝子の発現制御に関与し、心臓においては心臓前駆細胞では発現するが心筋分化に伴って発現が低下する。Ezh2 欠損マウスでは、Six1 および胎仔期遺伝子群、線維化に関わる遺伝子群の発現抑制が解除され、さらに Six1 の下流にある骨格筋遺伝子群の発現が上昇し、成体において心筋細胞の肥大が引き起こされる。このことから、Ezh2 のヒストン修飾を介した Six1 のエピジェネティックな抑制機構は、出生後の心臓のホメオスタシスの維持に必須であり、PRC2 は先天性心疾患のみならず、成人後に発症する心臓保護においても重要な機能を担う³²⁾。

② ヒストンメチル化酵素

哺乳類 DOT1L (DOT1-like protein) は H3K79 メチル化酵素 (H3K79me_{2/3}) であり、酵母 DOT1 のホモログである (牧野・岡田の稿参照)。H3K79 メチル化に関わる酵素は DOT1L のみであり、非常に興味深い。ノックアウトマウスでは胎生致死となるが、心臓特異的に欠損させたマウスでは出生する。しかし、心腔肥大、間質性線維症の発症、心収縮不全、刺激伝導系の異常により約半数のマウスは生後 2 週間以内に突然死し、6 カ月後にはほぼ 100% の割合で死亡する。DOT1L は筋ジストロフィー責任遺伝子の 1 つである Dystrophin の転写を制御し、Dot1l 欠損型マウスでは筋ジストロフィーの症状の 1 つである拡張型心筋症と酷似した症状が認められる³³⁾。

MLL2 (mixed lineage leukemia) は H3K4 のメチル化酵素であり、心臓中隔欠損を呈する Kabuki 症候群において MLL2 の変異が原因となることが発見された³⁴⁾³⁵⁾。MLL2 のパートナー因子の 1 つ Ptip は標的遺伝子座への特異的な結合に重要であることが示唆されている。Ptip を心筋特異的に欠損させたマウスでは、成体心臓においてイオンチャネルサブユニットをコードする遺

伝子 Kcnp2 の発現が低下し不整脈を発症する³⁶⁾。

Whsc1 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1) は H3K36 メチル化酵素であり、Set2 ホモログの 1 つである。Nkx2.5; Whsc1 ダブルヘテロマウスでは、シングルヘテロマウスと比較して心房心室中隔欠損の発症率が上昇することから、Whsc1 は Nkx2.5 と連携して、H3K36 メチル化を介した標的遺伝子の発現調節により、中隔形成を制御していると推測される²⁵⁾³⁷⁾。

③ ヒストン脱メチル化酵素

i) Jumonji

Jarid2/Jumonji は JmjC ドメインをもつヒストン脱メチル化酵素で、Jumonji ファミリーの一種である。Jarid2 欠損マウスでは、心筋の肉柱過形成、両大血管右室起始症、神経管形成の欠損を生じる^{38)~40)}。同じく Jumonji ファミリーに属する Jmjd6/Ptdsr 欠損マウスにおいても心室中隔欠損、肺動脈低形成、両大血管右室起始症が認められ⁴¹⁾、これらの因子は流出路中隔形成に寄与すると考えられる。Jarid2 は心内膜で Notch1 および、その下流遺伝子である Nrg1 の発現を抑制し、心筋肉柱形成の制御に関与する⁴²⁾。また、心内膜における Brg1 と Jarid2 のバランスが、心筋肉柱形成と心内膜床形成を調節する、と推測されている。

ii) Utx/Uty

ヒストン H3K27 脱メチル化酵素 UTX は、心臓転写因子群との会合により心臓特異的因子のエンハンサー (ANF, Baf60c enhancer) に結合して領域を脱メチル化するとともに、これらのエンハンサー上への Brg1 の結合を促進することにより、心筋特異的遺伝子の発現を促進することが報告された。Uty は Y 染色体上に存在する Utx のホモログである⁴³⁾。

④ ヒストンアセチル化／脱アセチル化と心筋発達

ヒストンアセチル化酵素 p300 欠損マウスおよび点変異体は、心筋の菲薄化、肉柱低形成、心房・心室中隔欠損等を発症し、胎生致死となる⁴⁴⁾⁴⁵⁾。p300 は心臓転写因子 Gata4 のコアクチベーターとして働き、細胞増殖に必須である⁴⁶⁾⁴⁷⁾。

ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC は 4 つのサブファミリー (class I, II a, II b, IV) に分類され、そのなかでも class I に属する Hdac1, Hdac2, Hdac3, class II に属する Hdac5, Hdac9 が心臓の遺伝子発現を制御

することが報告されている。Hdac1とHdac2は相補的に機能し、両者を心筋特異的に欠損させたマウスでは形態は正常だが、不整脈、拡張型心筋症を発症し、生後2週間以内に死亡する⁴⁸⁾。Hdac1, Hdac2は胎仔性カルシウムチャンネルや骨格筋特異的収縮因子の発現を抑制する⁴⁸⁾。Hdac2/Hopは心臓転写因子SRFおよびGata4の抑制により心筋増殖を阻害する⁴⁹⁾。Hdac3を心筋特異的に欠損させたマウスでは心肥大、脂肪酸代謝の異常が生じ、生後3~4カ月で死亡する⁵⁰⁾。Hdac3は代謝関連遺伝子群プロモーター上でPPAR α の活性を阻害する。一方、過剰発現させたマウスでは心臓過形成となり、細胞周期阻害に関与する遺伝子発現が抑制されることが報告されている⁵¹⁾。Hdac5およびHdac9は心発生において相補的に働き、それぞれの欠損型マウスでは表面的な異常はみられない。しかし両欠損マウスは、多くは胎性致死となり、出生後7日目までに死亡する。心室中隔欠損が認められ、いくつかの個体は心筋層の菲薄化を生じる⁵²⁾。Hdacの減少により、心臓転写因子Mef2c, SRF, myocardin, CAMTA2の転写が促進されたことに起因すると推測されている⁵³⁾。

3 機能性RNA分子と心発生, 心疾患

① microRNA (miRNA)

近年、複数のmicroRNAが細胞分化や器官発生・機能維持の制御に重要であることが報告され、心臓においても特異な機能をもつことが多数報告されている。SRFにより誘導されるmiR-145とmiR-143は協調して平滑筋増殖に関わる転写因子群(klf4, myocardin, Elk-1)を抑制し、平滑筋細胞への分化を促進する⁵⁴⁾。また、*in vitro/in vivo*において心臓転写因子3因子(Gata4, Mef2c, Tbx5)によって線維芽細胞を心筋細胞へとリプログラムすることが報告されたが⁵⁵⁾⁵⁶⁾、miRNAにおいてもmiR-1, 133, 208, 499の組み合わせにより線維芽細胞から心筋細胞へとリプログラムできることが報告された⁵⁷⁾。

筋特異的なmiRNAであるmiR-1-2を欠損させたマ

ウスでは、心室中隔欠損、刺激伝導系や細胞分裂の異常など、多数の心臓発生異常を生じる⁵⁸⁾。成体心筋に発現する α MHC遺伝子のイントロンにコードされる心臓特異的なmiR-208は骨格筋因子の発現を抑制する一方、心臓ストレスや甲状腺機能低下に応答して β MHCの発現を亢進し、ミオシン重鎖型のスイッチングに関わることも報告されている⁵⁹⁾。

② long non-coding RNA (lncRNA)

現在、lncRNAと心臓機能に関する報告はほとんどされていない。しかし興味深いことに、Oct4やNanogなどの多能性に必須な転写因子群がlncRNAプロモーター領域へ結合することが報告され⁶⁰⁾、また、胚性幹細胞の多分化能維持に必須なlncRNAとして数十種類のlncRNAが同定されている⁶¹⁾。その1つであるRORはiPS細胞産生時特異的に高く発現するが、ノックダウンにより線維芽細胞からiPS細胞へのリプログラミングが阻害される⁶²⁾。また、エンハンサー領域のChIP-seq解析により、多数の領域でlncRNAが産生されることが報告されている^{63)~65)}。近い将来、心筋リプログラミングや心臓発生特異的エンハンサー領域におけるlncRNAの制御など、lncRNAの心臓における役割が明らかになってくるであろう。

おわりに

現在、先天性心疾患や成人における心疾患は高頻度で発症する重篤な疾患であり、再生し難い心臓において、いかにして心機能を維持・回復させるかは重要な課題である。今までのエピゲノム研究の多くは分子機構に重きが置かれ、器官形成(とりわけ構成細胞の運命決定)や疾患との関わりに着目した研究は少なかった。しかしながら、近年急速に明らかとなりつつある心発生のエピジェネティック制御機構の解明により、心疾患への理解が深まり、新たな治療法へと発展する時代となった。これらの心臓エピゲノム研究の成果が、基礎研究と臨床研究とを結び付けるモデルとして、他組織の発症メカニズムの解明においても端緒となることを期待したい。

文献

- 1) 森田唯加 ほか：血管医学, 13 : 97-113, 2012
- 2) 竹内 純 ほか：Annual Review 循環器 : 1-16, 2011
- 3) Lickert, H. et al. : Nature, 432 : 107-112, 2004
- 4) van Weerd, J. H. et al. : Cardiovasc. Res., 91 : 203-211, 2011
- 5) 塚原由布子 ほか：Heart View, 15 : 55-63, 2011
- 6) Chi, T. H. et al. : Nature, 418 : 195-199, 2002
- 7) Indra, A. K. et al. : Development, 132 : 4533-4544, 2005
- 8) Ho, L. & Crabtree, G. R. : Nature, 463 : 474-484, 2010
- 9) Wang, W. et al. : Genes Dev., 10 : 2117-2130, 1996
- 10) Martens, J. A. & Winston, F. : Curr. Opin. Genet. Dev., 13 : 136-142, 2003
- 11) Delgado-Olguín, P. et al. : Scientific World Journal, 6 : 1851-1861, 2006
- 12) Takeuchi, J. K. et al. : Nat. Commun., 2 : 187, 2011
- 13) Lou, X. et al. : Development, 138 : 3113-3123, 2011
- 14) Hang, C. T. et al. : Nature, 466 : 62-67, 2010
- 15) Takeuchi, J. K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 846-851, 2007
- 16) Davis, R. L. et al. : Cell, 51 : 987-1000, 1987
- 17) Wang, Z. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 7129-7134, 2003
- 18) Takeuchi, J. K. & Bruneau, B. G. : Nature, 459 : 708-711, 2009
- 19) Stopka, T. & Skoultschi, A. I. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 14097-14102, 2003
- 20) Yoshimura, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 9280-9285, 2009
- 21) Bajpai, R. et al. : Nature, 463 : 958-962, 2010
- 22) Randall, V. et al. : J. Clin. Invest., 119 : 3301-3310, 2009
- 23) Lu, J. et al. : PLoS One, 4 : e5577, 2009
- 24) Koshihara-Takeuchi, K. et al. : Nat. Genet., 38 : 175-183, 2006
- 25) Nimura, K. et al. : Nature, 460 : 287-291, 2009
- 26) Jónsson, Z. O. et al. : J. Biol. Chem., 276 : 16279-16288, 2001
- 27) Rottbauer, W. et al. : Cell, 111 : 661-672, 2002
- 28) Shirai, M. et al. : J. Clin. Invest., 110 : 177-184, 2002
- 29) Takihara, Y. et al. : Development, 124 : 3673-3682, 1997
- 30) Kang, X. et al. : Mol. Cell, 38 : 191-201, 2010
- 31) He, A. et al. : Circ. Res., 110 : 406-415, 2012
- 32) Delgado-Olguín, P. et al. : Nat. Genet., 44 : 343-347, 2012
- 33) Nguyen, A. T. et al. : Genes Dev., 25 : 263-274, 2011
- 34) Ng, S. B. et al. : Nat. Genet., 42 : 790-793, 2010
- 35) Digilio, M. C. et al. : Am. J. Med. Genet., 100 : 269-274, 2001
- 36) Stein, A. B. et al. : J. Clin. Invest., 121 : 2641-2650, 2011
- 37) Bergemann, A. D. et al. : Trends Genet., 21 : 188-195, 2005
- 38) Lee, Y. et al. : Circ. Res., 86 : 932-938, 2000
- 39) Jung, J. et al. : Dev. Dyn., 232 : 21-32, 2005
- 40) Takeuchi, T. et al. : Mech. Dev., 86 : 29-38, 1999
- 41) Schneider, J. E. et al. : BMC Dev. Biol., 4 : 16, 2004
- 42) Mysliwiec, M. R. et al. : J. Biol. Chem., 286 : 17193-17204, 2011
- 43) Lee, S. et al. : Dev. Cell, 22 : 25-37, 2012
- 44) Yao, T. P. et al. : Cell, 93 : 361-372, 1998
- 45) Shikama, N. et al. : EMBO J., 22 : 5175-5185, 2003
- 46) Yanazume, T. et al. : Mol. Cell. Biol., 23 : 3593-3606, 2003
- 47) Gusterson, R. J. et al. : J. Biol. Chem., 278 : 6838-6847, 2003
- 48) Montgomery, R. L. et al. : Genes Dev., 21 : 1790-1802, 2007
- 49) Trivedi, C. M. et al. : Dev. Cell, 19 : 450-459, 2010
- 50) Montgomery, R. L. et al. : J. Clin. Invest., 118 : 3588-3597, 2008
- 51) Trivedi, C. M. et al. : J. Biol. Chem., 283 : 26484-26489, 2008
- 52) Chang, S. et al. : Mol. Cell. Biol., 24 : 8467-8476, 2004
- 53) Song, K. et al. : Cell, 125 : 453-466, 2006
- 54) Cordes, K. R. et al. : Nature, 460 : 705-710, 2009
- 55) Ieda, M. et al. : Cell, 142 : 375-386, 2010
- 56) Qian, L. et al. : Nature, 485 : 593-598, 2012
- 57) Jayawardena, T. M. et al. : Circ. Res., 110 : 1465-1473, 2012
- 58) Zhao, Y. et al. : Cell, 129 : 303-317, 2007
- 59) van Rooij, E. et al. : Science, 316 : 575-579, 2007
- 60) Sheik Mohamed, J. et al. : RNA, 16 : 324-337, 2010
- 61) Guttman, M. et al. : Nature, 477 : 295-300, 2011
- 62) Loewer, S. et al. : Nat. Genet., 42 : 1113-1117, 2010
- 63) Ørom, U. A. et al. : Cell, 143 : 46-58, 2010
- 64) Kim, T. K. et al. : Nature, 465 : 182-187, 2010
- 65) Ounzain, S. et al. : Biochim. Biophys. Acta, in press (2012)

Profile

著者プロフィール

中村 遼：2011年、立教大学理学部卒業。同年4月より東京大学大学院理学系研究科へ入学。現在修士2年。エピゲノム研究と心臓発生研究の奥深さに魅せられ、心臓における新規のエピゲノム制御機構を解明したい、と考えている。バイオリン、パイプオルガンを弾ける週末が最高なリフレッシュ日。

塚原由布子：2005年、東京理科大学薬学部卒業。11年、東京大学大学院理学系研究科（宮島 篤教授）にて学位取得。同年より、東京大学分子細胞生物学研究所にて特任研究員として勤務。心臓細胞の運命決定に関わる特定因子の探索と、その制御メカニズムの解明をめざしています。娘と研究者の夫に励まされ、奮闘しつつも楽しく研究しています。