

201307002B

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～25年度 総合研究報告書

研究代表者 竹内 純

平成26(2014)年 5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～25年度 総合研究報告書

研究代表者 竹内 純

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	20
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（総合）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. 総合研究報告書

【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、オーストラリアBAKER IDI心臓外科Kaye D. 教授との共同研究により開始され、ヒト心不全患者からの遺伝子プロファイルの作成を行い、このプロファイルから3年間で3つの研究結果と発展性のある知見を得た。

①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および結合因子(12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してきた。その一つ、クロマチン構造変換遺伝子BRG1の遺伝子破壊マウスを作製したところ、拡張型心筋症および不整脈を発症することが明らかとなった (van Weerd, Koshiba-Takeuchi et al., *Cardiovas. Res.* 2011; Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。アンドロゲンレセプター結合因子であるARIP4においては遺伝子破壊マウスを作成したところ、男性優位で発症する心筋緻密化障害を呈する心疾患マウスを得た。同時に発現変化する非コードRNAが単離された（堀ら エピジェネティクスキーワード辞典2013）。②上記因子において心筋再生能および心機能向上に寄与する因子の一つとしてクロマチン構造変換複合体の補因子であるBAF60Cの同定に至った。心筋切除法を用いて心筋再生時に亢進する遺伝子の探索を行ったところ、心筋切除後1日後以内の心筋再生時にBAF60Cの発現が亢進した。siRNA法を用いてBAF60Cの機能阻害を行ったところ、心筋再生を阻害することが本研究により明らかとなった。さらに、BAF60Cの機能を阻害するRNA分子が心筋成熟に伴って亢進すること、ヒストン脱アセチル化因子であるHDACが心筋再生能を阻害する結果も得た。③都立健康長寿研豊田雅士室長および京都府立医大循環器内科五條理志教授と共同研究を開始し、心不全患者のプロファイルを年齢・性別で再解析し女性優位で変化するRNAの単離に至った。

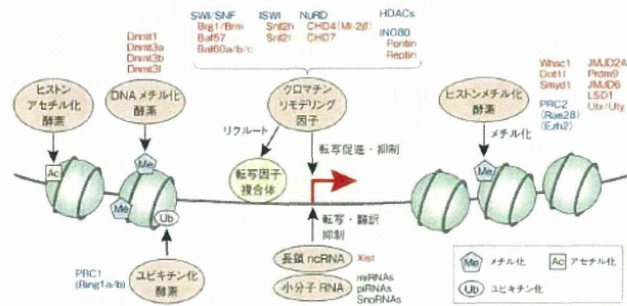
本研究結果は、心臓における代謝が損なわれると特異的クロマチン構造も変化することを示しただけでなく、これらの遺伝子を効率良く利用することにより、心筋再生や心機能向上が期待されることを見いだした (Nakamura, Koshiba-Takeuchi et al., *in preparation* 2014)。本研究において単離されたRNA群はヒト後天的な心肥大、心筋症モデルマウスや不整脈モデルマウスとなるだけでなく、創薬標的としての可能性が高く、今後RNA群の機能解析において研究を展開していく。

研究分担者：塚原 由布子（東京大学分子細胞生物学研究所・特任研究員）

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）

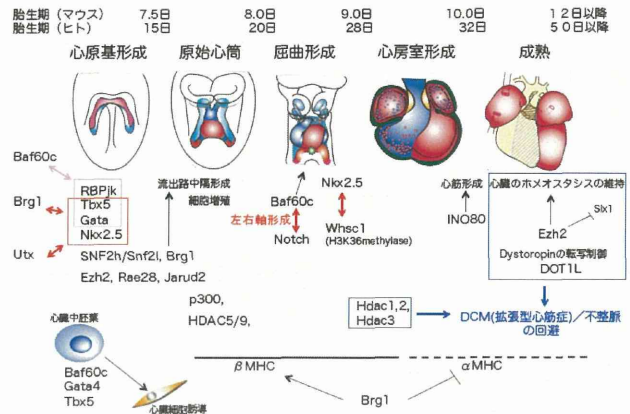
【A. 研究目的】

心臓には恒常性を維持するメカニズムが存在し、生理的な性質を保持している。しかし、そのバランスが崩れると心筋は次第に異常をきたし、拡張型/肥大型心筋症などの病態、細胞壊死などの疾病を生み、心不全に至る。この心疾患の原因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。申請者はヒト先天性心疾患患者の研究を元に、心疾患を重篤化するエピジェネティック因子群の単離を目指してきた(図1)。その過程でエピジェネティック因子群に属するクロマチン構造変換を引き起こす SWI/SNF クロマチン構造変換因子が心疾患発症に深く関与することを見だし、そのモデルマウス作製し研究を行ってきた(表1・Takeuchi&Bruneau. *Nature*2009; Takeuchi et al., *PNAS* 2008; Lickert, Takeuchi et al., *Nature* 2004)。



(図1) エピジェネティック因子による遺伝子発現・翻訳制御 (竹内純 企画・編集「発生のエピジェネティクス」: 2012 11月号より改)

心肥大関連因子は国内外において報告が有るが、多くが転写制御因子の遺伝子破壊研究である (Zhang et al. *Cell* 2002; Ropero et al. *Nature Genetics* 2006; Trivedi et al. *Nature Medicine* 2007; Ago et al. *Cell* 2008; Haberland&Olson. *Nature Review Genetics* 2009)。唯一、ヒストン脱アセチル化因子 HDAC の遺伝子破壊マウスの記載はあるが、先天的な遺伝子破壊であること、発現亢進させた際における心臓への影響を知る直接的な証拠はない。つまり、肥大化回復に着眼した報告は乏しい。非遺伝性による心疾患についてクロマチン、ヒストン変換複合体の機能や発現レベルを調べていくことによって、心肥大、心筋梗塞発症を未然に防ぐ遺伝子マーカーとなり得る可能性があると考えられる。特に、非コード RNA に関しては期待が大きい。これら一連の結果から、エピジェネティック因子群はその作用機序が限定されていることが明らかとなってきた (図2)。よって、以上の結果から未同定かつ未解明なエピジェネティック因子の心疾患発症時における発現



(図2) マウス・ヒトの心臓発生過程および先天性心疾患におけるクロマチン構造変換因子・ヒストン修飾因子群 (中村遼、塚原由布子、竹内純「発生のエピジェネティクス」: 2012 11月号より改)

	subfamily factor	Gene modification	Phenotype
血管発生・血管新生	SWI/SNF Brg1	内皮細胞特異的欠損マウス	網膜血管の増進、肉柱低形成、胎生致死E10.5-11.5
	Baf180	生殖細胞系列欠損マウス	冠血管・心筋の異常、胎生致死E12.5-15.5
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	約35%の割合で大動脈閉塞が発症
		二次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
	GHD Chd7	ヘテロ欠損マウス	動脈弓の閉塞、ノックダウン胚(ゼブラフィッシュ)
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、心ゼリー消失、胎生致死E10.5-11.5
		心筋特異的欠損マウス	心筋層の低形成、心室中間欠損、胎生致死E11.5
		二次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
	Baf45c	過剰発現(ゼブラフィッシュ)	ルーベック異常、心筋低形成、収縮力低下
	Baf45c	ノックダウン胚(ゼブラフィッシュ)	ルーベック異常、収縮力低下、筋繊維の閉塞
	Baf60c	心臓特異的欠損マウス	ルーベック異常、心室低形成、流出路の短縮、胎生致死E10-11
	Baf60c	非心臓性中胚葉における過剰発現(ゼブラフィッシュ胚)	非心臓性中胚葉から成熟心筋への分化を誘導
	Baf180	生殖細胞系列欠損マウス	心室低形成、心室中間欠損、冠血管欠損、胎生致死E12.5-15.5
	Foxm1, Reptin, Ino80	ノックダウン胚/過剰発現胚(ゼブラフィッシュ)	心筋形成

(表1) クロマチン構造変換因子群は心臓形成・発達に重要である。クロマチン因子の変異または遺伝子破壊は心臓形成異常を伴う。

プロファイルを作成することにより、創薬研究への発展やエピジェネティック因子の機能の統括的な理解が可能となり、この研究結果が心機能向上へ向けた新たなアプローチとして有用であると期待される。

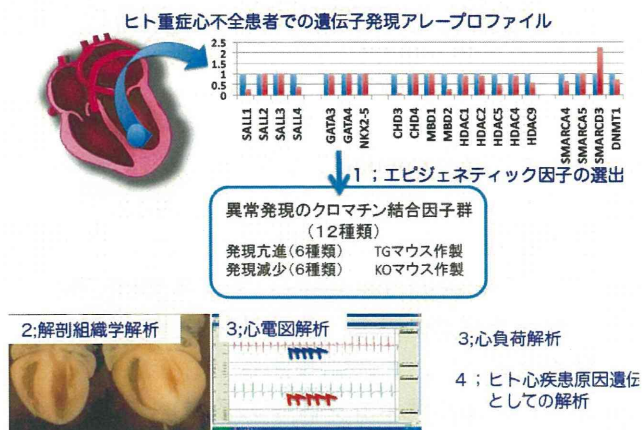
本研究は、ヒト心不全患者の心臓生検からの遺伝子発現プロファイルを作成し、そのバイオインフォマティクス解析から不整脈、心肥大を引き起こす可能性のあるエピジェネティック因子の特定とその作用機序を明らかにすることである。そのために3つのテーマを掲げて取り組む。①ヒト心不全患者において発現変化しているヒトエピジェネティック因子の発現プロファイルを作製しゲノム領域を特定化する。その中から、②候補因子の遺伝子破壊マウスまたは遺伝子過剰発現マウスを作製し、心負荷実験及び心筋梗塞を発症させ、組織学解析と生理学評価を行う。③抑制因子または心機能向上因子となり得る小分子の探索及び合成を目指す。本研究終了までには広く研究者、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のみを目的とせず、最終的には心筋症発症・心不全発症抑制因子の単離とともに、心筋再生・心機能向上を目指す。

【B. 研究方法】

1：ヒト心不全患者でのRNAシーケンスおよびmicroRNAアレイを用いた遺伝子発現プロファイルとゲノム制御領域変化

D.Kaye博士(BAKER IDI心臓外科教授)との共同研究により、健常者と心不全患者の各5人の心臓生検から遺伝子発現アレイを行い、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3)。心不全患者心筋の指標となるNppa/Nppb/STATの発現が亢進し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3内の1)。さらに創薬を目指すためにmicroRNAアレイおよびRNAシーケンスを用いた非コードRNA分子の選出も目指す。



(図3) マイクロアレイによるエピジェネティック因子の選出と遺伝子破壊マウスを用いた表現型解析方法。

2：遺伝子破壊マウスを用いた表現型解析

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(TAC/MIによる機能評価も含む)、④ヒト疾患責任遺伝子としての探索、を行う(上図3内の1~4)。

3：心筋再生と心機能向上を目指したアプローチ

上記候補因子から選出された心疾患発症因子または心機能向上因子の同定のために、各因子の解析を行い、特許登録を行なう。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を探索する。

4：性別・年齢に基づいたバイオインフォマティクス解析系の改良

都立健康長寿研究センター豊田雅士室長と京都府立医大循環器内科学五條理志教授との共同研究で2000体の心不全患者から既往歴、性別、年齢ごとにグループ分け(①60-69歳台、②70-79歳台、③80-89歳台、④90歳以上、⑤59歳以下)、それぞれ性別ごとにRNAシーケンスとmicroRNAアレイを行い、発現変化する遺伝子およびRNAの単離を行う。バイオインフォマティクス解析から心不全亢進および抑制に関与する候補因子を選別する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては東京大学分子細胞生物学研究所動物実験施設の規定に従い、審査を受け承認された実験計画に基づき動物の愛護および管理に関する法律(研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針など)を遵守して行った。組換えDNA実験においても施設の審査を受け承認された実験計画に基づき、法令などを遵守して適正に行った。現在のところ、同実験内容は申請者所属機関において既に承認済みであり、同所属機関生物実験施設において実験を行っている。また、ヒト胚性幹細胞を扱う予定は無い。ヒトサンプル取り扱いに関しては、共同研究先に委託する。

【C. 研究結果】

1：ヒト心不全患者でのmRNAアレイを用いた遺伝子発現プロファイルと候補遺伝子の単離

アレイプロファイルからHeatMapを作成し、3検体にて共通に変化する遺伝子の単離を行った(下図4)。

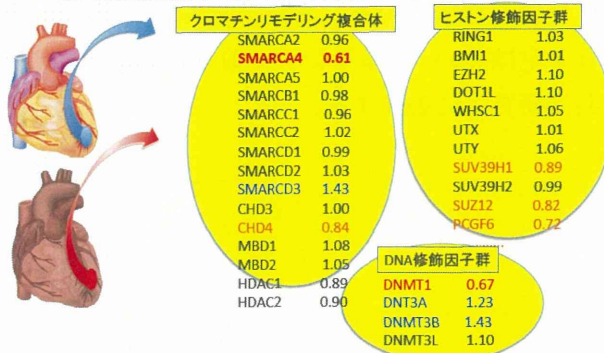


(図4) 左から順に疾患サンプル3検体である。緑が健常サンプルに比べて発現量が上昇した遺伝子、赤が発現量の低下が見られた遺伝子である。

遺伝子発現アレイの結果、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5では9種類：赤が顕著に減少、青が亢進した遺伝子群である)。本検体は男性のみの遺伝子ファイルであったため、4ではさらに詳細な解析を行うことにした(4章参照)。

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

ヒト心筋生検におけるエピジェネティック因子の遺伝子発現比較



(図5) 遺伝子アレイから発現変化を伴ったエピジェネティック遺伝子群

2：遺伝子破壊マウスを用いた表現型解析

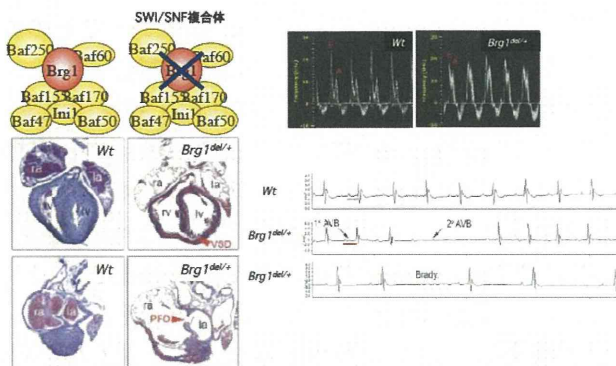
上述した結果1で単離されたエピジェネティック遺伝子について遺伝子破壊マウス作出および強制発現解析を行った。結果1で作成されたプロファイルを基に、本研究は心不全発症を亢進させる可能性のあるエピジェネティック因子として、

①SWI/SNF-BAF クロマチンリモデリング複合体(特にSmarca4(Brg1)とSmardc3(BAF60C)、②DNAメチル化関連因子(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、標的遺伝子の同定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。

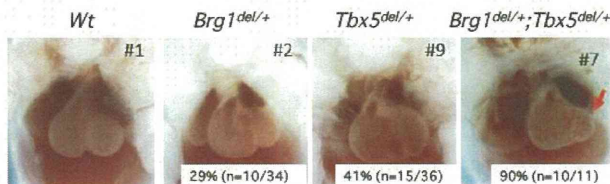
①SWI/SNF-BAF複合体

①-1：SMARCA4(BRG1)遺伝子破壊マウスの表現型とヒト疾患モデルとしての発展性

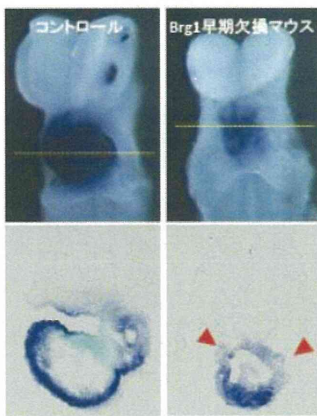
先天性心疾患発症にはクロマチン因子の発現レベルが重要である。クロマチン構造変換複合体コアタンパクSmarca4(Brg1)は心不全患者で40%減少している。この意味を理解する為にBrg1flox/floxマウスとEIIAcreマウスと交配し、Brg1del/+ (Brg1欠損)マウスを作製した。Brg1del/+マウスは拡張型心筋症の発症のみならず、不整脈と洞房機能不全を呈していた(図6：Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。さらに興味深いことに、Brg1del/+マウスの30%程度において左室低形成が見受けられ、心臓転写因子TBX5の異常によるヒトHolt-Oram症候群と酷似した表現型を呈することも明らかとなった。Brg1del/+マウスとTbx5del/+マウスを交配して得られたダブルヘテロ(Brg1del/+;Tbx5del/+)マウスでは90%(10/11)の割合で左室低形成かつ胚性12.5日前後で致死となる(図7)。この結果から、心疾患責任遺伝子とエピジェネティック因子の協調的な作用によって心疾患が重篤化していることが世界で初めて明らかとなった(van Weerd, Koshiba-Takeuchi et al., *Cardiovas. Res.* 2011; 中村ら *実験医学* 2012)。つぎに、BRG1が心筋分化維持にどのように作用しているのか理解するために、MESP1creマウスを用いて心筋分化誘導時に中胚葉特異的にBRG1遺伝子破壊(BRG1 KO)させた。その結果、心筋分化が重度に抑制されていた(図8)。この結果を詳細に分析したところ、心臓前駆細胞の増殖と維持に関わるWNTシグナル・TBX1の発現消失が伴っており、心臓発生においてBRG1の機能は、心臓前駆細胞維持・心筋分化促進の大きく二つの制御を担っている可能性が示唆された(図9：Tsukahara, Koshiba-Takeuchi et al., in preparation)。



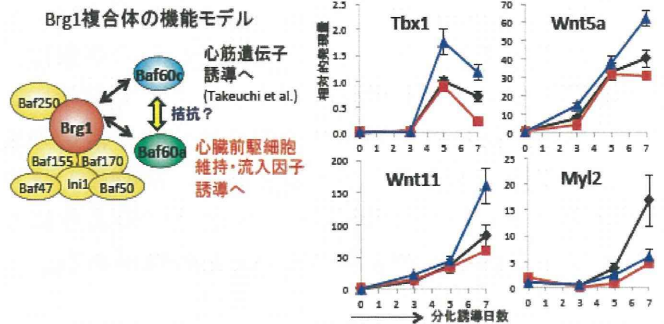
(図6) クロマチン構造変換因子は通常複合体を形成しており、そのコア因子がBRG1である。BRG1遺伝子破壊マウスでは心室壁が腠薄した拡張型心筋症様の表現型を呈し(図6左)、ヘテロマウスでも左室収縮異常(図6右上)と不整脈(図6右下)のような心機能に異常を伴う。



(図7) 心疾患の重篤化。BRG1ヘテロマウスとTBX5ヘテロマウスを交配しダブルヘテロマウスを作製すると、90%以上の割合で左室低形成(左室の縮小化: 図7中の各々の写真中央が心臓。向かって右側が将来左室(左心室)となる)が発症する。先天性疾患の重篤化の発生メカニズムを理解するモデルの一つと成り得る。



(図8) Brg1KOマウスでのMyl2mRNAの発現変化。In situ hybridization法を用いることでmRNAの発現を可視化することが可能である。コントロール胚で、濃青で染色されている部分がMyl2mRNAが転写されている領域であり、心臓形成域と一致する。Brg1KOマウスでは重度にMyl2mRNAの発現が抑制されており、切片(図8下段: 赤色矢じり)を作成すると全体的に発現が減少しているだけでなく、心臓背側域では完全に発現が抑制されていた。



(図9) BRG1KDにより心臓前駆細胞の増殖にかかわるWNTシグナルの発現が減少する。このことにより、心臓前駆細胞は上手く増殖されずに心筋分化へと移行する。

以上BRG1に関わる結果から、クロマチン因子BRG1の発現量によって心臓疾患が生じることが明らかとなった。

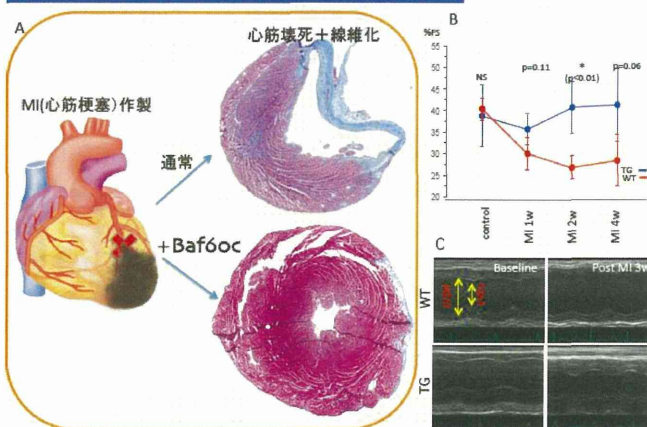
後天的にBRG1を遺伝子破壊できるBRG1^{flf}, MCM KO (Brg1^{flox/flox};aMHC-merCremer) マウスを作製中である。

①-2: SMARCD3(BAF60C)恒常的発現マウスの表現型とヒト疾患モデルとしての発展性

クロマチンリモデリング複合体の補因子であるBAF60CのKOマウスは胚性致死となる(Lickert, Takeuchi et al., *Nature* 2004)。本研究項目では、ヒト心不全患者でのプロファイルからBAF60Cの発現が若干亢進したことから、BAF60Cを恒常的に発現するトランスジェニック (BAF-TG) マウスを作製した。BAF-TGマウスでは、胎児性遺伝子発現が亢進し、増殖心筋を示す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。興味深いことに、このTGマウスではMI(心筋梗塞)後の線維化が抑制され、機能心筋に覆われていた(図10A)。さらに、毎週心エコー解析を行うと、BAF-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(図10B,C)。BAF-TGマウスの心室では心トロポニンなど胎児期遺伝子の発現が亢進していたことから、このプロモーター領域でChIP解析を行ったところ、Brg1を含むSWI/SNF複合体が結合していることが明らかとなった。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変化が生じていることが明らかとなった。さらに結果3にて後述するが、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陽性細胞が再生

直後の12時間以内は見受けられ、心筋再生完了時には消失することが分かった。これらの事象は、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ことが示唆された。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10) A: 左室下大動脈狭窄により左室心筋梗塞を発症させると4週後には左室内にて重度の線維化症状が見受けられる(青染色部分)。B: 時系列心エコーの結果。縦軸が収縮度(FS)で、正常マウスならば40~43%あたり(NS)が、心筋梗塞を発症させると4週間後には25%程度まで低下する(赤)。その後、左室の収縮度が次第に減少しポンプとしての機能を失うが、BAF-TGマウスにおいては、心筋梗塞後1週間目に一時的に低下するが、その後正常値へと回復する(青)。

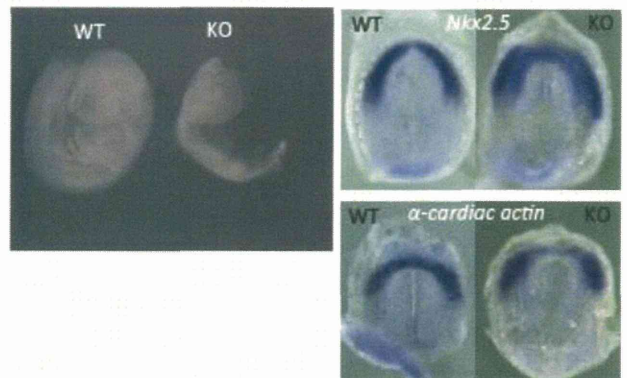
②DNAメチル化関連因子(Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、Ring1a/b)および遺伝子破壊マウスの表現型解析と発展

現時点で、Dnmt1、Dnmt3a/b、Ring1a/b、遺伝子破壊(KO)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に関しては各KOマウスなら生存する。Dnmt3a KO、またはDnmt3b KOで心電図計測を行うと同時に、ダブルKOマウスの作製を目指した。Ring1a/bダブルKOマウスは胎生9.5日前後に致死である。

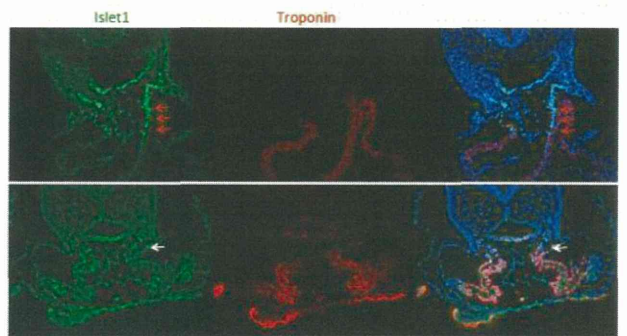
②-1: DNMT1

脱メチル化酵素であるDnmt1の遺伝子破壊マウスを作製したところ、胎生9.0日以前に致死となることが明らかとなった(図11)。心臓形成においても重度の異常が見受けられ、心筒形成以後

が形成されなかった。心臓初期マーカーでその原因を調べたところ、Nkx2-5およびα型心アクチンの発現領域が正常胚(WT)に比べて拡大していた(図11右)。拡大している領域は通常、心臓前駆細胞と呼ばれる未分化な細胞が多く存在する領域であり、この領域では未分化細胞マーカーIslet1やTbx1が発現することで心筋分化を抑制している。しかしながら、Dnmt1胚ではIslet1の発現が消失し(図12緑色:赤矢印)、未分化細胞が十分に増殖せずに分化した結果、心筋マーカー遺伝子であるα型心アクチンの発現が拡大したものと考えられる(図12赤色:白矢印)。



(図11)左: Dnmt1KOマウスの形態。右: 心筋分化初期マーカーであるNkx2-5とα型心アクチンのmRNA発現亢進および発現領域の拡大が見受けられる(濃青が各々のmRNAの発現領域。in situ hybridization法により染色)



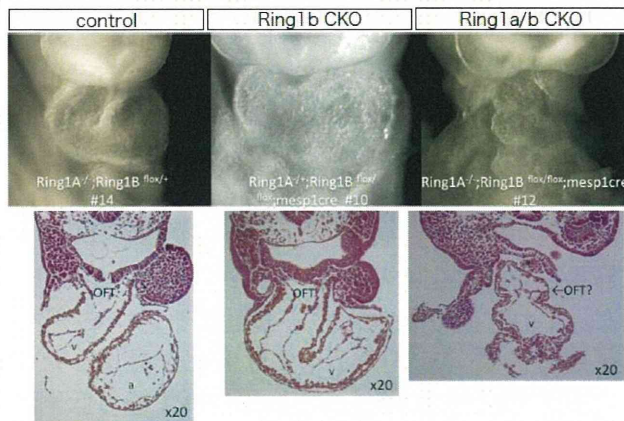
(図12)免疫組織化学を用いた心臓前駆細胞マーカーIslet1と心筋マーカー心トロポニンの共染色による発現領域変化。上段左:正常胚ではIslet1(緑色:赤矢印)の発現が心臓流出路にて確認されるが、下段左: Dnmt1 KO胚ではIslet1の発現が見受けられない(白矢印)。正常胚では、心筋分化マーカーである心トロポニンIslet1の発現は拮抗するため、両者の発現は一致しない。(図右上:赤矢印)。しかしながら、KO胚ではIslet1の発現が消失することから流出路まで心トロポニンの発現が拡大する(図右下:白矢印)。

②-2 : RING1A/B

PolycombグループのPRC1複合体の中心に位置するRing1について遺伝子破壊マウスを作製し、心臓形成における作用機序を調べた。Ring1b KOでは軽度の流出路異常を伴う(図13)。Ring1a/bのダブルKOマウス(Ring1a/b DKO)を作製したところ、重度の心臓形成異常となることが分かった(図14)。



(図13) Ring1bKOマウスの表現型。軽度の流出路形成異常を伴う。

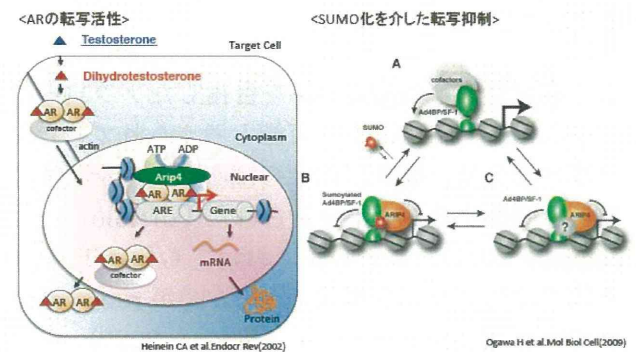


(図14) Ring1a/b DKOマウスの表現型(右)。重度の流出路形成異常を伴う。Dnmt1KOマウスと表現型が酷似している。

③ : ヒト心筋症モデルとしてARIP4KOマウスの解析

前述のプロファイルからARIP4遺伝子が単離された。ARIP4(Androgen receptor interacting protein 4/Rad54l2/Snf2l)は男性ホルモンアンドロゲン受容体ARの補因子として標的遺伝子の発現調節を行うことが報告されている(図15)が、心臓での機能は報告されていない。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 表現型と酷似する結果を得た

(図16)。興味深いことに、♂KOマウスでの表現型に比べて♀KOマウスでは異常個体が少なく、表現型も軽度である。ARIP4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。ヒト心疾患の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所市田藤子准教授、シンシナティ小児病院Towbin教授と共同研究開始)。また、ARIP4タンパク質は心筋サルコメアにおいても存在することを発見し、サルコメア蛋白と協調的に作用し心筋収縮異常を引き起こす可能性が考えられる(図17:大阪大学生命機能研究科小川英知博士研究員との共同研究)。ヒト心筋症はサルコメア因子の変異によってもたらされるものが多く、ARIP4はこれらの因子の調節に関わっているとも考えられる。その中の一つ、Actc1遺伝子において直接転写を活性化しているのか調べるために、Actc1のプロモーター領域とエンハンサー領域を用いたLucアッセイ法を用いて解析を行った。Lucアッセイの結果、ARIP4は心臓転写因子TBX5およびNKX2-5の存在下でActc1のプロモーター・エンハンサーを相乗的に活性化することが示された。ARIP4は心筋症発症の重篤化のみならず、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。



(図15) 精巣での解析では、ARIP4は核内に局在し、ARと相互作用し、標的遺伝子の転写活性を亢進していることが報告されている。またARIP4はSUMO因子と結合することで生殖腺形成転写因子Ad4BP/Sf-1と結合し、転写抑制の機能を持つ。しかし、心臓におけるARIP4の機能は全く未解明である。