

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 竹内 純

平成25(2013)年 5月

目 次

. 総括研究報告		
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
. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	18
. 研究成果の刊行物・別刷	-----	19

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（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）

・総括研究報告書

【研究要旨】

本研究はヒト心不全患者左室心筋生検をもとにした遺伝子発現プロファイルから、心不全発症の可能性のあるエピジェネティック因子の遺伝子改変マウスを作製し、ヒト疾患原因の解明につながるモデルマウスの解析を行ってきた。その結果、心臓発生過程において、重篤な奇形を生じた遺伝子改変マウスの中から、3つの事象について結果をまとめた。さらに、一つの発展的な試みと、エピジェネティック研究についての最近の研究を編集した。

SWI/SNF-BAF クロマチンリモデリング複合体：SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体のコア因子Brg1の発現減少または消失が拡張型心筋症・不整脈発症に重要な意味をもっており、心特異的なクロマチン因子が先天性心疾患の重篤性に深く関与している事を世界で初めて報告した(Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。Baf60c恒常的発現(TG)マウスでは、MI(心筋梗塞)後の線維化が抑制され、機能心筋で回復しており心不全が抑制されていた(論文投稿中2013; van Weerd, Koshiba-Takeuchi et al., *Cardiovas. Res.* 2011)。このことから心筋再生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。

DNAメチル化因子・ヒストンメチル化因子：ヒト心不全患者ではDNAメチル化因子Dnmt1の発現が減少していたことから、心負荷マウスを用いてDnmt1/3a/3bの発現変化を時系列的に解析してきた。さらに、それぞれの遺伝子破壊(KO)マウスを作製したところ、Dnmt1KOマウスでは心筋分化亢進が見受けられ、Dnmt3aKOマウスでは心エコー解析の結果、心室筋収縮異常が確認された(投稿準備中)。

男性ホルモン受容体結合因子：アンドロゲン受容体との結合能を有するARIP4が心不全の発現プロファイルから単離された。Arip4遺伝子破壊マウスを作製したところ、心筋がスポンジ状態を呈する左室緻密化障害を発症している事が分かった。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。

性差・年齢特異的な心不全解析系の構築：non-codingRNAを含めた心疾患の新規リスク因子の同定と本研究の信頼性向上のため、国内における心不全患者からの遺伝子発現プロファイルの作成を目指した。H25年度に解析可能となるように、研究チームを構築した。

エピジェネティック研究本の出版：研究代表者が企画・編集を行い、近年のエピジェネティック研究についての総説集を出版した(竹内純 編：実験医学 11月号 2012)。

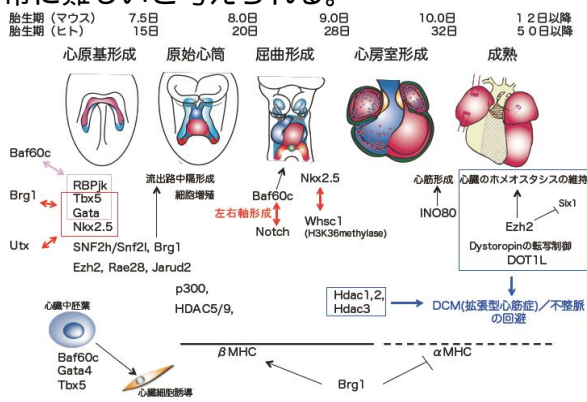
研究分担者：塚原 由布子（東京大学分子細胞生物学研究所・特任研究員）

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】

本研究はヒト心不全患者の心生検をもとにした遺伝子発現プロファイルから、不整脈や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、その遺伝子破壊マウスまたは遺伝子過剰発現マウスを用いて心臓の生理機能異常や遺伝子発現変化をプロファイル化し、心不全発症原因の解明へとフィードバックさせることを目的とする。

現在までに心臓発生に関わる様々なエピジェネティック因子（特に、クロマチン因子とヒストン因子）の役割が報告されている（図1：中村ら 実験医学2012参照）。しかしながら、これらの因子は先天性心疾患および心臓形成時期における機能理解に着目しており、心不全発症に焦点を当てた報告はない（表1：中村ら 実験医学2012参照）。心不全発症におけるエピジェネティック因子の機能については、加齢を含め様々なパラメータによる二次的な影響が考慮されることから、その解析は非常に難しいと考えられる。



（図1：マウス・ヒトの心臓発生・先天性心疾患に関わるクロマチン因子群とヒストン修飾因子群）

表1. クロマチンリモデリング因子群は心臓発達に大きく寄与する。

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	卵巣養血管の壊滅、肉柱低形成、胎生致死E10.5-11.5
	Baf180		生殖細胞系欠損マウス	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症が発症
			二次形成領域特異的欠損マウス	流出路・右心室低形成、胎生致死E10.5
	CHD	Chd7	ヘテロ型欠損マウス	動脈弓の障害
心臓発達・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
			心筋特異的欠損マウス	心筋層の薄化、心室中隔欠損、胎生致死E11.5
			二次形成領域特異的欠損マウス	流出路・右心室低形成、胎生致死E10.5
		点変異体(ゼブラフィッシュ)	ルーベージ異常、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)	ルーベージ異常、収縮力低下、筋繊維の破壊
		Baf60c	心臓特異的欠損マウス	ルーベージ異常、心室低形成、流出路の短縮、胎生致死E10-11
		非心臓性中胚葉におけるoverexpression	非心臓性中胚葉から成熟心筋への分化を誘導	
		ゼブラフィッシュ胚	心臓の肥大化	
	Baf180	生殖細胞系欠損マウス	心臓低形成、心室中隔欠損、冠血管欠損、胎生致死E12.5-15.5	
	Pontin, Reptin	ノックダウン胚/overexpression胚(ゼブラフィッシュ)	心筋低形成	

（表1：心臓形成に不可欠なクロマチン因子群）

本年度は、前年度心不全患者のアレイ解析により単離された候補エピジェネティック因子群について遺伝子破壊マウスを作製し、各々の因子の作用機序を明らかにする。将来的に基礎臨床への提供を目指して、心不全発症に関与するエピジェネティック因子の理解に基づいたゲノムプロファイルを作成するためには、はじめに候補となるエピジェネティック因子をコードする個々の遺伝子を破壊する系を用いて機能を調べることが第一であると考えられる。心筋分化過程は解析系としても優れていることから、発生過程に限定することで、これらのエピジェネティック因子の機能の理解を目指す。本年度はBRG1、DNMT1、DNMT3A/B、RING1A/B、Arip4の5因子について遺伝子破壊マウスを作製し、発生過程における作用機序を明らかにする。これら一連の結果は、本研究が目指す心筋症発症の理解や心不全発症抑制因子の単離に不可欠である。

【B . 研究方法】

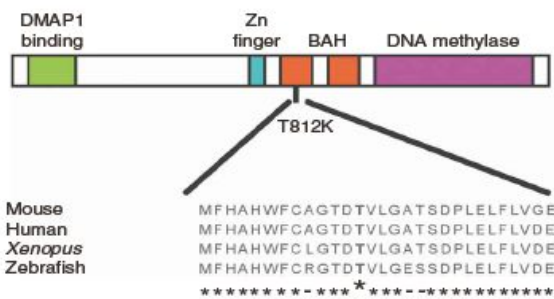
研究1（クロマチン因子BRG1の遺伝子破壊）

中胚葉遺伝子であるMesp1にcreリコンビナーゼを導入したMesp1creマウスとBrg1^{flox/flox}マウスの掛け合わせにより、中胚葉組織でBrg1を欠損したBrg1^{flox/flox};Mesp1creマウスが得られる。これにより、Nkx2.5creマウスを用いてBrg1を遺伝子破壊した場合（Takeuchi et al., 2011；Nkx2.5creを用いた遺伝子破壊では心臓パターン形成時期での機能理解が期待される）と比較して、より早期に、特に心臓誘導時においてBrg1を欠損したマウスが作出される。

研究2（DNAメチル化因子DNMTの遺伝子破壊）

Dnmt1^{MommeD2} (MD2) を用いた（図2：Whiteman E. クイーンズランド医科学研究所より供与）。

この系統は、Dnmt1のBAHドメイン領域におけるポイントミューテーションによって、Dnmt1タンパク質がほとんど合成されない変異体である。このDnmt1ホモ変異体は胎生9日で致死となることが知られているが、詳細な原因は分かっていない。本研究では、この変異体を用いて心臓発生におけるDnmt1の機能の理解を目指す。

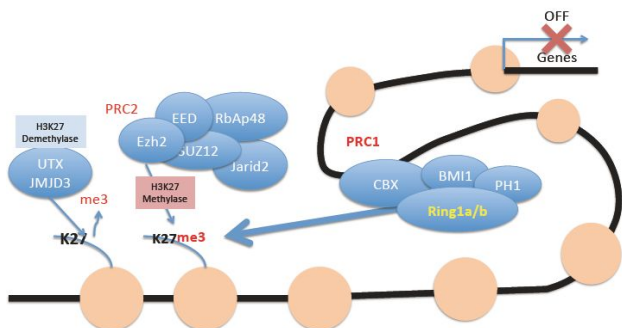


(図2: DNMT1変異マウス*Dnmt1^{MommeD2}*。ENUによるポイントミューテーションにより*Dnmt1*内のBAHドメインのスレオニンがリジン置換された変異マウスである。)Chong et al., 2007より改変。

研究3 (ヒストンメチル化因子RING1A/Bの遺伝子破壊)

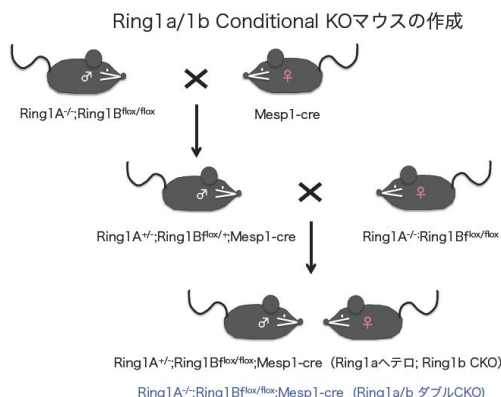
ポリコム群タンパク質は2種類のポリコムタンパク質抑制性複合体(Polycomb Repressive Complex-1(PCR1), -2(PCR2))を形成する。PCR2はヒストンメチル化酵素Ezh2を含み、標的遺伝子領域においてヒストンH3K27あるいはH3K9をメチル化する。これらのヒストン修飾をPCR1が認識して結合し、そのクロマチン領域にクロマチン構造変換をもたらすことが報告されている。PCR1はモノユビキチン化触媒活性を持ち、遺伝子のサイレンシングにはたらく(図3)。PCR2のコア因子であるヒストンメチル化酵素Ezh2やヒストンH3K27脱メチル化酵素UTXなどの解析により心臓特異的な制御機構が分かりつつあるが、PCR1コア因子であるRING1の欠損および遺伝子破壊したモデル生物の心形成における報告は無い。

本研究は、図4の様に*Mesp1-cre*を用いて中胚葉特異的にRING1A/Bの両遺伝子破壊マウスを作製し、心臓形成における機能解析を目的とする。RING1A^{-/-}及びRING1B^{flox/flox}マウスは横浜理化学研究所アレルギー疾患研究センター古関明彦博士から供与され、共同研究として実施する。



(図3: PRC2複合体がヒストンH3の27番目のK残基をトリメチル化する。メチル化されたヒストンは、PCR1に含まれるクロモドメイン(CBX)を介して認識され、クロマチンを引き連れた

PRC1が結合することにより転写が抑制される。よって安定的な転写抑制制御にはPCR1の存在は欠かせない。)

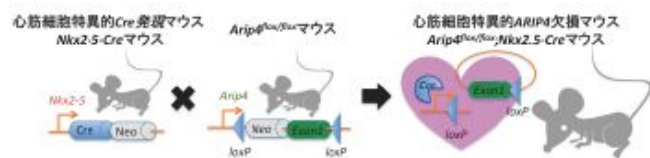


(図4: 心臓特異的なRING1A/Bのダブル遺伝子欠損マウスの作製方法)

研究4 (アンドロゲン受容体結合因子Arip4の遺伝子破壊)

心不全患者の遺伝子発現プロファイルからArip4 (Androgen receptor interacting protein 4/Rad54l2/Snf2l)が候補因子として単離されたが、性差因子の同定は新規であり、も心疾患における機能の解明には遺伝子破壊マウスによる解析が重要であると考えた。これまで、培養細胞や精巢における解析により、Arip4は核内に局在してAR(アンドロゲン受容体)と相互作用し、標的遺伝子の転写活性を亢進することが報告されている。またArip4はSUMO因子との結合を介して生殖腺形成転写因子Ad4BP/Sf-1と結合し、転写抑制作用を有することも知られている。しかし、他の器官におけるArip4の機能は全く解析されていない。

Arip4^{flox/flox}とNkx2.5-Creとを交配することにより心臓形成時期におけるArip4の役割を解明することを試みた(図5)。Arip4^{flox/flox}マウスは九州大学大学院医学系研究科諸橋憲一郎博士から分与頂き、心臓特異的な解析を行った。また、Nkx2.5-creマウスはSchwartz RJ博士に分与して頂いた。



(図5: 心臓特異的なArip4遺伝子破壊マウスの作製方法。Arip4^{flox/flox}とNkx2.5-Creとを交配させることにより、心臓形成時におけるArip4の役割を知ることが可能となる。)

研究5（性差・年齢特異的な心不全患者心筋検サ ンプルを用いた遺伝子解析系の確立）

本研究項目は、本研究のコアとなった先行研究のオーストラリア心不全患者心筋検サンプル（BAKER IDI 心臓外科 D.Kaye 教授との共同研究）を用いたマイクロアレイと miRNA アレイプロファイルをさらに発展させるものである。その理由として、心不全に至るには様々な環境や遺伝的背景も関与し、解析を難しくさせていることが挙げられる。さらに、人種間による遺伝子発現状況の相違も存在すると考えられた。よって、本研究項目の目的は人種を超えた心不全発症に共通する発現プロファイルの作製を試み、3年目以降へ発展させるところにある。そのためにはヒト心不全サンプルを扱える研究者グループに協力を要請し、可能な限り解析条件を絞り込む必要がある。

そこで本研究では、京都府立医大人工心臓再生分野五條理志教授、及び都立健康長寿研究センター豊田雅士副部長に協力を依頼し、心筋梗塞歴を経たヒト心不全患者 2000 体の病理組織心筋プロファイルから、性別 年齢 既往歴 別にカテゴリー分けを行ない、各カテゴリーで RNA-seq と miRNA アレイを遂行し発現変化プロファイルを作成する。研究代表者の研究室では既に、心臓に発現する遺伝子のプロモーター及びエンハンサー領域で機能する可能性のある RNA 分子のバイオインフォマティクス解析システムを立ち上げており、独自に解析可能である。さらに、ラット/マウス心筋初代培養系も樹立しておりレンチウイルスによる遺伝子導入法や小分子 RNA の導入による機能解析も可能である。

（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、本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

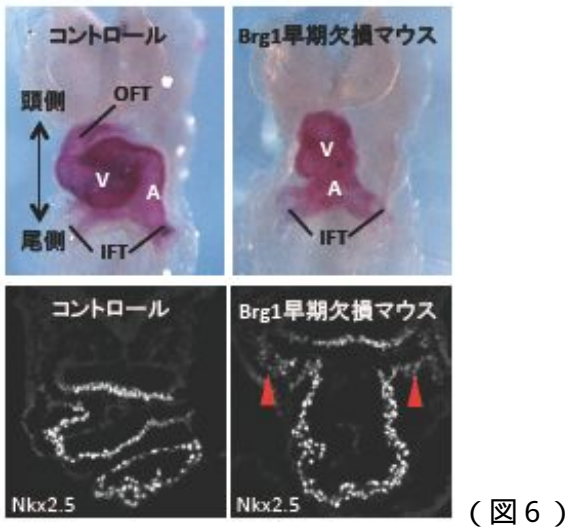
て実験を行っている。また、ヒト胚性幹細胞を扱う予定は無い。ヒトサンプル取り扱いに関しては、共同研究先に委託し、RNA及びゲノムのみ取り扱う予定である。ヒト組織に関する倫理規定には十分に配慮する。

【C . 研究結果】

研究結果 1 (クロマチン因子BRG1の遺伝子破壊)

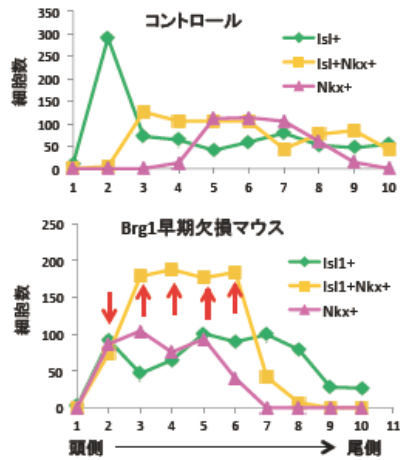
1 : Brg1^{flf};Mesp1cre(早期欠損)マウスの表現型の解析

Brg1早期欠損マウスの心臓は、ルーピングの異常、流出路・心室の形成不全が見受けられる(図6)。心房および流入路の形状に大きな異常は認められないことから、Brg1早期欠損マウスでは、特に頭側の心臓領域に異常が現れると考えられる。



(図6)

胎生8.5日目の心臓は、一次心臓領域と心臓前駆細胞からなる二次心臓領域に分けられ、頭側の心臓領域形成には二次心臓領域からの前駆細胞の流入が関わっている(森田唯加ら著, 血管医学, 2012 参照)。心臓の頭側から尾側にかけて各領域の細胞集団の存在数を調べたところ、頭側の二次心臓領域においてIslet1陽性の心臓前駆細胞が減少する一方で、将来心臓領域へと移動し大部分の心臓細胞のソースとなる領域ではIslet1;Nkx2.5共陽性細胞数が極度に増加していた。(図7)。



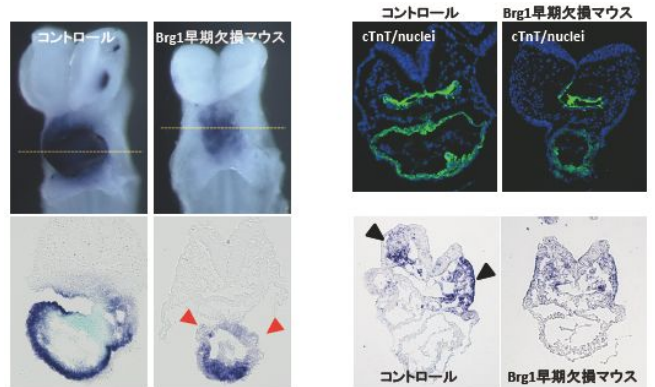
(図7)

これにより、Brg1早期欠損マウスの表現型に認められる心低形成は二次領域から心臓領域に入り

込む未分化細胞群の分化抑制と流入異常が一因と考えられる。

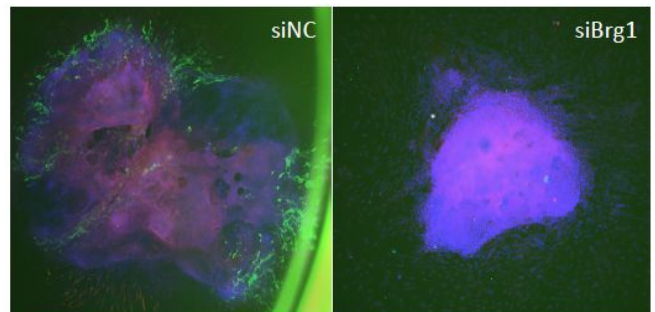
2 : Brg1早期欠損マウスでの心筋分化抑制

心室筋分化について、心室筋マーカーであるMyI2の発現を調べたところ、Brg1早期欠損マウスではMyI2の発現が顕著に減少していることが明らかとなった(図8)。切片化により、コブ状に肥厚した心筋層の形成や部分的なMyI2陰性領域の存在など(図8左: 赤矢尻)、形態の異常とともに心室筋分化の低下が生じていることが確認できた。また、心筋マーカーであるcTnTの発現低下や、二次心臓領域の前駆細胞維持因子であるTbx1の発現低下も認められた(図8右)。ES細胞の分化誘導系においてもBrg1の機能阻害により同様の心筋分化の抑制が見受けられた(図9)。



(図8 : Brg1早期欠損マウス(左)では、心室マーカーであるMyI2の発現が顕著に減少する。黄色点線で切片を作製したところ、心筋層の肥厚や隆起、部分的なMyI2未発現細胞が観察された(赤矢頭)。(右上)心筋マーカーであるcTnT(緑)は、欠損マウスで発現が低下した。

(右下) *in situ* hybridization法を用いたTbx1 mRNAの発現解析。前駆細胞維持に働くTbx1は、二次心臓領域に発現するが(黒矢印)、欠損マウスでは発現が低下していた。)

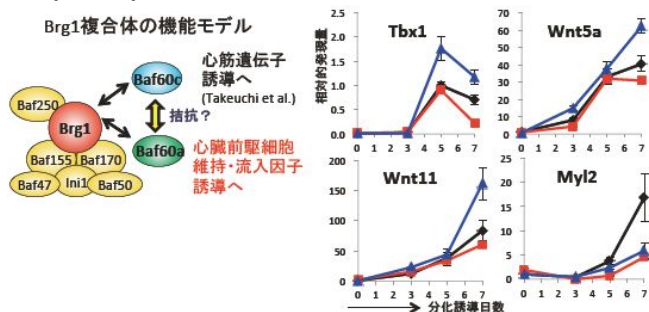


(図9 : ES細胞の心筋分化誘導時期にsiBrg1及びコントロールとしてsiNCを投与し、培養を行った。siNC投与細胞ではトロポニンの発現が見受けられ

た(緑)のに対し、siBrg1投与細胞ではトロポニンの発現が著しく阻害された。)

3: エピジェネティック複合体による初期心臓形成の役割

Brg1は、複数の因子からなる複合体においてATPase活性を有するコア因子としてはたらく(図10)。このとき、複合体をクロマチン上へとリクルートする補因子が、標的とする遺伝子を決めている。結果2で見られた心室筋・心筋マーカーの発現低下は、Baf60cとBrg1による心筋遺伝子の発現誘導が抑制されたためであり、既知の報告と一致する(Takeuchi et al., *Nat. Commun.* 2011; Lickert, Takeuchi et al., *Nature* 2004)。一方、二次心臓領域からの前駆細胞流入には、発現解析よりBaf60cとは異なる補因子Baf60aが関係していると考えられる(図10)。ES細胞を用いた心筋分化誘導実験より、Baf60aはIsl1など前駆細胞マーカー因子と同時期に発現し、Baf60aを抑制するとTbx1及び前駆細胞の流入に寄与するWnt5a, Wnt11の発現が低下すること、また、Baf60cを抑制すると反対にこれらの発現が亢進することが明らかとなった(右図)。



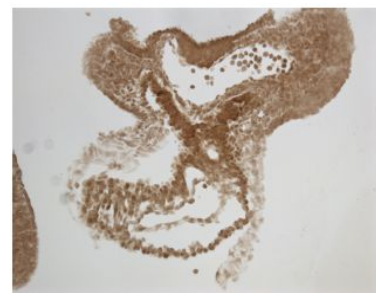
(図10: ES細胞の心筋分化誘導に伴う遺伝子発現変化。Baf60a(赤)およびBaf60c(青)をsiRNAを用いてノックダウンした。黒線はコントロール。Baf60a、Baf60cいずれの抑制によっても、心室筋マーカーMyh2は顕著に減少するが、前駆細胞維持因子Tbx1、Wnt5a、Wnt11は、Baf60aノックダウンにより減少し、Baf60cノックダウンにより増加する。)

このように、Baf60aとBaf60cの作用は拮抗しており、Brg1は結合するパートナーによって前駆細胞から心筋分化へのスイッチングを担っていると考えられる。

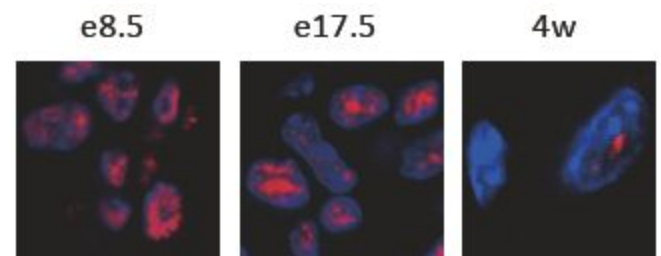
研究結果2 (DNAメチル化因子DNMTの遺伝子破壊)

1: 心臓発生におけるDnmt1の役割

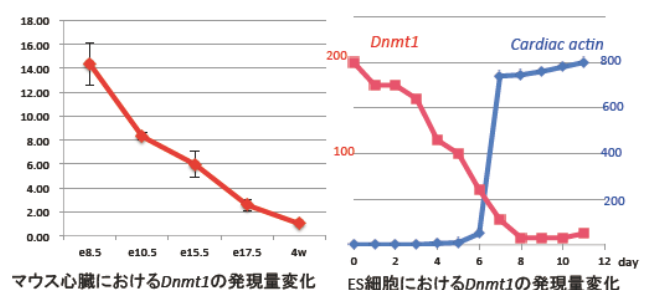
心臓発生過程におけるDnmt1の発現様式を検証したところ、心臓領域において発現亢進が認められ、特に流出路に強く発現が見受けられた(図11)。さらに、幼若心筋の核内においては強く発現しているのに対し、心筋の成熟に伴って発現が減少し核内に凝集する様子が見受けられた(図12)。この発現様式はES細胞の分化誘導系においても同様な結果が得られた(図13)。このように、心筋分化に伴って発現量が減少していくことから、心臓発生においてDnmt1は未成熟細胞でより機能していると考えられる。



(図11: マウス胚生9日目におけるDnmt1の発現様式。DAB染色。濃茶色領域がDnmt1陽性細胞)



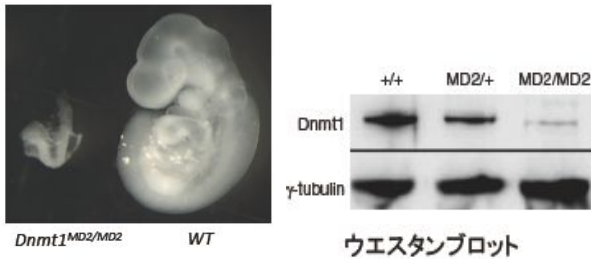
(図12: 心筋発生におけるDnmt1の核内での発現局在変化。)



(図13: 各ステージでのqPCR解析結果。心臓発生が進むにつれてDnmt1の発現量は減少し、さらにES細胞を用いた分化誘導系においても心筋分化と相補的に発現量が減少していた。)

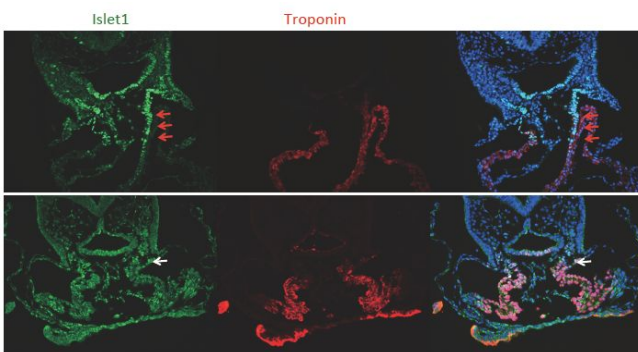
2 : 遺伝子破壊マウスの表現型異常

Dnmt1^{MommeD2} (MD2) ホモ変異体は胎生9日目までに致死となり(図14左)、図14右で示すようにMD2変異体ではDnmt1タンパク質はほとんど合成されていないことが分かる。



(図14: MD2変異体と正常胚(右)。Dnmt1タンパク質合成の異常(右)。正常胚に比べ、ほとんど合成されていないことが分かる。Chong et al., 2007より改変)

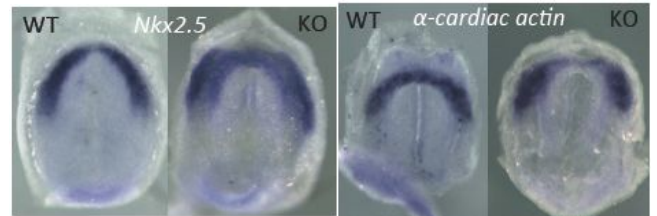
Dnmt1の心臓形成への役割を理解するために、心臓形成時期において切片を作製し心臓形態の詳細な解析を行った(図15)。心筋マーカーとして心トロポニン(赤)を用いて染色を行った結果、心筋層が肥厚しており、ルーピング形成異常が引き起こされ心筒形成前後で発生が停止していることがわかった。正常胚において、心臓流出路には心筋分化前の未分化な心臓前駆細胞が存在し、Islet1(緑)が陽性となり心トロポニンと発現が相反する(赤矢印)。興味深いことに、MD2変異体ではIslet1の発現が消失しており、この発現異常が心トロポニン陽性の心筋凝集および心筋層肥厚の原因と考えられる。



(図15: 正常胚(上)とDnmt1 KO胚(下)マウスでの心臓形成異常)

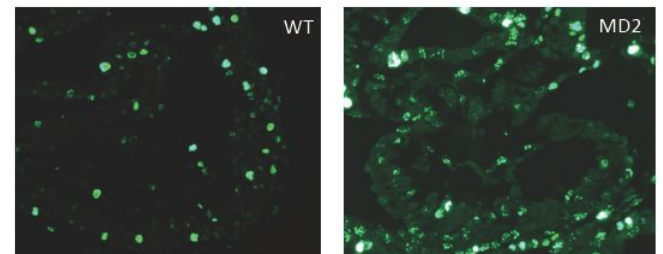
この異常形成の起因を理解するために、より早期胚を用いて解析を行った(図16)。MD2変異体での心臓形成異常は8.0日胚から見受けられた。*in situ* hybridization法を用いて一次心臓領域のマーカーであるNkx2.5の発現を調べると、Nkx2.5の発現様式は正常胚に比べて2倍程度内側に広がっ

ていた(図16左)。この領域は、二次心臓領域と呼ばれ、実際には心筋分化する前の未分化な心臓前駆細胞が多く存在する領域である。心筋マーカーである型心アクチンの発現においてもNkx2.5と同様に発現領域の拡大が見受けられた(図16右)。この結果は、未分化な心臓前駆細胞がDnmt1の発現欠失によって、より早期に心筋に分化したと考えられる。



(図16: *in situ* hybridization法を用いたNkx2.5と型心アクチンの発現様式変化。正常胚(WT)に比べ、MD2変異体(KO)で発現領域が拡大していることが分かる)

次に、細胞周期マーカーであるki67抗体を用いて細胞増殖状態を検討したところ、MD2変異体では細胞増殖が亢進していた(図17: 緑)。このことから、Dnmt1は分化抑制と細胞増殖抑制の二つの役割を担っていることが明らかとなった。

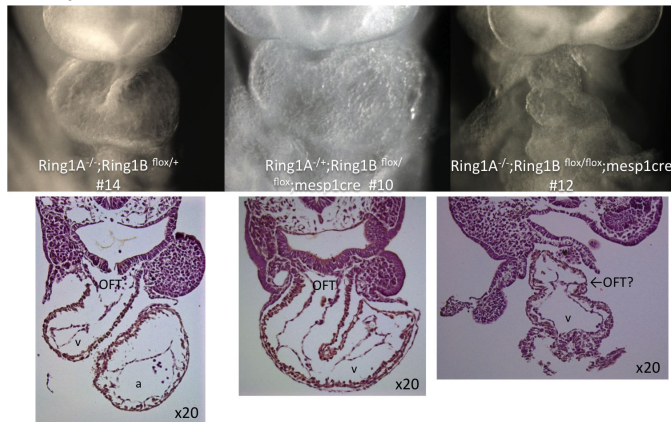


(図17: ki67抗体を用いた細胞増殖活性の検討。正常胚(WT)に比べて、MD2変異体ではki67陽性細胞数が増大している。)

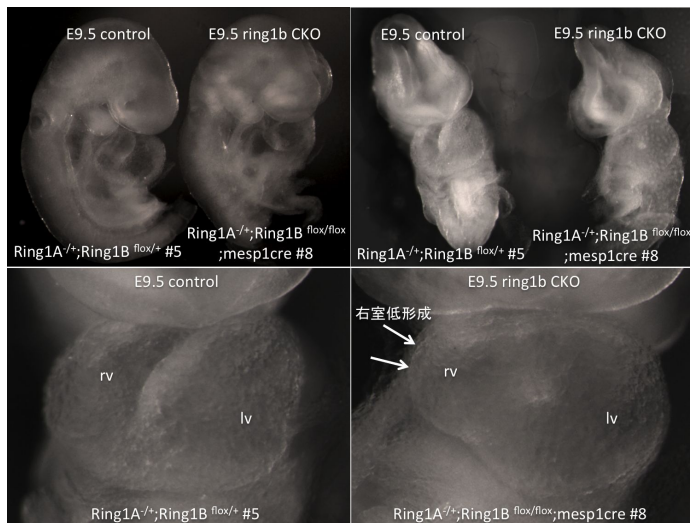
研究結果3 (ヒストンメチル化因子RING1A/Bの遺伝子破壊)

PRC1複合体のコア因子であるRING1A/BのダブルKOマウスの作製を試みた。図18で示すように、ダブルヘテロKO胚(RING1A^{+/-};RING1B^{lox/+};Mesp1-cre)では正常胚との相違はほとんどなかったが、ダブルホモKO胚では著しい心臓形成異常が見受けられ、胚性9日目前後で致死となる(図18右)。RING1AヘテロKO:BホモKOマウス(RING1A^{+/-};RING1B^{lox/lox};Mesp1-cre)を作製したところ(図19)、流出路低形成が見受けられ、ダブルヘテロKO(図18中央)より形態異常が深刻で、ダブルホモKO(図18右)よりも形態異常が緩和

されていることから、RING1AとRING1Bは心臓形成において相乗的な作用を担っていると考えられる。



(図 1 8 : RINGA/BダブルKOマウスの作製。)

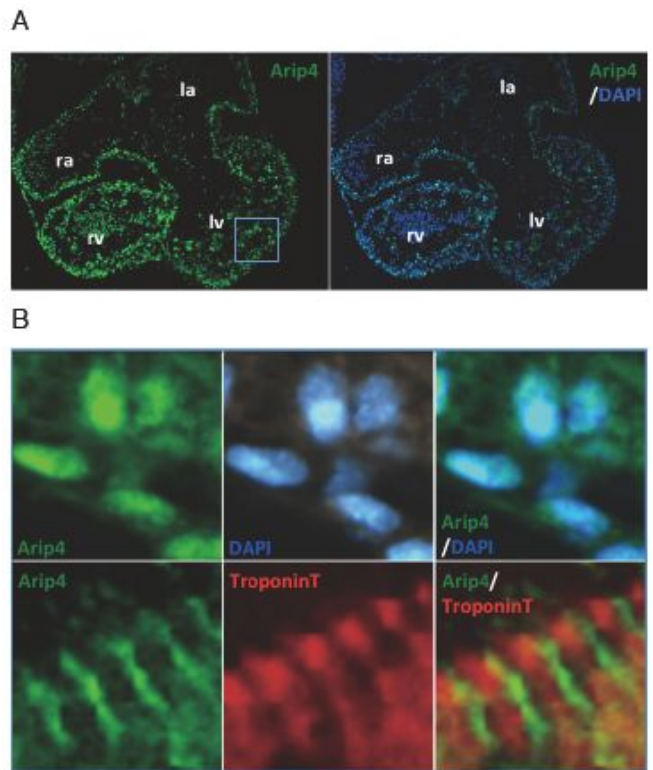


(図 1 9 : ダブルヘテロKOマウス(RING1A^{-/-};RING1B^{flox/+};Mesp1-cre)とRING1AヘテロKO RING1BホモKOマウス (RING1A^{-/-};RING1B^{flox/flox};Mesp1-cre)

研究結果 4 (ホルモン受容体結合因子Arip4の遺伝子破壊)

1 : Arip4はマウス心臓において核、サルコメアに発現していた。

心臓形成期における Arip4 の発現様式を調べるために、野生型マウス胎生 10.5 日目胚心臓組織切片を作成し、免疫染色を行った。心臓形成期において Arip4 は心臓で広範囲かつ、主に核内において局在していることが示された。また興味深いことに心筋細胞において Arip4 はサルコメアにも局在していた。Hela 細胞と精巣においては Arip4 は核内にのみに局在すると報告されており、心臓におけるサルコメアへの局在は新しい知見である。



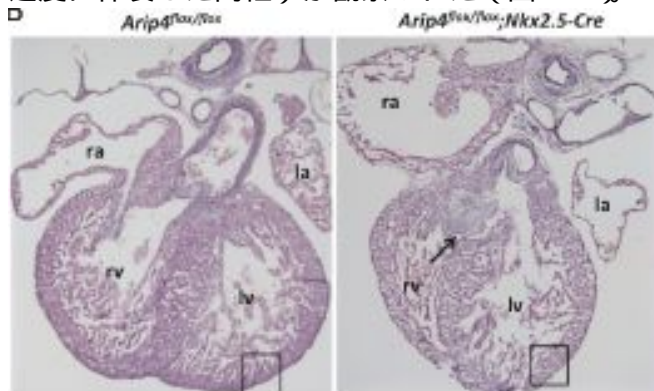
(図 2 0 : Arip4の心臓での発現局在。

A.免疫染色法による野生型マウス胎生10.5日目胚心臓組織切片におけるArip4の発現確認。Arip4は心臓において広範囲かつ、主に核内において局在していた。ra;右心房、rv;右心室、lv;左心室、la;左心房。緑;Arip4、青;DAPI(核マーカー)。
B. A の左心室領域の拡大図。Arip4 は心臓全体の細胞の核と心筋細胞のサルコメアにおいてシグナルが見受けられた。緑;Arip4、青;DAPI(核マーカー)、赤;Troponin T(心トロポニン T;心筋細胞サルコメアマーカー)。

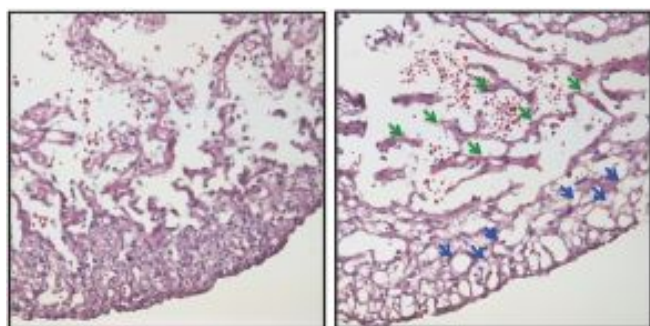
2 : Arip^{flox/flox};Nkx2.5-cre マウスにおける心筋成長阻害

心臓特異的な Arip4 の機能を調べるために Arip^{flox/flox}マウスと心筋細胞特異的にcreを発現するNkx2.5-creマウスを掛け合わせ、cre-loxPシステムを利用した心臓特異的Arip4欠損マウス(Arip^{flox/flox};Nkx2.5-creマウス)を作製した。Arip^{flox/flox}; Nkx2.5-creマウス胎生15.5日目胚の心臓組織切片を作成し、HE染色を用いた形態比較を行ったところ、Arip^{flox/flox}マウスは野生型マウス胚の心臓と同様の表現型を示した (floxの挿入による二次的な影響は無いと考えられる)。心臓特異的Arip4欠損マウス (Arip^{flox/flox};Nkx2.5-creマウス) の心臓は、正常胚の心臓では認められない心室中

隔欠損や心室壁構造の低形成(希薄な心筋層、粗く過度に伸長した肉柱)が観察された(図21)。



(図21: マウス胎生15.5日目胚における正常胚(Arip4^{flox/flox})、心臓特異的ARIP4欠損胚(Arip4^{flox/flox};Nkx2.5-cre)との心臓形態の比較。Arip4^{flox/flox};Nkx2.5-creにおいて顕著な心室中隔欠損と心室壁の異常が観察された。黒矢印は心室中隔欠損を示す。)

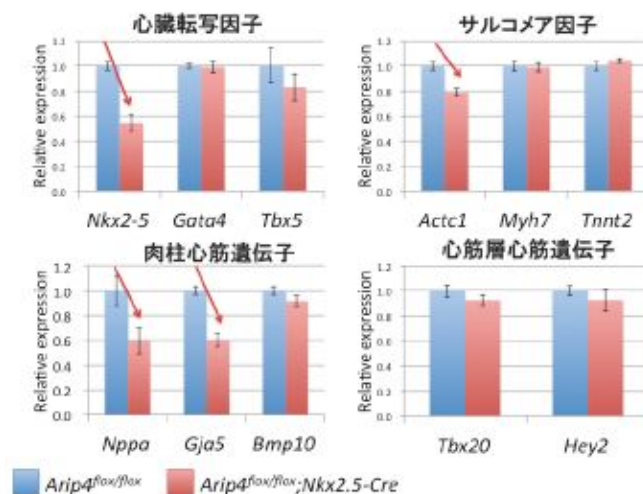


(図22: 上記図21の左心室領域の拡大図。心室壁において粗い肉柱と希薄な心筋層が観察された。緑矢印は粗肉柱、青矢印は希薄心筋層を示す。)

この心臓形態は、男性において女性より2倍優位に発症する心筋症の一種、心筋緻密化障害(non-compaction)に酷似していた。心筋緻密化障害は心室壁発達期において心筋層の緻密低形成と肉柱構造が粗く過剰に伸長することで、心臓の収縮力低下を引き起こす先天性心疾患である。原因として、心室壁発達期において、心臓転写因子Nkx2.5の発現減少、Notchシグナルの発現減少による肉柱心筋遺伝子(Nppa, Gja5, Bmp10)の発現減少と、心筋層心筋遺伝子(Tbx20, Hey2)の肉柱領域への異所的発現によって心筋緻密化障害様の心臓形態を示すこと、心筋緻密化障害患者ではサルコメア収縮因子(Actc1, Tnnt2, Myh7)の遺伝子変異による構造異常などが報告されている。よって、Arip4遺伝子破壊マウスにおいてもこのような遺伝子異常が生じていると考えられる。

3: Arip4は心筋緻密化障害関連性遺伝子の発現を制御する

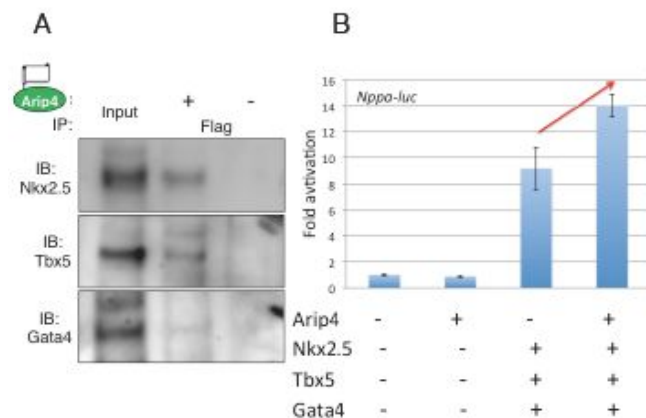
免疫染色の結果からArip4が核内に局在すること、Arip4遺伝子破壊マウスにおいて心室壁構造が心筋緻密化障害に酷似していたことから、Arip4が心筋緻密化障害との関連性が報告されている心臓転写因子、サルコメア因子、肉柱心筋遺伝子、心筋層心筋遺伝子の転写制御を行っているのではないかと考えられた。そこで、正常マウス胚心室とArip4変異マウス胚心室からRNA抽出を行い、qRT-PCRを用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、Arip4^{flox/flox}マウス心室に比べてArip4^{flox/flox};Nkx2.5-creマウス心室で心臓転写因子(Nkx2.5)、サルコメア因子(Actc1)、肉柱心筋遺伝子(Nppa, Gja5)の発現の減少が見受けられた(図23)。



(図23: qPCR法を用いた正常胚とARIP4 KOマウス胚とでの様々な遺伝子発現変化。)

この結果から、Arip4は心筋緻密化障害との関連が報告されている遺伝子群を制御している可能性が示唆された。現在までの*in vitro*での実験系において、Arip4は生殖系列の転写因子群と相互作用して転写制御を行う補因子としての機能が知られているが、心臓で相乗的効果を引き起こすパートナータンパク質についての報告はない。TakeuchiとBruneauは、既に心臓発生においては心臓転写因子Nkx2.5, Tbx5, Gata4の相互作用が心ホルモ遺伝子Nppa、サルコメア因子α型心アクチンをコードするActc1の発現制御を行っていることを報告している。これらの知見から、Arip4は心臓組織においても同様に心臓転写因子であるNkx2.5, Tbx5, Gata4と相互作用することで、心筋緻密化障害との関連が報告されているNppa、

*Actc1*の転写制御をおこなっていると考えられる。よって、Arip4とNkx2.5, Tbx5, Gata4の相互作用を調べるためにバキュロウイルスを用いて合成したFlag-Arip4タンパク質を用いて免疫沈降を行いタンパク質同士が結合しているか検証した。その結果、Arip4はNkx2.5, Tbx5, Gata4とそれぞれ相互作用していることが示された(図24A)。次にArip4とNkx2.5, Tbx5, Gata4の相互作用が、Nppaのプロモーターを直接制御しているかを調べるためにluciferase assayを行った。その結果、Nkx2.5, Tbx5, Gata4の単独導入に比べ、Arip4を添加することでNppaのプロモーター活性をさらに上げることがわかった(図24B)。以上の結果から、ARIP4は心臓転写因子であるNkx2.5, Tbx5, Gata4と相互作用して、心筋緻密化障害との関連が報告されている肉柱心筋遺伝子Nppaの転写制御を行っていることが示唆された。



(図24: Arip4と心臓転写因子Nkx2.5, Gata4, Tbx5の相互作用による心室壁構成遺伝子(Nppa)の発現制御。

A. 野生型マウス胎生14.5日目胚心臓における免疫沈降法を用いたArip4タンパク質と心臓転写因子群の相互作用結果。Arip4-Flagを加え、Flag抗体で回収したレーンでNkx2.5, Gata4, Tbx5それぞれのバンドが検出された。

B. COS7細胞を用いたluciferase assay結果。心臓転写因子群(Nkx2.5, Gata4, Tbx5)とArip4を同時に加えることによって肉柱心筋遺伝子Nppaのプロモーター活性は顕著に上がる結果が得られた。)

研究結果5 (性差・年齢特異的な心不全患者心生検サンプル)

現在までに、代表者グループはヒト70歳代心不全miRNAプロファイルから心不全下で発現亢進するmiRNAを8種類、減少するものを5種類単

離しており、れらがラット/マウスにおいても保存されていることを見出している。その中には既に心不全での発現変化が報告されているものもあるが、機能解析には至っていない。本研究では既にmiRNA及びantisenseRNAの作製を始めており、早急に初代培養系にて投与後の変化を追跡していく。共同研究グループではカテゴリ別のヒト心筋症組織を採取しており、今後順次遺伝子解析を行っていく。

【D・考察】

本年度研究により、心不全患者から作製された遺伝子発現プロファイルを元に複数のエピジェネティック因子が単離され、心臓発生における機能解析がなされてきた。その結果、各々の因子が心臓発生に重要な機能を担っていることを見出し、心疾患モデルマウスをプロデュース出来た。本年度解析したKOマウスから得られた結果については、至急論文としてまとめることを目標とし、次年度ではより後天的心疾患発症理解を目指すのにふさわしいモデルマウスの作製を試みる。さらに、研究結果5は昨年・本年で得られた結果からの発展系であり、近未来的に中心となる基礎-疾患研究であると考えている。次年度内にて年齢・性差・既往歴別にプロファイルの作成を目指す。

研究結果1について

Brg1 KOマウスの解析から、Brg1が心筋分化に深く関与すること、さらにその発現量が重要であることを過去に報告している(H23年厚労科研報告書; Takeuchi & Bruneau Nature 2009; Takeuchi et al., Nat. Commun. 2011)。興味深いことに、本年度研究では、Brg1は未分化細胞と心筋分化細胞とで作用が相反することが明らかになった。細胞種によってパートナーが異なり、パートナー依存的にクロマチンコア因子であるBrg1の作用を活性化タイプにするか抑制化タイプにするか、決定しているとも考えられる。本年度の発生的解析によって、Brg1の新たな機能が理解できたことで、後天的な心疾患発症理解への手助けとなると考えられる。

次年度は、後天的な心筋解析モデルマウスを樹立し、このモデルマウスを用いてクロマチン因子とヒストン修飾因子の作用を議論することを目標とする。

研究結果 2 について

本研究では、Dnmt1の発現は心臓発生・成熟が進むにつれて心筋核内で凝縮し、かつ、減少する傾向にあることが明らかとなった。Dnmt1の発現と相反して心筋分化遺伝子の発現が亢進することから、Dnmt1は心筋分化抑制に関与していると考えられる。Dnmt1 KOマウスではNkx2.5や α 型心アクチンの発現領域が広がっていたことから、心筋遺伝子特異的に、または心筋制御因子特異的にメチル化していると考えられ、今後の後天的心疾患解析に大きな意味を持つ結果である。

腎疾患の課題の一つ腎臓線維化では、線維化抑制因子が過剰メチル化状態になっており、このメチル化にDnmt1が寄与しているという報告がある。次年度ではマウス心不全モデルを用いてDnmt1の発現様式との関連を調べる必要があると考えられる。心負荷モデル(TACマウス)においては、心負荷後一週間以内でDnmt1の発現亢進が見受けられることから、Dnmt1の機能機序をバイサルファイト・シーケンスを用いて行う必要があると考えている。

研究結果 3 について

ポリコーム複合体の心臓での機能については、昨年から報告が見受けられるようになった。エピジェネティックな発現調節制御は先天性心疾患のみならず、後天的心疾患にも寄与することが近年、報告された。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に発現するが心筋分化に伴って発現が減少する。ヒストン H3 メチル化触媒活性を持つ PRC2 構成因子 Ezh2 が、この Six1 の発現を抑制することによって、心臓関連遺伝子群の発現を安定化し、成人発症型心疾患を回避することが示された。Bruneau のグループでは、Ezh2 欠損型マウスを作製し Six1、胎児期遺伝子群、線維化の進行に関与する遺伝子群の発現抑制が解除され、さらに Six1 の下流制御下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とを報告している。Ezh2 を介した Six1 の抑制(エピジェネティックな心臓前駆細胞遺伝子の発現抑制)は、出生後の心臓におけるホメオスタシスの維持に必要である。

また、心臓発生初期に特異的に欠損させたマウスでは(Ezh2;Nkx2.5cre)、心室中隔欠損、compact myocardial hypoplasia、hypertrabeculation といった先天性心臓形成異常を生じる。ヒストンメチル化酵素である Ezh2 と拮抗的に機能するヒスト

ン H3K27 脱メチル化酵素 UTX は心臓特異的エンハンサー(ANF,Baf60c enhancer)に結合し、また、これらのエンハンサー上への Brg1 の結合を促進することで、心筋特異的遺伝子の発現を促進することが報告された。

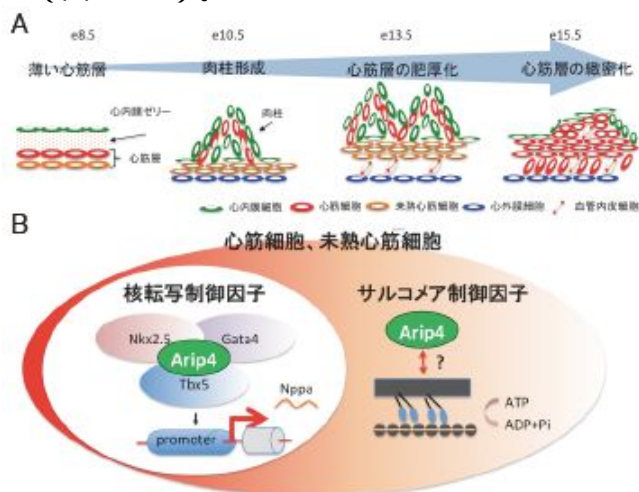
このように、ポリコーム複合体の心臓発生における機能は理解されつつあるが、PRC1 複合体の機能についてはよくわかっていない。本研究の結果から心臓発生初期の遺伝子破壊による表現型が Dnmt1 や Brg1 のそれと酷似していることが明らかとなり、これら因子間の相互作用の存在が予想され、今後細胞種特異的な解析を行っていく必要があると考える。さらに、心不全患者におけるヒストン修飾変化、特に H3K27 についての解析が必要であり、次年度内に立ち上げを目指す。

研究結果 4 について

本研究では心疾患の発症率における性差に着目し、アンドロゲンに関与する Arip4 の役割について解析を行った。Arip4 の局在解析の結果、Arip4 は心臓を構成する全ての細胞の核と心筋細胞のサルコメア上に局在していることが明らかになった。現在までに Hela 細胞と精巣において Arip4 が核内に局在することが知られているが、心臓におけるサルコメアでの発現は新しい知見である。このことから心臓において Arip4 は、今まで知られていた転写制御因子としての機能だけでなく、別の機能も担っていることが推察される。

心筋細胞特異的 Arip4 遺伝子破壊マウス(Arip4^{flox/flox};Nkx2.5-Cre)を作成し、組織解析を行ったところ、心室壁構造において心筋層が希薄化し、粗肉柱を特徴とした先天性心疾患、心筋緻密化障害と非常に酷似した表現型を示すことが明らかとなった。心室壁の形成は胎生8.5日目頃の二層の心筋層から始まり、続いて 内皮からのシグナルにより心筋細胞が増殖することによって胎生10.5日目頃から肉柱構造が形成され、その後、心臓の収縮力が増してくる胎生13.5日目頃から心筋層の心筋細胞が増殖し、胎生15.5日目頃から緻密化が進むことが報告されている(図 2 5 A)。分子学的には Notch signal が肉柱形成に必要な Nppa, Gja5, Bmp10 などの遺伝子群、Tbx20, Hey2 などの転写因子をコードする遺伝子群を制御していること、心臓転写因子 Nkx2.5 が Nppa や Bmp10 を制御することなどによって心室壁の形成に寄与していることが報告されている。また心臓の収縮力を増す上でサルコメア構造の成熟は必要不可欠であり、

心筋緻密化障害患者からはサルコメア構造遺伝子 (Actc1, Tnnt2, Myh7) の遺伝子変異が報告されている。以上の報告と本研究の結果から、心室壁発生期においてArip4は核転写制御因子としての機能とサルコメア因子と相互作用して心筋収縮を制御する機能を持っているのではないかと考えられる(図25B)。



(図25: 心室壁発生と心室壁の心筋細胞におけるArip4の機能モデル図)

A. 心室壁発生期のモデル図。

B. 今回得られた結果から推察される心室発生期における心筋細胞でのArip4の分子機能。心室壁発生期の心筋細胞または未熟心筋細胞においてArip4は二つの機能を持つと考えられる。Arip4は核内転写制御因子としての機能を持つ、Arip4はサルコメア収縮を制御する機能を担っているという可能性。)

さらに、心筋緻密化障害は男性優位に発症する先天性心疾患であるが、心室壁の形成メカニズムにおいて性ホルモン関連因子が関与している報告はない。本研究の結果は、男性優位な心疾患のメカニズムを解明する手がかりとなることが期待できる。

研究結果5について

本年度は検体を供与する共同研究者の選定と検体の選別についての話し合いにとどまった。次年度にプロファイルの作成を試みる。

【E. 結論】

現在、新生児における先天性心疾患や成人における後天性心疾患は高頻度で発症する重篤な疾患であり、如何にして心機能を維持した状態で、機能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はその多くが分子機構に重きが置かれ、発生学とエピジェネティクスに着目した研究は少なかった。しかし生命現象をエピジェネティックな視点から探索することは、生命の不思議を理解する上で必須であるのみならず、これら疾患の一つの解決策として、大きな力を発揮すると考えられる。心臓発生における新規エピジェネティック制御機構の解明から、新しい生命の神秘が解き明かされることは言うまでもなく、basic science と clinical research とを橋渡しする新たなきっかけになることを信じてやまない。

【F. 研究発表】

1. 論文発表

(1) Xu B, Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, Takeuchi JK, Jeannotte L, Gaber ZB, Novitsch BG, Wellik DM. Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 26;110(48):19438-19443, 2013

2. 学会発表

A: 招待講演

- (1) 竹内純、Epigenetic Factors in Cardiac Development and Regeneration., 第7回日仏先端科学(JFFoS)シンポジウム(滋賀), 2013.1.25
- (2) 竹内純、心疾患重篤化と心機能再生に関わるエピジェネティック因子群、奈良県立医科大学セミナー(奈良)、2012.12.26
- (3) 竹内純、心臓再生能力を司るクロマチン結合制御因子群、第33回日本炎症・再生医学会(福岡)、2012.7.5
- (4) 竹内純、クロマチン因子から見る心臓再生と心筋可塑性、第55回日本腎臓学会学術総会(横浜)、2012.6.1

B: 関連発表

- (1) 山田小和加、竹内純、Dnmt1 specifically functions in heart development and maintenance., 第35回日本分子生物学会年会(福岡)、2012.12.11

(2) 森田唯加、塚原由布子、Peter Anderson, 黒川旬子、杉崎弘江、小島瑞代、相賀裕美子、西中村隆一、古川哲史、Hesham Sadek、Chulan Kwon、小柴和子、竹内純、新規心臓転写因子による心臓細胞運命決定と機能的な心臓再生、第35回日本分子生物学会年会(福岡)、2012.12.11

(3) Yuika Morita, Jun K. Takeuchi, Sa+ Cells, a Novel Cardiac Lineage, Promote Heart Program and Its Regeneration., 第29回国際心臓研究学会(ISHR) 日本部会総会(福岡)、2012.10.26

(4) 森田唯加、塚原由布子、Anderson Peter、黒川旬子、杉崎弘江、相賀裕美子、西中村隆一、Kwon Chulan、古川哲史、小柴和子、竹内純、特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構、第11回日本心臓血管発生研究会(福島)、2012.10.19

(5) 中村遼、小柴和子、塚原由布子、笹野哲郎、安藤由貴、小島瑞代、富田江一、古川哲郎、Hesham A Sadek、竹内純、心筋再生におけるエピゲノム制御機構、第11回日本心臓血管発生研究会(福島)、2012.10.19

(6) Kazuko Koshiba-Takeuchi, Ryo Nakamura, Tetsuo Sasano, Yuko Tsukahara, Sawaka Yamada, Mizuyo Kojima, Tetsushi Furukawa, Hesham A. Sadek, Jun K Takeuchi. Fetal epigenetic modifiers stimulate cardiomyocyte regeneration and protect fibrosis in mammalian/amphibian models. 第10回国際幹細胞学会(ISSCR)年次総会(横浜)、2012.6.14

(7) Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Andersen, Junko Kurokawa, Hiroe Sugizaki, Sylvia Evans, Yumiko Saga, Ryuichi Nishinakamura, Tetsushi Furukawa, Chulan Kwon, Kazuko Koshiba-Takeuchi & Jun K. Takeuchi. Sall promotes cardiac progenitor cell fate and fully contribute to cardiomyocyte lineages. 第10回国際幹細胞学会(ISSCR)年次総会(横浜)、2012.6.14

(8) 中村遼、小柴和子、塚原由布子、竹内純、心臓再生向上因子としてのクロマチン制御機構、第11回日本再生医療学会総会(横浜)、2012.6.13

(9) 森田唯加、塚原由布子、小柴和子、竹内純、Sallは心臓前駆細胞必須因子として全心臓細胞系譜を制御する、第11回日本再生医療学会総会(横浜)、2012.6.13

(10) Ryo Nakamura, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Mizuyo Kojima, Jun K Takeuchi. Epigenetic factors and the capacity for heart regeneration in mammals., 第45回日本発生生物学会(神戸)、2012.5.28

(11) Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Andersen, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Chulan Kwon, Kazuko Koshiba-Takeuchi & Jun K. Takeuchi. Cell-Fate Specification of Cardiac Progenitors/Stem Cells by Defined Factors in vivo and in vitro. 第45回日本発生生物学会(神戸)、2012.5.28

(12) Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Anderson, Junko Kurokawa, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Tetsushi Furukawa, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Chulan Kwon & Jun K. Takeuchi. Sall+ Cells Represent a Renewing cardiac Progenitor Population. 2012 Weinstein cardio-vascular development conference (Chicago, USA), 2012.5.3

(13) Ryo Nakamura, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Tetsuo Sasano, Mizuyo Kojima, Tetsushi Furukawa, Hesham A Sadek & Jun K Takeuchi. The novel mechanism of histone-chromatin regulation for cardiomyocytes regeneration. 2012 Weinstein cardiovascular development conference (Chicago, USA), 2012.5.3

【G . 知的財産権の出願・登録状況】

- 1 . 特許取得
(1) 竹内純、森田唯加、塚原由布子、特定因子による心臓幹・前駆細胞の誘導/活性化方法、国際出願番号：PCT/2012/084259、2012.12.21
(2) 竹内純、森田唯加、塚原由布子、高効率心臓細胞分化能を持った新規心臓前駆(幹)細胞制御因子の樹立法、特願2012-011458、2012.1.23
- 2 . 実用新案登録
特記無し。

3 . その他

A : 表彰

(1)公益財団法人万有生命科学振興国際交流財団
Banyu Foundation Research Grant 2010 第1回
万有医学奨励賞 優秀賞 2012.12

B : 運営・教育

2010-現在 国際心臓発生学会日本部会 運営委員 (2018年日本にて国際学会招致)

2011-現在 国際心臓研究学会 (ISHR) 理事

2011-2012 日本分子生物学会 男女共同参画運営委員

別紙 4

. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
竹内純	エピジェネティクスで組織可塑性を理解する	竹内 純	実験医学	羊土社	東京	2012	2896-2901
中村遼、 塚原由布子、 竹内純	心臓発生と心疾患のエピジェネティクス - クロマチンモデリング因子・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 -	竹内 純	実験医学	羊土社	東京	2012	2923-2931
森田唯加、 小柴和子、 竹内純	心臓発生とその分子メカニズム		血管医学	メディカルレビュー社	東京	2012	97-113

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Xu B, Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, Takeuchi JK, Jeannotte L, Gaber ZB, Novitch BG, Wellik DM	Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	110	19438-19443.	2013