

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 竹内 純

平成26(2014)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	-----	14
. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

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）

・総合研究報告書

【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検証を行ってきた。さらに2年間で得た結果から、より精度の高いヒト心不全発現プロファイルの作成の必要性が生じ、本年度にRNAシーケンスとmicroRNAアレイを行い、興味深い発現挙動を呈するRNA分子の単離に至った。以下に本年度明らかとなった2つ事象について研究結果を記す。

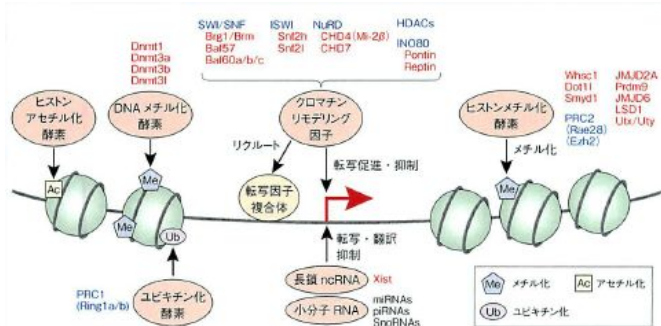
心筋再生を促進し心機能を向上させるクロマチン因子：心筋再生能および心機能向上に寄与する因子の一つとしてクロマチン構造変換複合体の補因子であるBAF60Cの同定に至った。心筋切除法という後天的な心臓再生モデルを樹立し、この手法を用いて心筋再生時に亢進する遺伝子を探索した結果、心筋再生時にBAF60Cの発現が亢進していた。siRNA法を用いてBAF60Cの機能阻害を行ったところ、siBAFでは心筋再生を阻害することが明らかとなった。クロマチン因子BAF60Cは細胞増殖遺伝子・血管新生因子のヒストン修飾をアセチル化し、炎症系遺伝子のヒストン修飾をメチル化する作用があることも明らかとなった。加えて、BAF60C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（Nakamura, Koshiha-Takeuchi et al., *in preparation* 2014：特許申請協議中）。ChIP解析系も立ち上げ、心筋再生には特定の遺伝子ゲノム上の特異領域におけるクロマチン構造の変換およびヒストン修飾変化が重要である事が示唆された。

心不全前段階で発現変化するncRNAおよび性差特異的なmiRNAの単離と作用機序：心不全発症のリスクファクターの特定の為に、急務を要するカテゴリー：陳旧性心筋梗塞(OMI)発症歴と不整脈源性右室心筋症(ARVC)に焦点を当て、既に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シーケンスとmiRNAを遂行し発現プロファイルの作成を目指した。本研究では既に、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、RNAシーケンスより心臓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分子を抽出した。その結果、興味深い発現動向をする数種のlncRNAの同定に至った。

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）

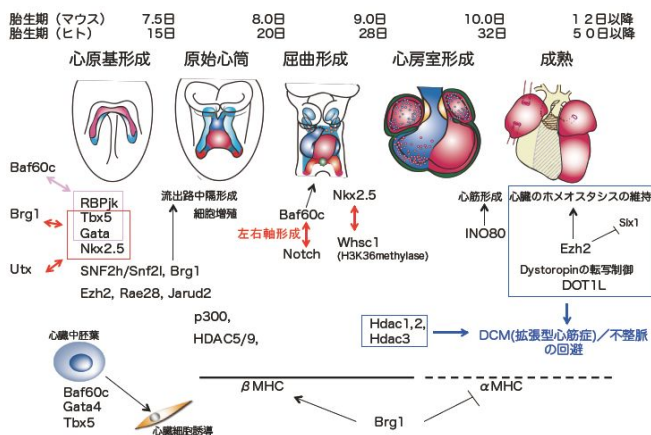
【A. 研究目的】

心臓には恒常性を維持するメカニズムが存在し、生理的に機能する。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、細胞壊死などの疾病を生じ、心不全へ至る。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。本研究は2年間の研究において、ヒト先天性心疾患の研究を元に、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、肥大化回復を目指した報告は乏しい。非遺伝性の心肥大におけるクロマチン、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を得られ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プロ



ファイル作成することにより創薬研究への発展や(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	網膜血管の損傷、肉柱形成、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)	ルーピング異常、心筋形成、収縮力低下
	Baf45c	ノックダウン胚(ゼブラフィッシュ)	ルーピング異常、収縮力低下、筋繊維の錯綜
	Baf60c	心臓特異的欠損マウス	ルーピング異常、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 (ゼブラフィッシュ胚)	非心臓性中胚葉から成熟心臓への分化を誘導
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)	心筋過形成	

(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。)

エピジェネティック因子の機能の統括的な理解に重要であることを意味し、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期待される。本年度は、ヒト心不全患者をより限定して心生検を精査し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 RNA 分子の特定とその作用機序を明らかにする。そのために3つのテーマを掲げて取り組む。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する。その中から、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。抑制因子または心機能向上因子となり得る RNA 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

ネットワー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：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クロマチン因子BAF60Cの機能機序を明らかにするべく心臓切除法を立ち上げる。心筋再生能を高める因子としての可能性を見いだす。RNAシーケンスからBAF60Cを抑制する因子及び拮抗する因子を選出する。

2：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（60-69歳台、70-79歳台、80-89歳台、90歳以上、59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關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關する法律（研究機関等における動物実験等の実施に關する基本指針、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關する基本指針など）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關しては、共同研究先に委託する。

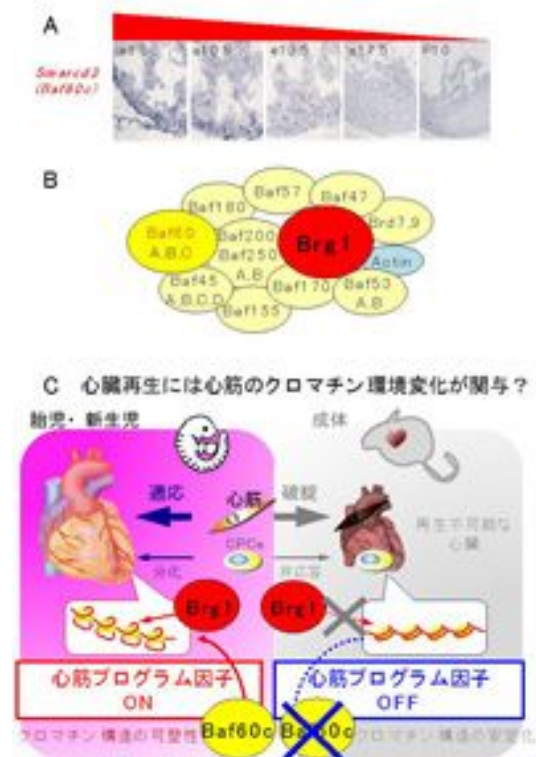
【C．研究結果】

研究結果 1：心筋再生と心機能向上を目指したアプローチ

1 A:心臓再生因子としてのクロマチン因子BAF
哺乳類の心臓は再生不可能と考えられていたが、

マウス新生児数日以内ならば心筋のみならず心機能も回復することが報告された(Porrello et al., **Science** 2011)。ヒト心筋においても毎年 1%(10歳代では約 2%、70歳代だと 0.5%)が renewal されている (Bergmann et al., **Science** 2009)。しかしながら、どのような因子が心臓再生に關わるのかについては明らかにされていない。また、心臓再生に關わる主たる細胞は心筋細胞とされているが、他の細胞の關与についてはよく分かっていない(Kikuchi et al., **Nature** 2010)。

先行研究において行われた心臓発生の各段階における遺伝子発現プロファイルの中から、哺乳類再生能低下のタイミングに一致した発現パターンを示す、胎生期に高く発現し成体になるに従って減少するエピジェネティック因子の探索を行った。その結果、転写活性型クロマチンリモデリング複合体構成因子の一つ Baf60c が、マウス胎生期心臓発生過程における心筋増殖時期に非常に強く発現が確認され、生後 10 日目には完全に消失する (図 3 A)。



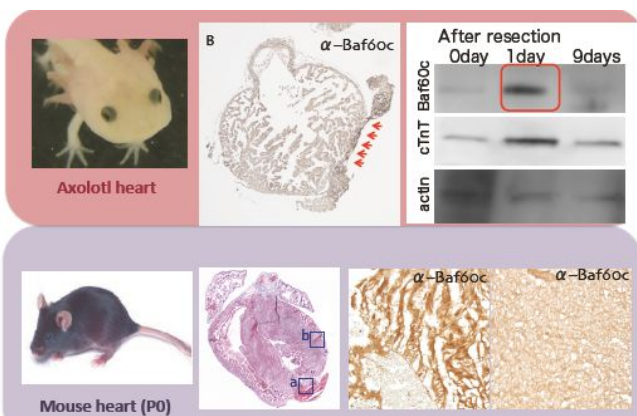
(図 3 : (A)マウス左心室における Baf60c の発現パターン。(B)クロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF-BAF 型複合体の模式図。(C)本研究仮説：クロマチン構造変換が心臓再生能向上に大きく寄与していると考えられる。)

興味深いことに、H23 年度本研究においてクロマチン因子である Brg1-Baf60c の心臓特異的強制

発現系(BAF-TG)マウスを作製したところ、心筋梗塞後の心不全を抑制する結果を得ており、この結果は心臓再生においても BAF 因子の発現が寄与する可能性を示唆している。つまり、哺乳類では発生に伴い、Baf60c の発現が消失するとともに心筋遺伝子及び再生に必須な遺伝子群制御領域のクロマチン構造が解かれなくなり、再生に寄与する遺伝子の発現が抑制されていく、と考えられる(図3C)。この仮説を検証するために、心臓組織からのChIP(クロマチン免疫沈降)を立ち上げ、マウス心臓再生モデルを樹立し、心臓発生時における心トロポニン制御領域における ChIP 解析を行った。さらに、本年度では、再生時における BAF 因子に着目し実際に心筋再生および心機能回復を目指したアプローチを行った。

1 B:心臓再生時に発現亢進するBAF

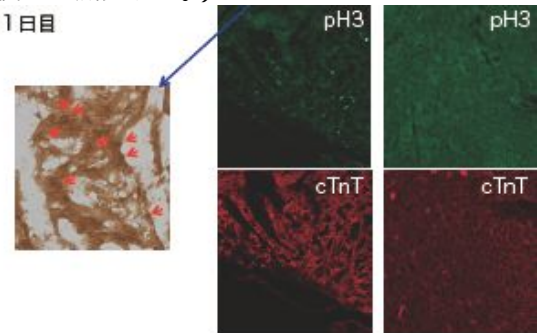
はじめに、再生能力の高い有尾両生類の心臓再生時、および、マウス心臓再生可能時においても、一過的にクロマチン因子 Baf60c の発現亢進が生じるのか調べた(図4)。その結果、両生物において再生能が維持されている時期では Baf60c の発現亢進が見受けられ、心トロポニンの発現も同様の挙動を示すことが確認された(図4・図5)。心トロポニンの発現が亢進している細胞群では細胞増殖マーカーとなる pH3 陽性細胞が多く存在することから、クロマチン因子 Baf60c の発現が亢進すると増殖活性を持った心筋が生じることを意味する。



(図4：再生能の高い有尾両生類アホロートルとマウス新生児での心臓切除後のBAF60Cタンパク質の蓄積。B:切除後1日以内にBAF60Cタンパク質の亢進が見受けられる。下段：マウス新生児における心臓切除実験においても同様にBAF60Cの亢進が見受けられる。BAF60Cの発現誘導は切除部位近傍(a)であり、遠部(b)

では誘導されない。右上：BAF60Cタンパク質は心臓切除9日後には減少する。)

心室切除後1日目

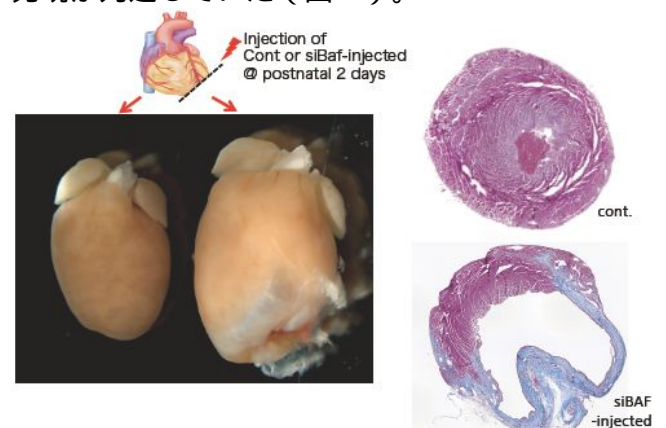


(図5：図4でBaf60cが亢進していた領域では、増殖活性(pH3陽性)が亢進している心トロポニン(cTnT)の存在が多く確認された。)

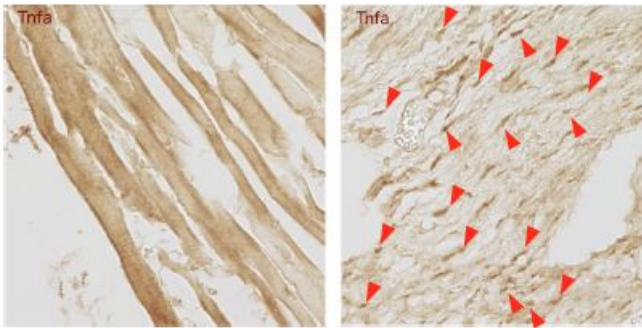
1 C:siBAFにより心臓再生能が抑制される

次に、Baf60c の機能を阻害した場合、心臓性能に及ぼす影響を調べた(図6)。本研究では siRNA (以下 siBAF)を用いて BAF60C の機能阻害系の確立を試みた。siBAF を心臓切除時に同時に投与し切除後4週間飼育したところ、siBAF を投与されたマウスでは心臓再生能の低下が見受けられ、線維化が生じていることが示された(図6)。この結果は、BAF60C の存在が心筋再生能の維持に深く関与している証拠であると考えられる。

この時期に発現変化する遺伝子を探索をしたところ、再生時に深く関与すると推測されている胎児期遺伝子 Gata4/Tbx5 の発現減少、および心筋マーカー遺伝子の発現の極度な減少が見受けられた。一方、興味深いことに、炎症系因子 TNF α の発現が亢進していた(図7)。



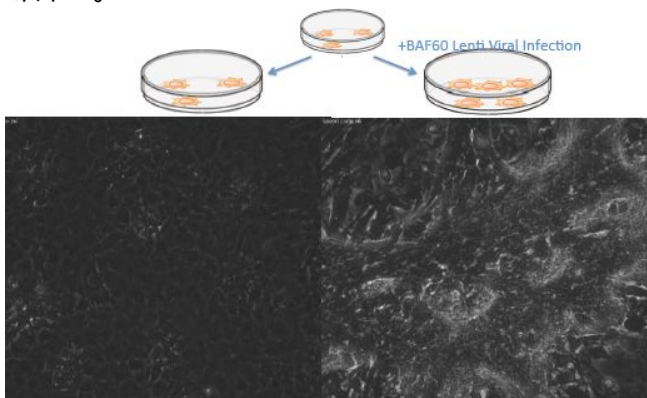
(図6) siBAFを投与すると、心筋再生が阻害され、結果として線維化様形態が形成される(右下)。siBAFはlife technologyより購入、導入部位の確認のためにEGFP発現プラスミドと共遺伝子導入を行っている。



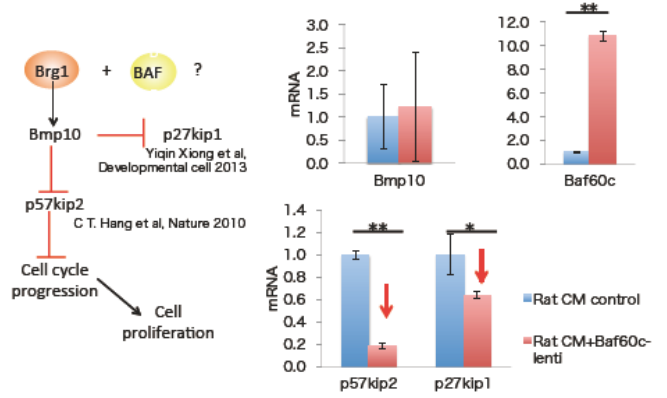
(図7)左:再生が進んだコントロール心臓。右:siBAF投与された心臓ではTNF α タンパク質の蓄積が見受けられる。茶色の固まりはTNF α が蓄積された心筋。左のコントロール心臓で見受けられる薄茶色はバック。

1D:BAF強制発現では心臓再生能が亢進する

レンチウイルスを用いて心筋初代培養系におけるBAFの強制発現を試みた。BAF60Cをラット新生児心筋に強制発現させると心筋増殖活性が亢進し、線維芽細胞の増殖に負けず、心筋シート様構造まで形成することが明らかとなった(図8:慶應大学医学部循環器内科福田恵一教授との共同研究)。細胞内での遺伝子発現変化についてqPCR法を用いて調べたところ、細胞増殖抑制因子であるp57kip2およびp27kip1の発現が減少していた。これらを誘導するBmp10の発現は変化していないことから、BAF60Cは核内でp57kip2およびp27kip1の発現を抑制することで心筋細胞増殖を活性化していると考えられる(図9)。この結果は、活性化機能しか持ち合わせていないと考えられていたBAF60Cが抑制制御も行っているということを証明し、新しい機能を見いだした点でも興味深い。

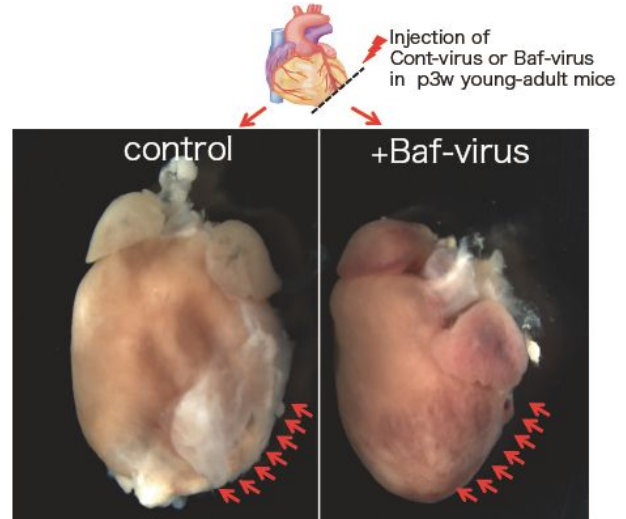


(図8)ラット新生児心筋を用いたBAF60Cの強制発現。左:通常的心筋培養ではコロニーは形成するものの、心筋増殖より線維芽細胞の増殖活性が高い。右:BAF60C投与された心筋初代培養では線維芽細胞上にシート様構造の拍動を伴った機能性心筋が形成される。



(図9)細胞増殖抑制因子としてのp57kip2/p27kip1シグナルカスケード。両方の遺伝子発現が顕著に抑制されている一方でBmp10の発現変化無い。これによりBAF60Cは特定の遺伝子を制御していることが分かる。

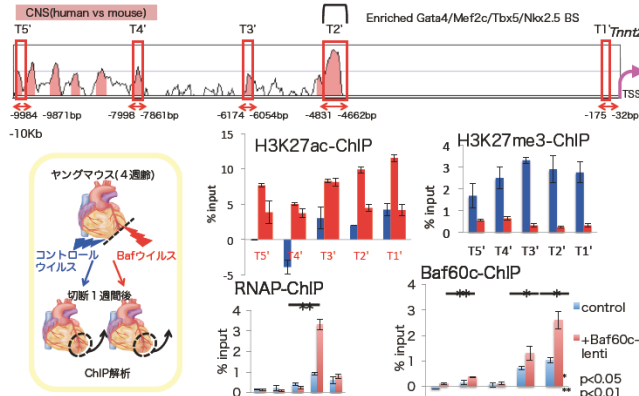
生体においても同様にBAF60cの強制発現を行い、心筋再生能に与える影響を調べた。通常、心臓切除法を用いた心臓再生実験では生後7日以降に再生能力が消失し、繊維化が生じる。しかしながら、レンチウイルスを用いてBAF60Cを強制発現した心臓では、出生後3~4週齢の若いマウスにおいても繊維化は確認されず、心臓再生能が維持されていることが明らかとなった(図10)。



(図10:出生3週齢目に心臓切除後、4週飼育されたマウスの心臓。通常では繊維化が確認される(左:白い部分)。BAFレンチの強制発現された心臓では形態の異常がほぼ確認されないほど、状態良く再生されていた。)

次に、BAF60C投与による心筋再生の活性化にプロモーター・エンハンサー領域のゲノム変換が伴うのか、遺伝子発現変化をqPCR法を用いて解析するとともに変化した遺伝子についてはChIP法を用いてゲノム構造を解析した。その結果、幾つかの心筋遺伝子プロモーター領域でエピジェネ

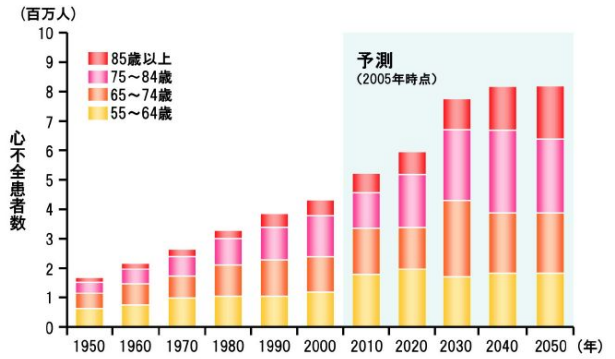
ティックな変化を見出した(図 1 1)。すなわち、一連の結果から再生能力低下の原因は、心筋細胞の成熟に伴いクロマチン構造が安定化されたことによる転写環境の変化(閉塞)と考えられる。現在、投稿に向けて共同研究者との協議中である(Nakamura, Koshiba-Takeuchi et al., *in preparation* 2014:特許申請に関しては、東大TLOと協議中)



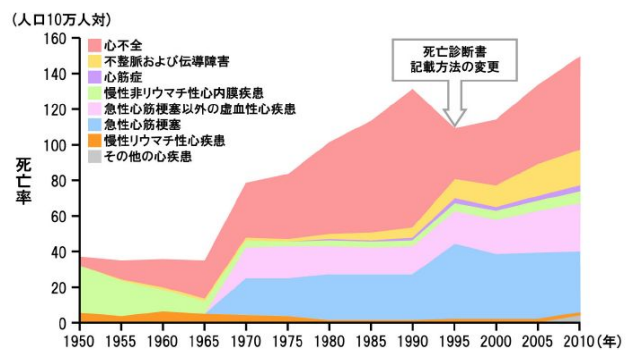
(図 1 1) BAF60C依存的にヒストン修飾変換されるTNNT2(心トロポニン)ゲノム領域。BAF60Cを投与時の心トロポニンのプロモーター領域では、ヒストンH3K27のアセチル化が亢進し、トリメチル化が抑制される。ポリメラーゼIIが効率よくリクルートされ、その領域ではBAF60Cタンパク質もリクルートされている。青：コントロール心臓、赤：BAF60C投与心臓。

研究結果 2：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

慢性心不全は米国で約 650 万人(図 1 2)に上る。また日本では、心疾患による死亡者の約 45%が心不全を原因としており(図 1 3)、全体死亡者の 8%(平成 21 年度厚労科研白書)を占めている。このようなことから心不全への移行をプロテクトする、または緩和させるアプローチの開発が急がれている。心不全については多くの基礎研究がなされているが、遺伝要因、リスクファクター等様々な要因が複雑に関与して発症するため、原因究明が困難とされている。本研究は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により、詳細なカテゴリー分け(性別/年齢/既往歴)とエピジェネティックな制御機構の関連性に着目し心不全の発症原因の解明を目的とする。得られた結果は臨床応用へ貢献可能な意義のあるものと考えられる。



(図 1 2) 米国における心不全患者の推移および予測
Bristow MR and Lowes BD. Management of heart failure. In Zipes DP eds. Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine, 7th ed, Elsevier Saunders, Philadelphia, p603-624, 2005改定



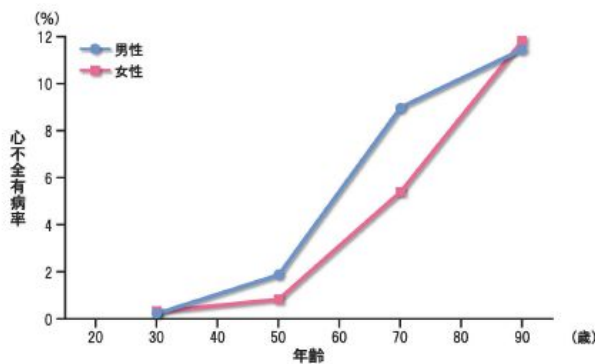
(図 1 3) 国内の各心疾患の死亡率の推移
1950~2005年: 厚生労働省 人口動態調査報告2007年改定
2010年: 厚生労働省 人口動態統計2011年

心筋は成熟に伴い細胞分裂や増殖、及び環境の変化に対抗する能力を失っていく。それが可塑性の脱落と考えられている。可塑性な機能の消失は、心不全に移行するリスクとなりうる

心筋の可塑性の維持にはクロマチン因子 Baf60c が必要であるという結果を報告してきた(本研究結果; 上記概既述; Takeuchi&Bruneau., *Nature* 2009)が、Baf60c を制御する因子については未だ報告されていない。さらに、40~75 歳までの心不全発症率は男性が 2 倍高いが、そのような男女差が生じる原因は全く未解明である。(図 1 4: 女性赤色/男性青色)。その理由として遺伝子発現解析では男女差が見受けられず判別が難しい点や、ヒトでは様々な要因(喫煙/肥満/糖尿病/遺伝...)が複雑に絡み合っており、各々別個に統計を作製する必要があると考えられる。

以上のことから、本研究のマイクロアレイ解析はスクリーニングとしての使用は可能であるが、粗データである可能性が高い。よって、心不全キー因子を単離・同定するには、まずは上記要因を加味して詳細なグループ分けを行い、それぞれのグループにおける RNA シーケンス、microRNA

アレイ、ChIP シーケンスからバイオインフォマティクス解析を行い比較解析することが求められる。



National Health and Nutrition Examination Survey(2005-08), National Center for Health Statisticsより作成

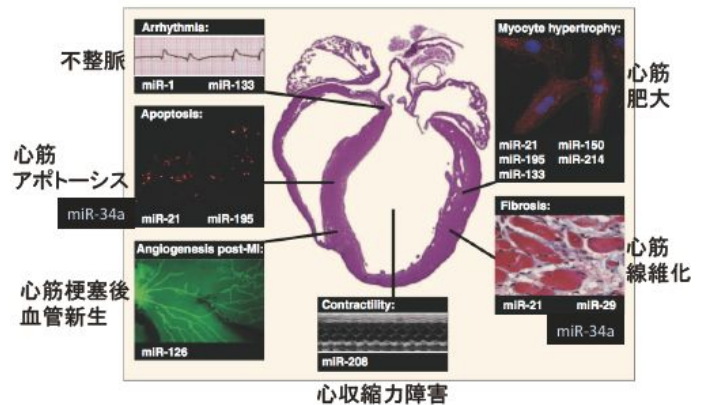
(図14) 40~75歳までは男性が女性より2倍高く心不全を発症する。この差は陳旧性心筋梗塞(OMI:男女比=2:1)発症歴と心筋症(主に右源性心筋症RVC:男女比=3:1、及び左室緻密化障害:男女比=2:1)の発症に起因すると考えられる。では、この発症率の相違は男女間心筋のどのような違いから生じるのであろうか?

本研究4では、ヒト心不全を理解する上で急務を要するカテゴリー: 陳旧性心筋梗塞(OMI)発症歴と不整脈源性右室心筋症(ARVC)に焦点を当て、遺伝子解析(miRNAアレイ/RNA-seq)とプロテオーム解析を用いることによって、研究を遂行してきた。

1: miRNAアレイからの候補因子の選出

本研究は、ヒト心不全を理解する上で急務を要するカテゴリー: 陳旧性心筋梗塞(OMI)発症歴と右室心筋症(ARVC)に焦点を当てエピジェネティック研究を行っていく過程で、RNAサイレンシングが疾患発症の大きなリスクファクターになっていると考えた。RNAサイレンシングは細胞の恒常性の維持に関与していると言われている。miRNAと疾患の関係について、最も研究が進んでいるのは癌の分野であるが、近年、miRNAと心疾患の関係も報告されている。図15に示すように、miR-29が関与する心臓の繊維化(van Rooji E et al., PNAS 2008)やmiR-34が関与する心臓の老化(Boon RA et al., Nature 2013)などが例として挙げられる。しかし、miRNAと心疾患の性差に着目された研究は行われていない。本研究は、様々な原因により心不全が引き起こされるが、男女では心不全の引き金となる心筋の異常にmiRNAの挙動やその後の発現制御の影響が異なると考えている。そこで、miRNAマイクロアレイおよびRNAシーケンスを用いてヒト心不全患者の心筋組織のトランスクリプトーム解析を行うことにより、心不全発症にお

ける性差と男女間のmiRNA発現の違いの関係性を調べる。また、それによって得られた情報をもとに、病態解析の進んでいない不整脈源性右室心筋症などの発症にエピジェネティックな修飾がどのように作用しているか明らかにしていく。



(van Rooij E et al. Circ Res. 2008)

(Reinier A. Boon et al. Nature 2013)

(図15) 心肥大・心不全発症に関与するとされるmiRNA群。しかしながら、性差・年齢と心不全を結びつけるmiRNAの報告は無い。

70歳代男女の心不全発症患者の心筋(東京都健康長寿医療センター研究所にて採取した病理組織)からmiRNAアレイを行ったところ、男性と女性共通に発現変化するmiRNAのみならず、性別により異なった発現変化するmiRNAが存在することが明らかとなった(図16)。図17に示すように、着目した4因子のうち、2因子については心臓研究以外での報告がなされている。これまでの国内外の研究から男女心不全患者におけるRNA分子の発現異常について研究報告された例は無く、本研究で初めて報告する。心不全の治療法としては、患者の心臓機能を悪化させず、できる限り心不全悪化をプロテクトする方法を立ち上げ、かつどれだけ緊急に回復させるかが重要課題であると考えられる。この先行研究結果は、男女間で心不全に至る過程で異なる発症メカニズムが存在する可能性を示唆しており、さらには心不全緩和に向けた男女別創薬研究に大きく貢献するものと考えられる。

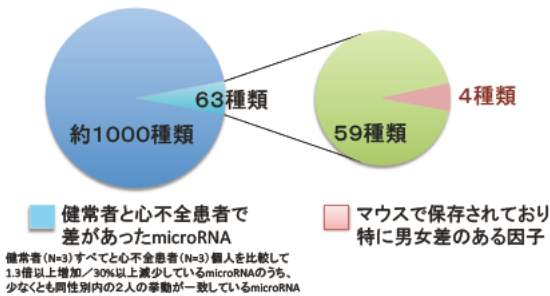
2: 心筋再生因子Baf60c機能阻害因子の探索

次に、心筋再生の重要因子であるBaf60cについて成体における発現を抑制する因子を同定する。その阻害作用を解除することにより、心筋の可塑性の回復に繋がると考えられることからこの単離研究が急務であると想定される。上記スクリーニ

ングの結果から miR182 を含む複数の microRNA が単離された (図 30)。miR182 は心臓発生が進むにつれて発現量が増し、Baf60c の発現と相補的であることから、Baf60c 抑制因子として非常に期待される。

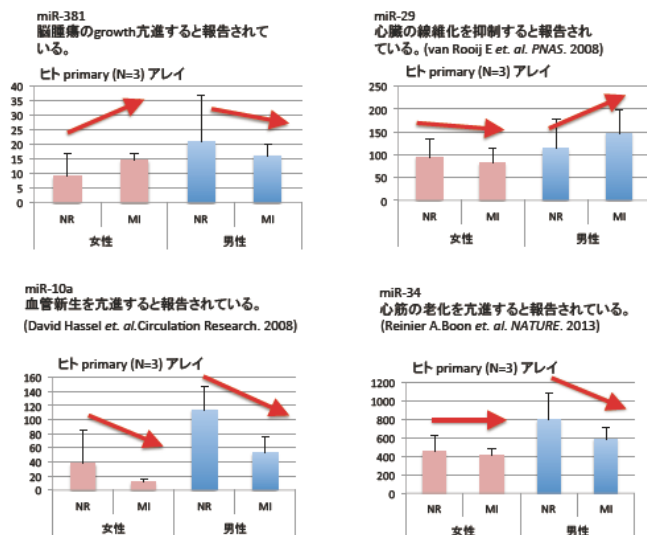
ヒトのmiRNA(約1000種類)から心不全患者で性差のあるmiRNAをアレイデータを元にスクリーニングした

ヒト primary (70代)		
健常者(NR)	男性	N=3
	女性	N=3
心不全患者(MI)	男性	N=3
	女性	N=3

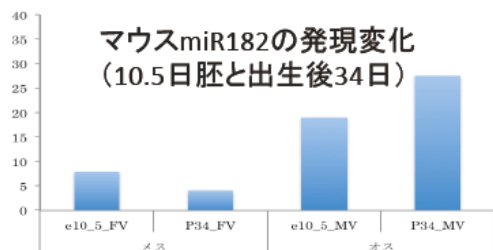


- ・ 健常者と心不全患者でmiRNAの発現パターンが異なるmiRNAがある
- ・ 心不全患者でも男女で発現パターンが異なるmiRNAがある

(図 16) ヒト心不全 miRNA アレイで単離された1000種類の候補 miRNA から、ヒト・マウス・ラット間で保存され、かつ発現量に性差のある miRNA。



(図 17) 性別によって発現変化応答が異なる miRNA 因子。ヒト・マウス間のみでも再探索する必要があるとも考えられる。



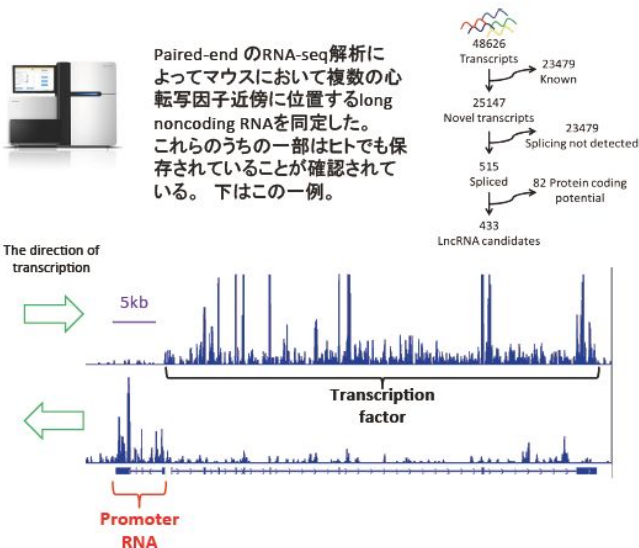
(図 18) マウス胎児期と出生後における miR182 の

発現変化を追跡すると雌雄によって発現パターンが異なる。BAF の発現も雌雄によってことなる。

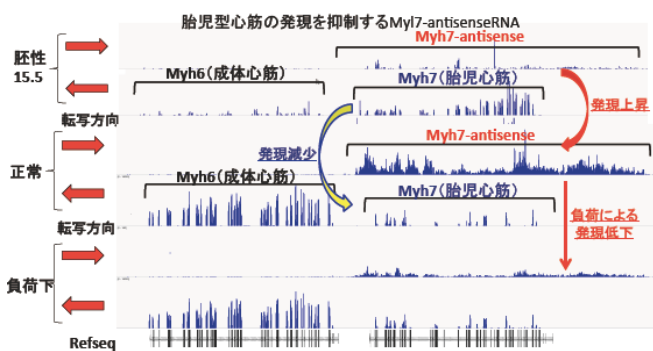
3: RNA シーケンスを用いた ncRNA の単離

組織からの RNA 抽出はナカライテスク社の Sepasol-RNA I Super G(1)を用い、クリーンアップに Macherey-Nagel 社の Nucleospin RNA XS を用いた。cDNA ライブラリ作成は rRNA など total RNA から取り除く kit である Epicentre 社の Ribo-Zero Gold (Human/Mouse/Rat)と、Illumina 社の Truseq Stranded mRNA sample prep kit を用いた。これにより、どちらの鎖から RNA が転写されているかを知ることが可能である。Illumina Hiseq 2000 を用い、シーケンス長 101 base、Paired-end read でシーケンシングを行った。Paired-end とは cDNA ライブラリの各フラグメントに対し、両端からシーケンスを行うことであり、Single-end の場合に比べてはるかに詳細で正確な転写産物の再構成が可能である。遺伝子発現変動解析ソフト Cuffdiff を用い、gene model を再構築するソフトウェア Cufflinks による転写産物の再構成の結果、全サンプル合わせて 48,626 個の転写産物単位を得た。この内、Refseq 中の既知遺伝子と一致するものが 23,479 個であり、残りの 25,147 個は未知転写産物と考えられる。更にこの未知転写産物の内で、Splicing が検出され、タンパク質に翻訳されないと推定されるものが 515 個存在した。Splicing を機能的な lncRNA の基準の一つとしたのは、既知の機能的な lncRNA のほとんどが splicing を受けていること、splicing を検出できない程度の発現量/read 数の遺伝子は実際に機能解析を行うことが難しいであろうと考えた。また、翻訳能に関しては *ensembl* の基準に従い、ORF が全長の 35%以上のものを翻訳され得る

(<http://asia.ensembl.org/info/genome/genebuild/ncrna.html>)。82 個がこれに該当し、残る 433 個が心臓において機能する lncRNA の最終的な候補となった。発現量の比較により lncRNA 候補の発現を発現量変化が 4 倍以上であるものを 83 個同定した。この内、Sham との比較でも変動していると判定されたものを 6 個同定した (図 18 参照)。その中で、心負荷により発現調節を受ける ncRNA を同定した (図 19)。



(図19) バイオインフォマティクス解析を用いた ncRNA スクリーニング



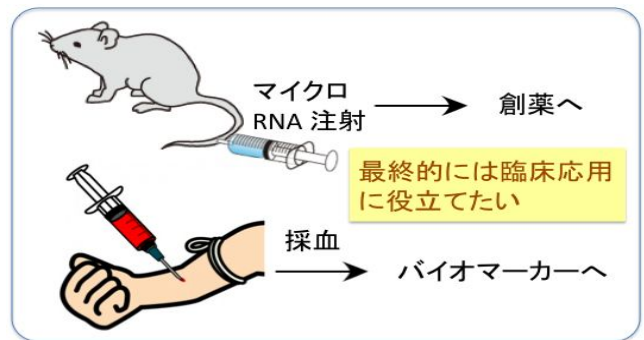
(図20) 心筋成熟に伴って発現亢進するMyl7ncRNA

【D. 考察】

本研究により、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、それぞれの機能が明確化されてきた。これら因子が心臓発生に重要な機能を担っていることを報告し、モデルマウスをプロデュース出来た。しかしながら、単離されたすべての候補因子について研究論文としてまとめることまでには至らなかった。今年度に Brg1 KO (平成 24 年度報告)、Baf60c 恒常発現解析、Dnmt1 KO (平成 24 年度報告)、miRNAs に関する研究を発表することを目指す。さらに、どの程度特定のゲノム構造に変化をもたらすのか、ChIP シーケンスを用いた解析系を立ち上げる必要性があり、今後の中心的な課題である。

さらに今後の課題は、どのようにして心筋再生能を高めるか、また恒常因子を見いだすのか、であると考えている。本研究により Baf60c が心筋の増殖活性を亢進し、炎症作用を抑制するなど萌芽的な結果が見いだせた点は大きい。Baf60c がどの

ようなシグナルまたは因子によって誘導を受け、また発現抑制されるのか課題が残されたが、本研究によって単離された miRNA は一つの候補であると考えている。



(図21) miRNA を用いた臨床応用概念図

本研究期間内に生じた疑問を発展させて、詳細にグループ分けをした心不全患者プロファイルの作成に成功したことにより、男女で発現の異なる miRNA が存在することを見出した。マウス・ラット間においても保存された miRNA が存在し、かつ、発生過程においても興味深い発現変化をしていることも明らかとなった。本研究結果により、miRNA の発現にのみならず、ゲノム修飾や構造変換においても性差の相違が存在すると思われる。ChIP シーケンスを駆使することで、性差により発現の異なる遺伝子や ncRNA の存在理由という本疑問を紐解けるものと考え、今後の課題の一つとして取り組む。

本研究で作製されたモデルマウスは疾病研究に有効である。本年度内に全てプロデュースすることを目指す。それとともにバイオインフォマティクス解析系を立ち上げられた点は、今後のゲノム解析において有意義な研究を期待できる。両結果は、本研究により構築できた点であり、ヒト心不全で発現変化する miRNA に関しては早急にプロファイルし国際論文に報告する。

性差医学に貢献することにより、男女別の創薬・処方提案できる。現在、心不全を軽減する製剤として利尿薬やジギタリス製剤が一般的に使われているが、有効な治療薬ではない。また、男女の薬効の差を考慮したものでもない。しかし、本研究により、男女で選べる治療法を新たに提案することができる。本研究を成し遂げることにより、生物学的特性の理解や、診断・治療・病態把握・予後予測といった臨床応用の現状と問題の解

決に役立つと考えられる。

【E . 結論】

今まで、再生研究は様々な視点から研究がなされてきたが、クロマチン環境変化に着目して再生メカニズムを理解する研究は行われてこなかった。本研究により、再生過程においてクロマチン環境は刻々と変化していることが分かり、クロマチン環境変換を引き起こす分子機構解明から心筋再生能の向上を目指す本研究は、独創的であり、心臓再生現象の理解のみならず他器官における再生現象の理解に貢献できると考える。今後は、*in vivo* ChIP-seq法を立ち上げ、ゲノムワイドに標的領域を絞り込み、心筋再生向上因子の網羅的な転写調節領域の解析を行うことを目指していきたい。さらに本研究では、心臓再生に寄与する生体内機能因子の同定のみならず、再生環境の向上させる生理活性物質の単離を試みた。これらの心臓再生可能時と不可能時のクロマチン構造変換の網羅的な解析の成果は、先天的な心臓病における心筋再生能力向上および後天性心疾患を引き起こす制御領域の発見への応用につながる可能性を秘めており、さらに、心筋再生環境を整える因子の発掘は、心筋梗塞患者の予後を救い、心不全をプロテクトする手法になると考えられ、再生医学に大きなインパクトを与えると期待している。

【F . 研究発表】

1 . 論文発表

(1) Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone*,60:68-77, 2014

2 . 学会発表

A : 招待講演

- (1) 竹内純、哺乳類心臓再生能力が維持されるには？、第91回日本生理学会大会(鹿児島)、2014.3.17
- (2) 竹内純、ヒト心疾患発症に関わるエピジェネティック因子群と心不全予防を目指して、第17回日本心血管内分泌代謝学会(大阪)、2013.11.22
- (3) 竹内純、哺乳類心臓再生が維持されるには？、

第35回日本心臓生検研究会(東京)、2013.11.3

- (4) 竹内純、heart cell survival by defined factors., European Society of Cardiology (ESC) Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 (Berlin, Germany), 2013.9.27
- (5) 竹内純、心臓再生はどのようにして可能となるのか？、日本動物学会第84回岡山大会2013(岡山)、2013.9.26
- (6) 竹内純、エピゲノムからみた心筋生存と心臓再生 -どうすれば強い心筋が生まれるのか？-、Merk Millipore BioScience Forum 2013 (東京)、2013.9.10
- (7) 竹内純、心疾患発症重篤化とエピジェネティック因子の制御、第53回日本先天異常学会学術集会(大阪)、2013.7.21
- (8) 竹内純、Heart cells survival by the defined factors., 第7回TAKAO International Symposium (東京)、2013.7.15
- (9) 竹内純、心臓の機能的再生におけるクロマチン変換とゲノム修飾、第28回難病治療研究会(東京)、2013.7.10
- (10) 竹内純、細胞の個性が決まるとき、運命が変わるとき、大阪大学生命機能研究科セミナー、2013.4.30

B : 関連発表

- (1) 塚原由布子、竹内純、心筋リプログラムにおける心筋タイプ特異的な誘導方法の検討、第13回日本再生医療学会総会(京都)、2014.3.4
- (2) Kazumi Hirabayashi, Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Hiroe Sugizaki, Hatsune Makino, Kazuko Koshihara-Takeuchi, Jun K. Takeuchi, Origin and specification of pacemaker cells in murine heart., 第36回日本分子生物学会年会(神戸)、2013.12.4
- (3) Ryo Nakamura, Kazuko Koshihara-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Tetsuya Asano, Yutaro Hori, Yuki Ando, Mizuyo Kojima, Testushi Furukawa, Hesham A Sadek, Jun K Takeuchi, Epigenetic regulation promotes mammalian heart regeneration., ISHR (国際心臓研究学会) (San Diego, USA), 2013.6.29
- (4) Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Andersen, Junko Kurokawa, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Tetsushi Furukawa, Chulan Kwon, Kazuko Koshihara-Takeuchi & Jun K. Takeuchi, A novel defined factor specifies

cardiac-vascular cell fate and promotes heart regeneration 新規転写因子による心臓 - 血管運命決定と心臓再生、第46回日本発生生物学会大会(島根)、2013.5.29

(5) Yuika Morita, Kazuko Koshiba-Takeuchi and Jun K. Takeuchi, Direct Differentiation from Pluripotent Stem Cells to Cardiac Lineages by Defined Factors., 2013 Weinstein Conference (Arizona, USA), 2013.5.17

【G. 知的財産権の出願・登録状況】

1. 特許取得

現在、東大TLOと協議中。

2. 実用新案登録

該当事項無し。

3. その他

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

2013 東京都立青柳小学校サイエンス教室

2014 東京都立小日向小学校サイエンス教室

2014-現在 日本発生生物学会 ポスドク問題ワーキンググループ委員

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
堀優太郎、 森下環、中村遼、 小柴和子、竹内純	エピジェネティック因子 と心臓発生・心疾患		エピジェネテ ィクス キー ワード事典 (実験医学)	羊土社	東京	2013	192-200

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
Koshiha-Takeuchi K, Morita Y, Takeuchi JK.	Heart cells survival by defined factors.	Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease (book) by Springer (in press)			2014
Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirodome-Fukuda Y, Inoue E, Yuta T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y.	Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice.	Bone	60	68-77	2014