

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

. 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
. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
. 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）

・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。

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）。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。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。

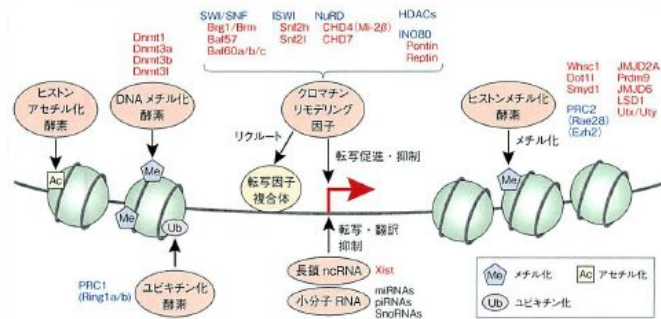
本研究結果は、心臓における代謝が損なわれると特異的クロマチン構造も変化することを示しただけでなく、これらの遺伝子を効率良く利用することにより、心筋再生や心機能向上が期待されることを見いだした（Nakamura, Koshiba-Takeuchi et al., *in preparation* 2014）。本研究において単離されたRNA群はヒト後天的な心肥大、心筋症モデルマウスや不整脈モデルマウスとなるだけでなく、創薬標的としての可能性が高く、今後RNA群の機能解析において研究を展開していく。

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）

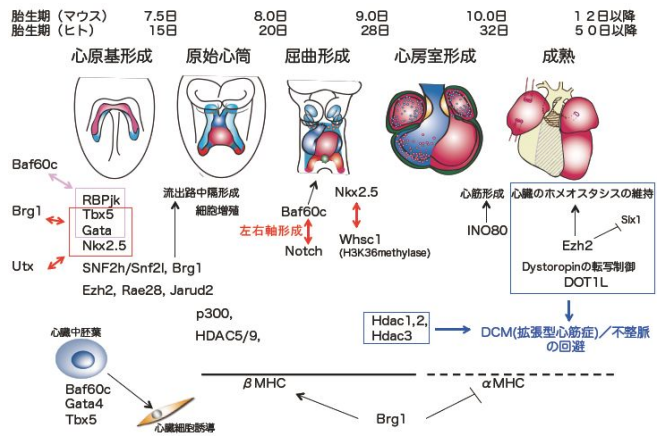
【A. 研究目的】

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。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あるが、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	肺動脈血管の増大、肉柱低形成、胎生致死E10.5-11.5
		Baf180	生種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)	ルーベング異常、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	ルーベング異常、心室形成、流出路の短縮、胎生致死E10-11
	Baf180	生種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	
	INO80	Pointin, 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。

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に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。

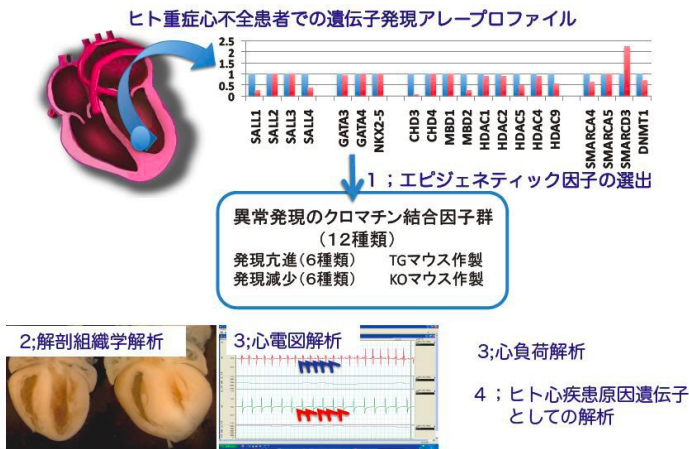
本研究は、ヒト心不全患者の心生検からの遺伝子発現プロファイルを作成し、そのバイオインフォマティクス解析から不整脈、心肥大を引き起こす可能性のあるエピジェネティック因子の特定とその作用機序を明らかにすることである。そのために3つのテーマを掲げて取り組む。ヒト心不全患者において発現変化しているヒトエピジェネティック因子の発現プロファイルを作製しゲノム領域を特定化する。その中から、候補因子の遺伝子破壊マウスまたは遺伝子過剰発現マウスを作製し、心負荷実験及び心筋梗塞を発症させ、組織学解析と生理学評価を行う。抑制因子または心機能向上因子となり得る小分子の探索及び合成を目指す。本研究終了までには広く研究者、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

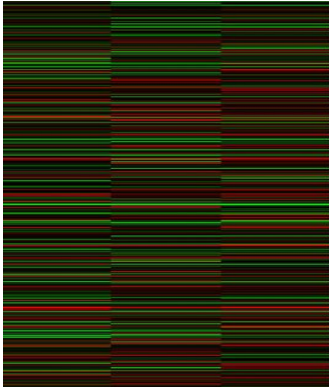
(倫理面への配慮)

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)。

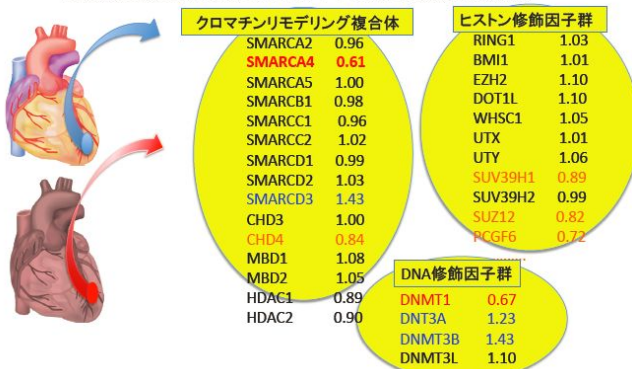


(図4)左から順に疾患サンプル3検体である。緑が健常サンプルに比べて発現量が上昇した遺伝子、赤が発現量の低下が見られた遺伝子である。

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

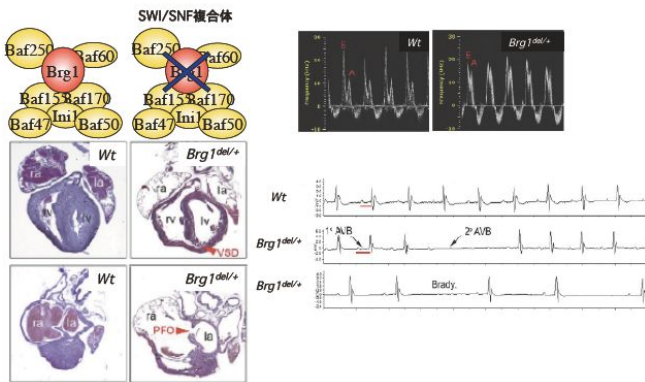
上述した結果1で単離されたエピジェネティック遺伝子について遺伝子破壊マウス作出および強制発現解析を行った。結果1で作成されたプロファイルを基に、本研究は心不全発症を亢進させる可能性のあるエピジェネティック因子として、

SWI/SNF-BAF クロマチンリモデリング複合体(特にSmarca4(Brg1)とSmardc3(BAF60C)、DNA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、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。

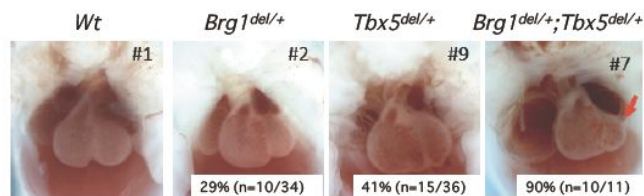
SWI/SNF-BAF複合体

-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

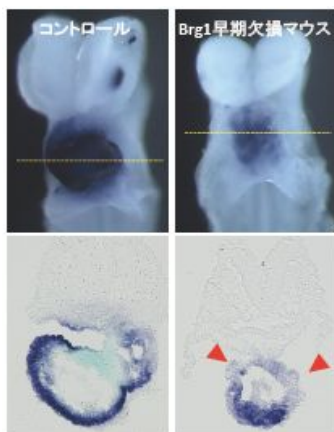
先天性心疾患発症にはクロマチン因子の発現レベルが重要である。クロマチン構造変換複合体コアタンパクSmarca4(Brg1)は心不全患者で40%減少している。この意味を理解する為にBrg1flox/floxマウスとEIIAcreマウスと交配し、Brg1del/+ (Brg1欠損)マウスを作製した。Brg1del/+マウスは拡張型心筋症の発症のみならず、不整脈と洞房機能不全を呈していた(図6：Takeuchi et al., *Nature Commun.* 2011)。さらに興味深いことに、Brg1del/+マウスの30%程度において左室低形成が見受けられ、心臓転写因子TBX5の異常によるヒトHolt-Oram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)。



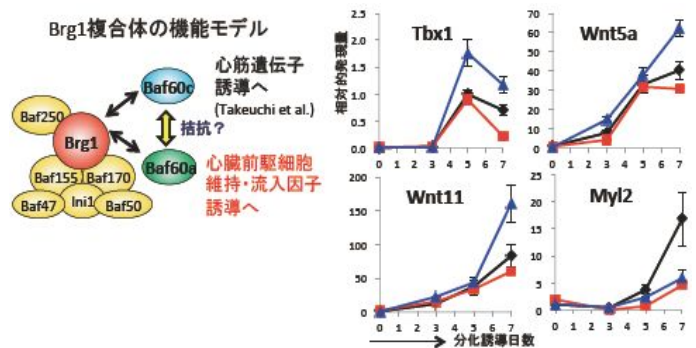
(図6) クロマチン構造変換因子は通常複合体を形成しており、そのコア因子がBRG1である。BRG1遺伝子破壊マウスでは心室壁が腠薄した拡張型心筋症様の表現型を呈し(図6左)、ヘテロマウスでも左室収縮異常(図6右上)と不整脈(図6右下)のような心機能に異常を伴う。



(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Mly2 mRNA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Mly2 mRNA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Mly2 mRNA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。

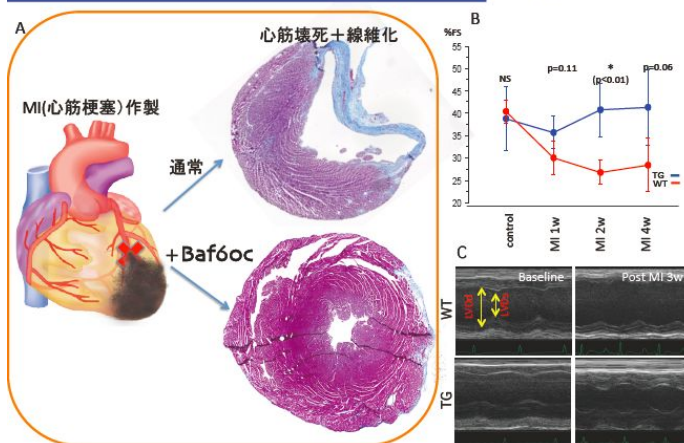
後天的にBRG1を遺伝子破壊できるBRG1^{fl/f}; MCM KO (Brg1^{flox/flox}; aMHC-merCremer) マウスを作製中である。

-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、機能心筋で覆われていた(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改変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性がある。

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)。

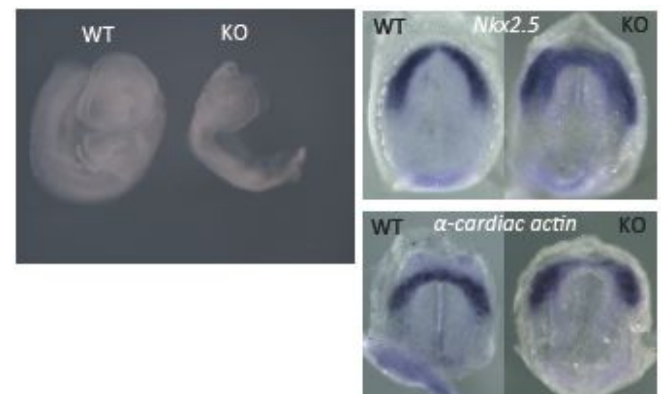
DNAメチル化関連因子(Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、Ring1a/b)および遺伝子破壊マウスの表現型解析と発展

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日前後で致死である。

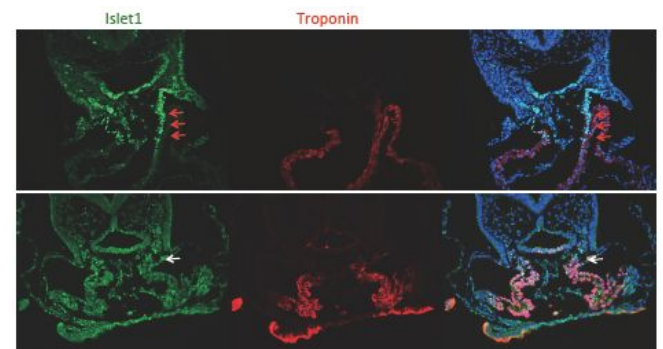
-1: DNMT1

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)。



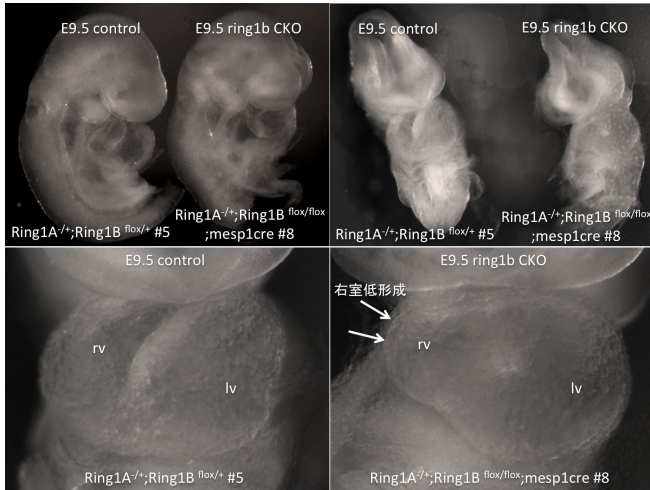
(図11)左: Dnmt1KOマウスの形態。右: 心筋分化初期マーカーであるNkx2-5とα型心アクチンのmRNA発現亢進および発現領域の拡大が見受けられる(濃青が各々のmRNAの発現領域。in situ hybridization法により染色)



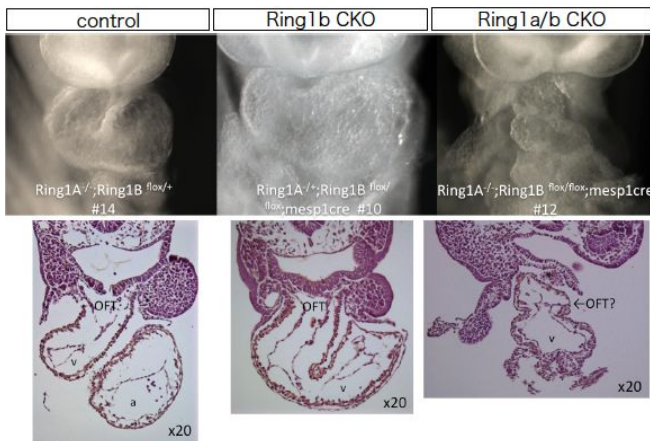
(図12)免疫組織化学を用いた心臓前駆細胞マーカーIslet1と心筋マーカー心トロポニンの共染色による発現領域変化。上段左: 正常胚ではIslet1(緑色:赤矢印)の発現が心臓流出路にて確認されるが、下段左: Dnmt1 KO胚ではIslet1の発現が見受けられない(白矢印)。正常胚では、心筋分化マーカーである心トロポニンIslet1の発現は拮抗するため、両者の発現は一致しない。(図右上:赤矢印)。しかしながら、KO胚ではIslet1の発現が消失することから流出路まで心トロポニンの発現が拡大する(図右下:白矢印)。

-2 : 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) Ring1b KOマウスの表現型。軽度の流出路形成異常を伴う。

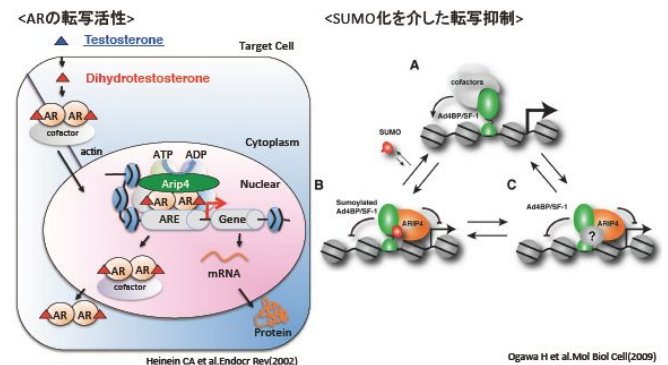


(図14) Ring1a/b DKOマウスの表現型(右)。重度の流出路形成異常を伴う。Dnmt1 KOマウスと表現型が酷似している。

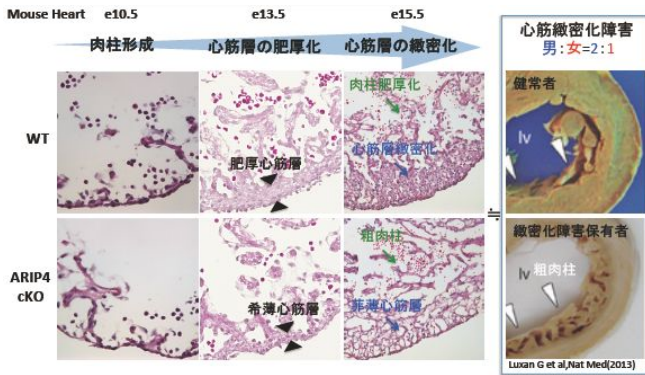
：ヒト心筋症モデルとしてARIP4 KOマウスの解析

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-compacton 表現型と酷似する結果を得た

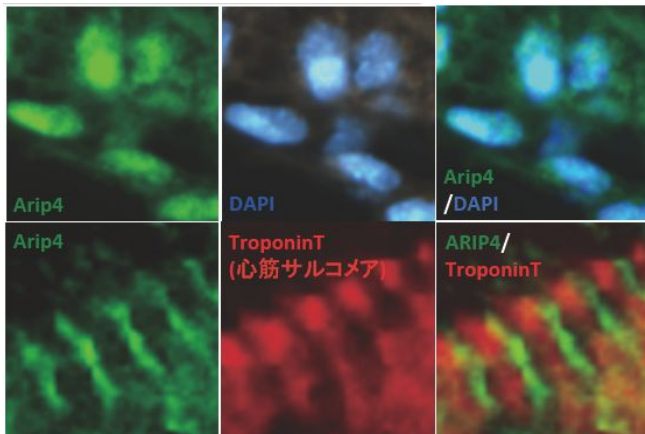
(図16)。興味深いことに、♂KOマウスでの表現型に比べて♀KOマウスでは異常個体が少なく、表現型も軽度である。ARIP4 は男性ホルモン調節因子でもあることから、雌雄での機能差異も含めて、今後集中的に研究していく必要がある。ヒト心疾患の責任遺伝子の可能性においても共同研究を依頼し調べている(富山大学医学薬学研究部市田路子准教授、シンシナティ小児病院Towbin 教授と共同研究開始)。また、ARIP4タンパク質は心筋サルコメアにおいても存在することを発見し、サルコメア蛋白と協調的に作用し心筋収縮異常を引き起こす可能性が考えられる(図17: 大阪大学生命機能研究科小川英知博士研究員との共同研究)。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。



(図16) ARIP4 KOでは心室壁形成の異常が生じ、粗く細長い、菲薄した心筋層構造を呈する。この表現型は、ヒト男性優位に発症する心筋緻密化障害に酷似している。



(図17) ARIP4タンパク質の心筋細胞における局在。初期胚では細胞核で非常に強く発現しており、NKX2-5やNPPA、NOTCHシグナル因子の発現制御を行うことが分かっている (Ogawa, Koshiba-Takeuchi et al., in preparation)。発生が進むと心筋サルコメアにおいても発現する (図17下段)。

3：心筋再生と心機能向上を目指したアプローチ

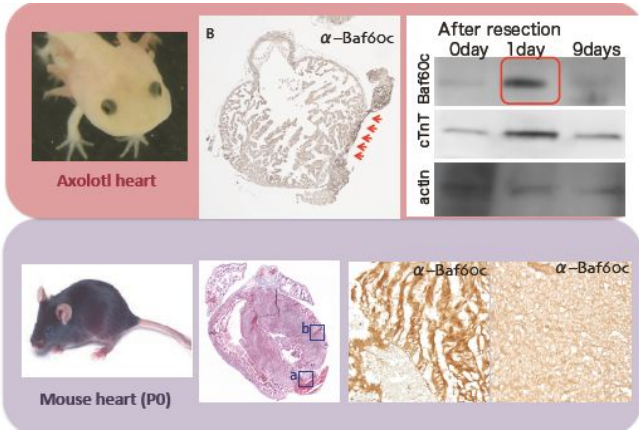
哺乳類の心臓は再生不可能と考えられていたが、マウス出生後、数日以内ならば心筋のみならず心機能も回復することが報告された (Porrello et al., **Science** 2011)。ヒト心筋においても毎年1% (10歳代では約2%、70歳代だと0.5%) が renewal されている (Bergmann et al., **Science** 2009)。しかしながら、どのような因子が心臓再生に関わるのかについては明らかにされていない。また、心臓再生に関わる主たる細胞は心筋細胞とされているが、他の細胞の関与についてはよく分かっていない (Kikuchi et al., **Nature**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

興味深いことに、上述の mRNA スクリーニングの結果と既知のクロマチン因子群 (van Weerd et al., **Cardiovas.Res.** 2011; Takeuchi et al., **Nature Commun.** 2011) が心筋誘導時に発現し成体後に減少することを見出した。その中でクロマ

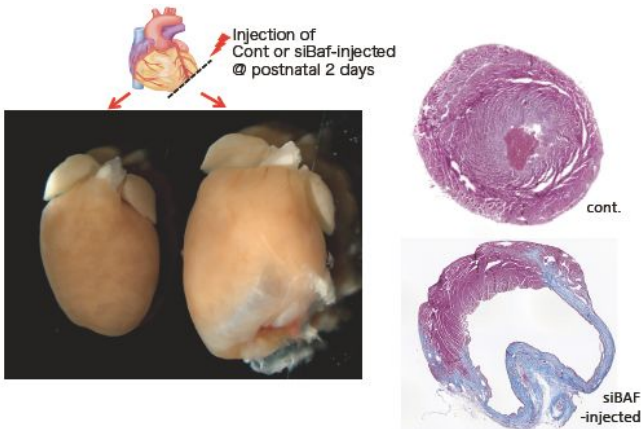
チン因子である Brg1-BAF60C の心臓特異的強制発現 (BAF-TG) マウスを作製したところ、心筋梗塞後の心不全を抑制する結果を得た (前述: 図10)。

この結果は心臓再生にBAF因子の発現が重要となる可能性を示唆しており、本研究項目3では再生時におけるエピジェネティック因子に着目することにより、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。

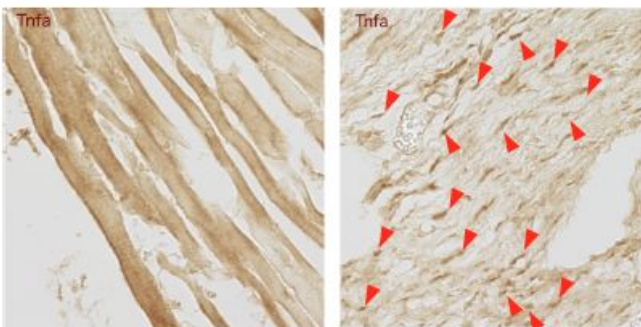
再生能力の高い有尾両生類の心臓再生時、および、新生児マウス心臓再生時においても一過的にクロマチン因子BAF60Cの発現が亢進する (図18)。siBAFを投与されたマウスでは心臓再生能の脱落が見受けられ、線維化が生じることが示された (図19)。また、再生に深く関与すると推測されている胎児期遺伝子Gata4/Tbx5の発現が減少し、心筋マーカー遺伝子の発現も重度に減少していた。一方、炎症性因子TNF α の発現は亢進していた (図20)。反対に、BAF60Cを強制発現させると心筋増殖活性が亢進し、心筋シート様構造を形成することが明らかとなった (図21: 慶應大学医学部循環器内科福田恵一教授との共同研究)。細胞内でのシグナル変化について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の発現が減少しており、BAF60Cはこれら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22)。生体においても同様にBAF60Cの強制発現を行い、心筋再生時に因子群のゲノム構造変換を伴って心筋再生を活性化するのか、ChIP法を用いて解析した。これにより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23)。一連の結果から、哺乳類の再生能力低下は、心筋細胞の成熟に伴ってクロマチン構造の安定性が強化されたことによる転写環境の変化 (閉塞) が原因と考えられ、BAF60Cがその環境変化のKey因子であることが示唆された (考察参照)。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)。



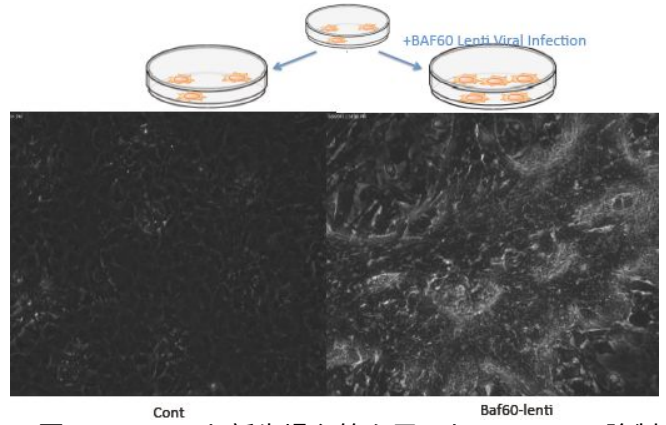
(図1) 再生能の高い有尾両生類アホロートルとマウス新生児での心臓切除後のBAF60Cタンパク質の蓄積。B: 切除後1日以内にBAF60Cタンパク質の亢進が見受けられる。下段: マウス新生児における心臓切除実験においても同様にBAF60Cの亢進が見受けられる。BAF60Cの発現誘導は切除部位近傍で起こり(a)、遠部(b)では誘導されない。右上: BAF60Cタンパク質は心臓切除9日後には減少する。



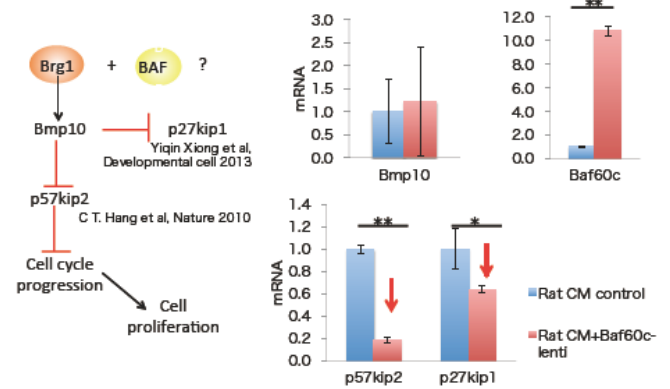
(図2) siBAFを投与すると、心筋再生が阻害され、結果として線維化様形態が形成される(右下)。siBAFはlife technologiesより購入、導入部位の確認のためにEGFP発現プラスミドと共遺伝子導入を行っている。



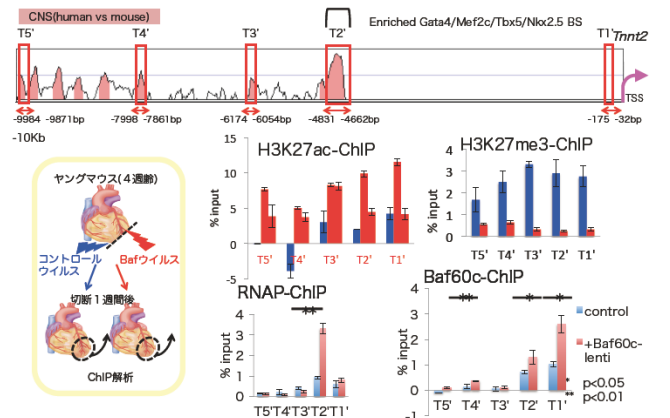
(図3) 左: 再生が進んだ、コントロール心臓。右: siBAF投与された心臓ではTNF α タンパク質の蓄積が見受けられる。茶色の固まりはTNF α が蓄積した心筋。左のコントロール心臓で見受けられる薄茶色は非特異的なシグナル。



(図4) ラット新生児心筋を用いたBAF60Cの強制発現。左: 通常の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。



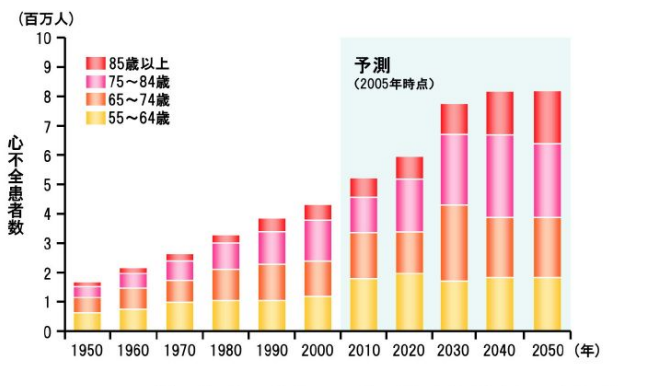
(図5) 細胞増殖抑制因子p57kip2/p27kip1シグナルカスケード。BAF60C強制発現下で両方の遺伝子が顕著に抑制されている一方、Bmp10の発現変化が無い。これによりBAF60Cは特定の遺伝子を制御していることが分かる。



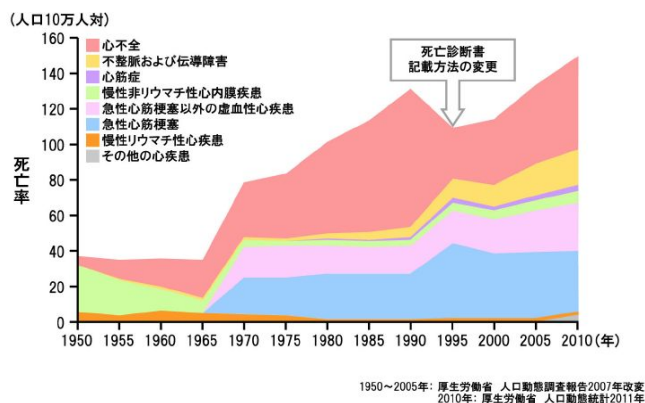
(図6) BAF60C依存的にヒストン修飾変化を受けるTNNT2(心トロポニン)ゲノム領域。BAF60C存在下では、心トロポニンのプロモーター領域のヒストンH3K27のアセチル化が亢進し、トリメチル化が抑制される。ポリメラーゼIIが効率よくリクルートされ、その領域ではBAF60Cタンパク質もリクルートされていることが分かる。青: コントロール心臓、赤: BAF60C投与心臓。

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

慢性心不全は米国で約 650 万人（図 2 4）日本において心疾患原因による死亡者の約 45% が心不全であり（図 2 5）全体死亡者の 8%（平成 21 年度厚労科研白書）を占めている。そのため、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相乗的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を行うことで、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に着目しながら、心不全の発症原因に迫ろうとしており、その結果は臨床応用へ貢献可能な意義のあるものとする。



（図 2 4）米国における心不全患者の推移および予測

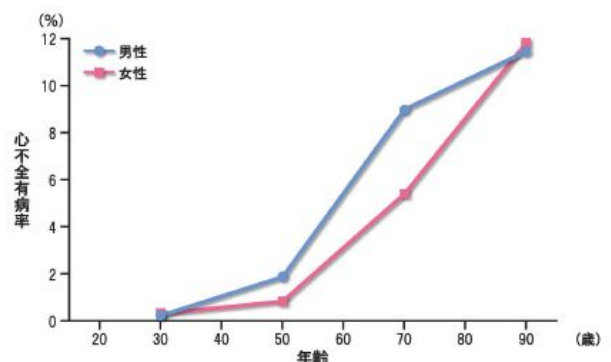


（図 2 5）国内の各心疾患の死亡率の推移

心筋は成熟するに連れて細胞分裂や増殖、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も考えられている。可塑性な機能の消失は、心不全に結びつくと推測される。

こ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、その原因は全く未解明である。(図 2 6：女性赤色/男性青色)。その理由として遺伝子発現解析結果では男女差が乏しく、判別が難しいためと推測される。さらに、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も考えられる。

以上のことから、本研究の mRNA アレイ結果は大まかな発現傾向を得るのには適しているが、粗データである可能性が高い。よって、心不全 Key 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 シーケンスなどのバイオインフォマティクス解析により比較検討することが求められる。



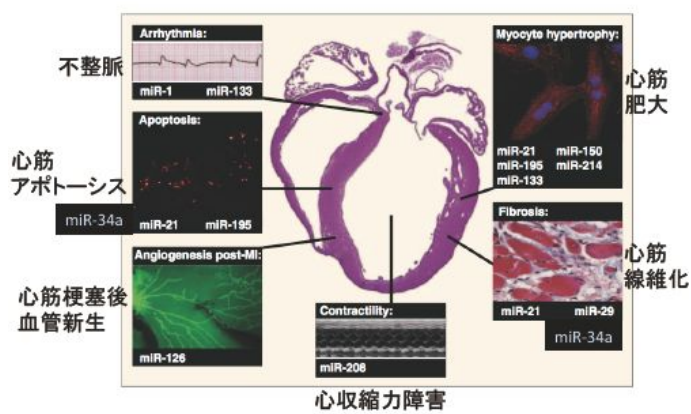
（図 2 6）40～75 歳までは男性が女性より 2 倍高く心不全を発症する。この差は陳旧性心筋梗塞(OMI：男女比 = 2：1)発症歴と心筋症(主に不整脈源性右室心筋症 ARVC：男女比 = 3：1、および左室緻密化障害：男女比 = 2：1)の発症に起因すると考えられる。では、この発症率の相違は男女間心筋のどのような違いから生じるのであろうか？

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 シーケンス)と プロテオーム解析を用いることにより、研究を遂行した。

：miRNA アレイからの候補因子の選出

我々は、OMI と ARVC に着目し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ncing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27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した研究は行われていない。先述のように遺伝子発現解析では顕著な男女差が見受けられないことから、男女差を生じる原因は、miRNAの挙動やその後の発現制御の影響による心筋群にあると我々は考えている。そこで、miRNA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、男女間のmiRNA発現の違いが心不全発症の性差に与える影響を検討する。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ARVC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 Rooji E et al. Circ Res. 2008)
(Reinier A. Boon et al. Nature 2013)

(図27) 心肥大・心不全発症に関与するとされるmiRNA群。これまで、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挙動を示すmiRNAが存在することが明らかとなった(図28)。図29に示すように、4因子について着目しており、2つにおいては心臓研究以外での報告がされ

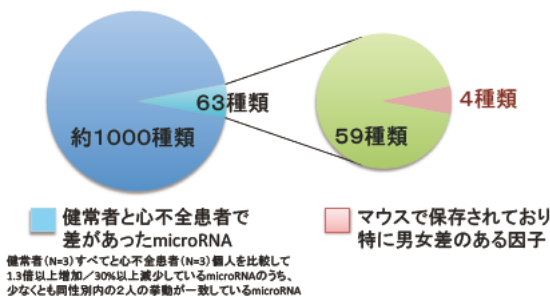
ている。これまでの国内外の研究から男女心不全患者におけるRNA分子の発現異常について研究報告された例は無く、申請者のグループのみが初めて報告する。心不全の治療法としては、患者の心臓機能を悪化させず、できる限り心不全悪化を防止し、かつどれだけ回復を早められるかが、最大の重要課題であると考えられる。この先行研究結果は、男女間で心不全に至る過程で異なるメカニズムが存在する可能性を示唆しており、さらには心不全緩和に向けた男女別創薬研究に大きく貢献するものと考えられる。

：心筋再生因子BAF60C機能阻害因子の探索

BAF60Cは心筋再生のKey因子であるが、出生に伴い発現が抑制される。そこでBAF60Cを抑制する因子を同定することにより、その阻害作用を解除する方法を明らかとし、心疾患時の心筋の可塑性、回復力に繋がると考えた。上記スクリーニングの結果からmiR182と他に興味深い動向を示すmiR X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の発現と対照的であることから、非常に期待される。

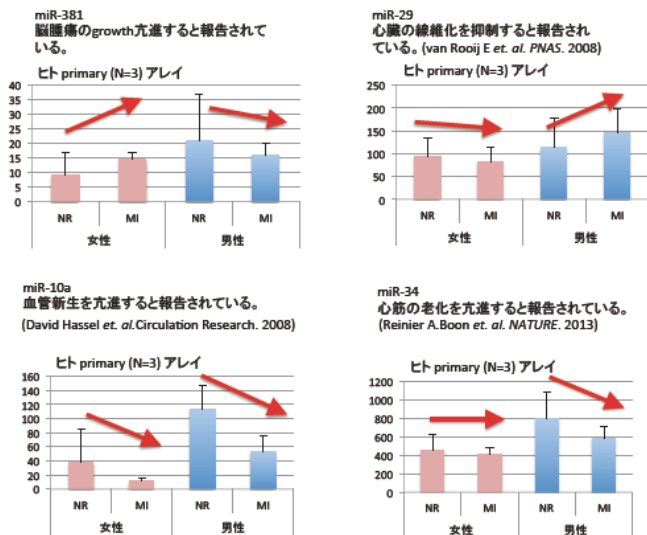
ヒトのmiRNA(約1000種類)から心不全患者で性差のあるmiRNAをアレイデータを元にスクリーニングした

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

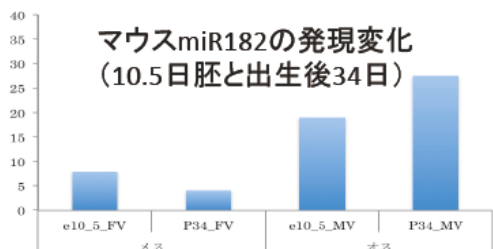


- ・ 健常者と心不全患者でmiRNAの発現パターンが異なるmiRNAがある
- ・ 心不全患者でも男女で発現パターンが異なるmiRNAがある

(図28) 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、かつ性別で発現量に差のあるmiRNA。



(図29) 性別によって発現が異なる miRNA 因子。



(図30) マウス胎生期と出生後における miR182 の発現は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異なる。

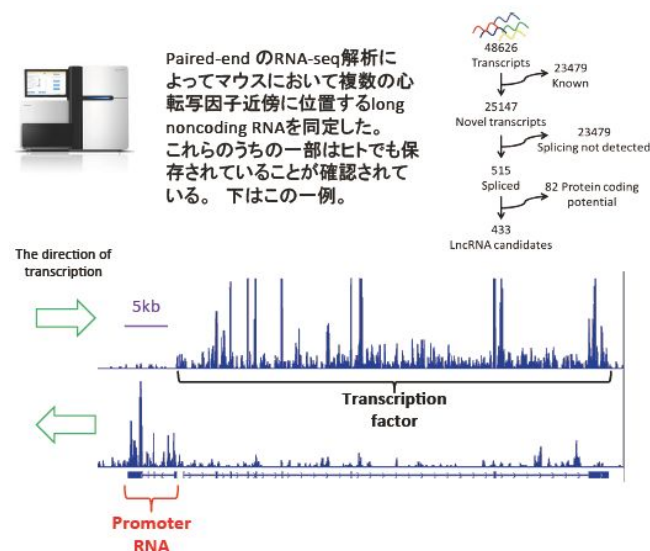
RNAシーケンスを用いた lncRNA の単離

次に大動脈を結紮した心負荷マウスを用いて、心負荷時に発現変動する non-coding RNA (ncRNA) をスクリーニングした。心負荷時に心筋が胎児型に巻き戻ることが知られており、胚性心臓を用いて比較することで、心筋可塑性に関わる ncRNA を同定しようと考えた。ncRNA のスクリーニングのため、RNA シーケンスとバイオインフォマティクス解析法を立ち上げた。

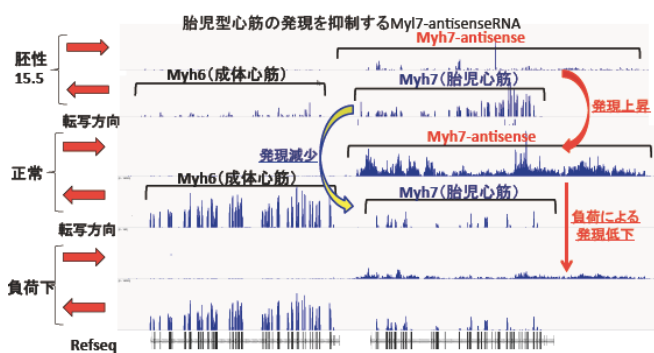
組織からの RNA 抽出はナカライテスク社の Sepasol-RNA I Super G(1)を用い、クリーンアップに Macherey-Nagel 社の Nucleospin RNA XS を用いた。cDNA ライブラリ作成は rRNA などを total RNA から取り除く kit である Epicentre 社の Ribo-Zero Gold (Human/Mouse/Rat)と、Illumina 社の Truseq Stranded mRNA sample prep kit を用いた。これにより、どちらの鎖から RNA が転写されているかを知ることが可能である。Illumina Hiseq 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 long non-coding RNA (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31参照)。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32)。



(図31) 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

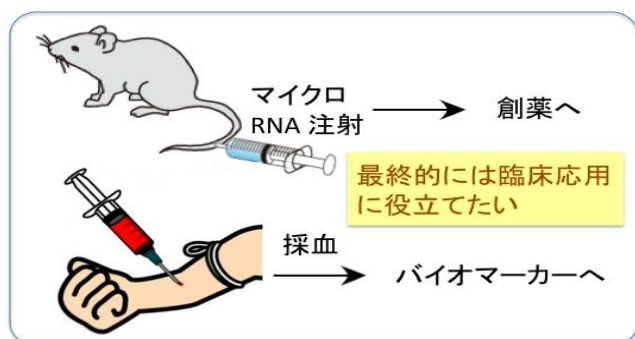


(図 3 2) 心筋成熟に伴って発現亢進する Myl7ncRNA

【D . 考察】

本研究により、心不全患者から作成された遺伝子発現プロファイルを元にエピジェネティック因子が単離され、各々に機能が明確化されてきた。各々が心臓発生に重要な機能を担っていることを報告でき、モデルマウスをプロデュースできた。しかし、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までには至らなかった。今年度に Brg1 KO、BAF60C 恒常発現解析、Dnmt1 KO、miRNAs に関する研究を報告することを目指す。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心筋再生能を高めるか、恒常因子を見いだすのか、であると考えている。本研究3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 がどのような因子によって誘導を受け、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 3 3) miRNA を用いた臨床応用概念図

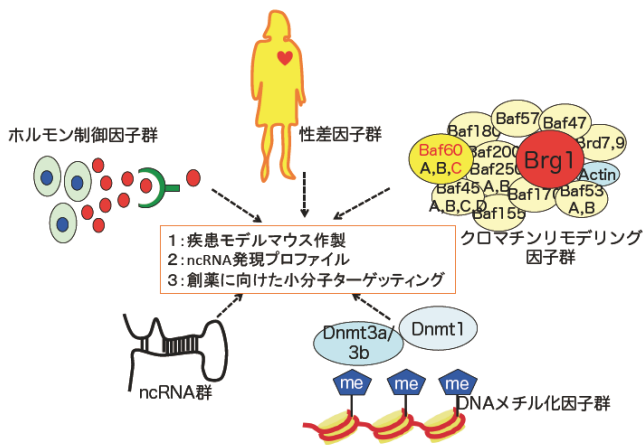
本研究期間内に生じた疑問を発展させ、詳細にグループ分けをして心不全患者プロファイル作成に成功したことにより、男女で発現の異なる miRNA が存在することを見出した。マウス・ラット間においても保存された miRNA が存在し、かつ、発生過程においても興味深い発現変化をしていることも明らかとなった。本研究結果により、miRNA の発現のみならず、ゲノム修飾や構造変換においても性別による相違が存在すると考えられる。ChIP シーケンスを駆使することで、性差により発現の異なる遺伝子や ncRNA の存在理由という本疑問を解決しうるものと考え、今後の課題の一つとして取り組んでいく。

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】

本研究は心不全患者の遺伝子プロファイル解析から始まり、3年間で4つの興味深い点と発展性のある萌芽的な結果が明らかとなった(図34:まとめ図)。さらに性差特異的な、または性別で発現が異なる因子を同定することができた。



(図3 4)本研究のまとめ図。クロマチン構造変換因子群、DNAメチル化因子群、性差ホルモン制御因子群、ncRNA群が心不全患者のプロファイルから興味深い結果をもたらした。

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ち、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始めて報告出来た(図3 5)。

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、機能心筋で覆われており心不全が抑制されていた、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。

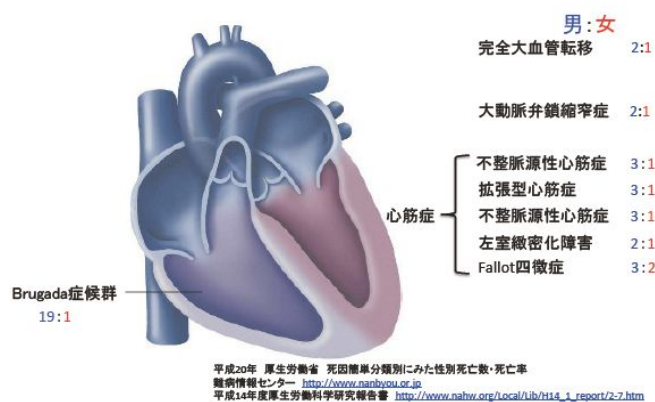
DNAメチル化因子:ヒト心不全患者ではDNAメチル化因子 Dnmt1 の極度の発現減少が見受けられ、心負荷マウスを用いて Dnmt1/3a/3b の発現変化を時系列的に解析してきた。さらに、各々遺伝子破壊マウス(KO)を作製したところ、Dnmt1KO マウスでは心筋分化亢進が見受けられ、Dnmt3aKO マウスでは心エコーにより心室筋収縮異常が確認された。

男性ホルモン結合因子:Arip4がアレイプロファイルから単離され、遺伝子破壊マウスを作製したところ、心筋がスポンジ状形態を呈し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(特にSWI/SNF型クロマチン構造変換複合体)と共役することから、後天的な心不全(特に心筋症)リスクを高める因子としても着目している。男性優位に発症する疾病の理解につながるものと考えられる(図3 6)。

miRNA/lncRNAの単離:性別によって発現の異なるRNAの単離に成功した。パイオインフォマティクス解析の構築に半年かかったが、これによりヒト疾患において発現変化する全てのRNAを網羅的に単離可能となる。心疾患および心臓発生における機能解析を出来る限り早急に行う。



拡張型心筋(心筋薄化)へ ← Brg1 → 肥大型心筋(心筋肥厚)へ
(図3 5)Brg1の発現量がクリティカルに心臓疾患に関与する

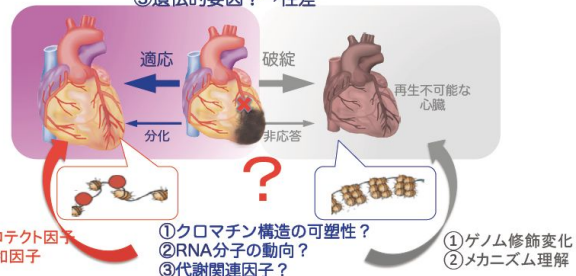


(図3 6)ヒト男性優位で発症する心筋症一覧

心不全発症において何が細胞内で起っているのか?

全て同じなのか?

- ①起因? →心筋梗塞vs心筋症
- ②老化? →年齢
- ③遺伝的要因? →性差



(図3 7)研究の最終目標

【 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 infemale mice. *Bone*,60:68-77, 2014
- (2) 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*. 26:110(48):19438-19443, 2013
- (3) van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK., Epigenetic factors and cardiac development., *Cardiovascular Res*. 15:91(2): 203-211, 2011
- (4) Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori A, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Yu-Qing Zhou9, Ru-Fang Yeh6, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DYR, Pollard KS, Scott IC, &Bruneau BG., Chromatin Remodeling Complex Dosage Modulates Transcription Factor Function in Heart Development., *Nature Communications* 1187, 1-11, 2011

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
- (11) 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
- (12) 竹内純、心疾患重篤化と心臓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
- (13) 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
- (14) 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
- (15) 竹内純、心臓構成細胞の運命決定と分化可塑性、*次世代医学セミナー・ワークショップ(福島)*、2012.2.28
- (16) 竹内純、心筋細胞を創るプログラム因子と護るリモデリング因子、第6回フロンティアサイエンス機構サイエンスセミナー(金沢)、2012.2.20
- (17) 竹内純、心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子、第41回日本心臓血管作動物質学会シンポジウム(秋田)、2012.2.11
- (18) 竹内純、Epigenetic control of animal development and organogenesis., 第34回日本分子生物学会年会 シンポジウム(横浜)、2011.12.13
- (19) 竹内純、Rate-limiting Function of Chromatin/Histone Modulators for Cardiac Specification., *The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section(東京)*、2011.12.3
- (20) 竹内純、心疾患発症とエピジェネティック因子群、*大阪大学蛋白質研究所セミナー (大阪)*、2011.11.17

- (21) 竹内純、心臓を造る因子と護る因子、東京医科歯科大学難治疾患研究所セミナー「難治疾患共同研究拠点事業」、2011.10.21
- (22) 竹内純、小柴和子、塚原由布子、森田唯加、中村遼、山田小和加、横田直子、マウスが紐解く心臓研究のアプローチ、日本遺伝学会第83回大会(京都)、2011.9.22
- (23) 竹内純、心臓誘導と心疾患：エピジェネティック因子群の機能解析からわかったこと、第5回神戸生活習慣病研究会(神戸)、2011.7.24
- (24) 竹内純、エピジェネティクスと心臓研究、第13回アテロジェネシス研究会(岐阜)、2011.7.20
- (25) 竹内純、ISSCR 9th Annual Meeting (Toronto, Canada), 2011.6.18
- (26) 竹内純、Chromatin Remodeling and Heart Cell-Fate Specification., 熊本大学発生医学研究所GCOEシンポジウム、2011.4.20
- (27) 竹内純、心疾患発症におけるエピジェネティクス因子群、日本医学総会(東京)、2011.4.8

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 Koshiba-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 Koshiba-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Tetsuya Asano, Yutaro Hori, Yuki Ando, Mizuyo Kojima, Tetsushi 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 Koshiba-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
- (6) 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
- (7) 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
- (8) 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
- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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
- (12) 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
- (13) 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

(14) 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

(15) 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

(16) 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

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

(18) Ryo Nakamura, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Tetsuo Sasano, Mizuyo Kojima, Testushi 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

(19) 森田唯加、塚原由布子、杉崎弘江、Kwon Chulan、小柴和子、竹内純、新たな心臓前駆細胞制御因子と階層性の理解、第41回日本心臓血管作動物質学会(秋田)、2012.2.11

(20) Kazuko Koshiba-Takeuchi, Ryo Nakamura, Sawaka Yamada, Mizuyo Kojima, Jun K. Takeuchi, Chromatin Formation is Necessary for Cardiomyocyte Regeneration in Mammal/Amphibian Models., Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Keystone, USA), 2012.1.23

(21) Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Andersen, Junko Kurokwa, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Tetsushi Furukawa, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Chulan Kwon, Jun K. Takeuchi, Sall+ Cells Represent a Renewing cardiac Progenitor Population., Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Keystone, USA), 2012.1.23

(22) 森田唯加、塚原由布子、杉崎弘江、Kwon Chulan、小柴和子、竹内純、胚性・体性心臓前駆細胞をマークする新規因子の特異な分化制御機構、第2回Molecular Cardiovascular Conference (北海道)、2011.9.3

【知的所有権の取得状況】

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 特記事項なし

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

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
竹内純	エピジェネティクスで組 織可塑性を理解する		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 -		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
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	メジカル ビュー社	東京	2011	55-63

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
Koshiba-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, Shirode-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
Xu B, Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, Takeuchi JK, Jeannotte L, Gaber ZB, Novitch BG, Weislik DM	Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	110	19438-19443.	2013
van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK.	Epigenetic factors and cardiac development.	Cardiovascular Res.	91	203-211	2011
Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori A, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Yu-Qing Zhou, Ru-Fang Yeh, Henkelman M, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DYR, Pollard KS, Scott IC, & Bruneau BG	Chromatin Remodeling Complex Dosage Modulates Transcription Factor Function in Heart Development.	Nature Communications	1187	1-11	2011