

# 心臓構成細胞運命を決定する特定因子の同定

東京大学 分子細胞生物学研究所  
竹内 純

## 1. はじめに

様々な心臓移植治療における問題点から、心臓/心筋再生研究が脚光を浴び始めた。しかしながら、サイトカインやホルモン投与による心筋誘導には様々な副作用が起こり、骨格筋や平滑筋、神経細胞への分化転換も報告されて、その後の選別が重要である。そもそも心臓を構成する細胞の運命決定を担う特定因子の理解は薄く、よって、臨床応用を目指す上で、細胞の運命決定機構や再プログラミング機構を制御するマスター因子(特定遺伝子)の同定は重要な課題となっている。

申請者は3因子(2つの心臓転写因子Gata4、Tbx5とクロマチン因子Baf60c)が心筋運命決定因子であることを報告しており、本研究において心臓再生医学の将来を担う2つの問題解明を目標とし研究を行う。

1：心筋発生時におけるクロマチン因子の特異的な制御領域(プロモーター制御領域、特定ヒストン領域を明らかにする

2：心臓を構成する心筋、ペースメーカー細胞、刺激伝導系細胞、心臓前駆(幹)細胞の分化運命マスター因子を同定する

## 2. 方法

### (1) 心臓幹細胞誘導因子の単離

心臓構成細胞以外に分化する可能性が非常に少ないであろうと推察されることから、将来的に一番有効な細胞集団は、分化全能性細胞よりも心臓幹細胞であると考えられる。よって、心臓幹細胞への分化転換を引き起こす因子の同定と単離、そして評価を行う。幹・前駆細胞候補因子陽性細胞集団をFACSを用いて選別単離し、Islet1、Scal、cKit陽性細胞共通の新規の細胞集団を同定する。

### (2) 心筋、ペースメーカー細胞誘導因子の単離

申請者は初期心臓形成に重要な転写因子Tbx5、Gata4と心特異的なエピジェネティック因子であるBaf60cの共強制発現を用いてマウス胎児における心筋分化誘導を成功している。この3の遺伝子の組み合わせは重要であることから、ES/iPS細胞に遺伝子導入を行い、FACS細胞選別法を用いて細胞選別を行い、陽性細胞に関して心筋分化能を調査する。この細胞集団の分化形態を詳細に観察するとともに、心筋誘導分子カクテルとペースメーカー誘導分子カクテルを同定する。現在ES/iPS細胞を用いて分化誘導を確認中であり、心筋マーカー(a型心アクチン、a型心特異的重鎖ミオシン、心房短鎖ミオシン、心室短鎖ミオシン、心トロポニン)染色による分化状態の確認と、ペースメーカーマーカー(HCN2/4、Tbx2/3、Cx40)染色による分化状態の確認を行う。

### (3) 心筋因子の制御領域の特定と活性化因子

心トロポニン、心アクチン、心ホルモン*Nppa*に焦点を当てて、心筋誘導に必要なプロモーター領域の単離を目指す。*in vivo* ChIP解析を用いてSWI/SNF複合体のコア因子であるBrg1は、Baf60c依存的にこれらのプロモーター上に結合する。本研究では、心筋成熟に伴ってこれらの領域がどう変化するのか、Brg1の結合能とともにヒストン修飾、DNAメチル化因子も含めて解析する。

## 3. 結果

### (1) 心臓幹細胞誘導因子の単離

FACS法とマイクロアレーを用いて、心臓前駆・幹細胞特異的に発現している転写因子を15選出してきた。候補因子として遺伝子改変マウス(陽性細胞の単離を目指すためにノックインGFPマウス)を作製し研究を行っていた結果、遺伝子CとDが新しい心臓前駆細胞因子であることが明らかとなった(2012年1月特許申請済:論文投稿準備中)。現在のところ、A、B、C、D、Iについて遺伝子破壊マウスは作製済みであり、表現型を含め発生異常を確認している最中である。E、F、G、Hに関しては遺伝子改変マウスを導入中である。

### (2) 心房筋・心室筋誘導因子の選出

ES細胞から心筋分化誘導においても*Tbx5/Gata4/Baf60c*は機能しているが、心房筋・心室筋の運命決定までは機能していない。そこで、心筋誘導後に心房筋と心室筋へと運命決定に関わる候補因子の選出を試みた。

マウス胚各発生段階における心房と心室との間で遺伝子発現アレーを行い、解析ソフト(神戸理研西川伸一副所長との共同研究)から候補因子の探索を行った。現時点では約1万遺伝子において、心発生初期に特に強く発現ピークが見受けられるものを優先的に選出した。心房筋特異的因子として12種類、心室筋特異的な8種類の因子を見いだした。今回選出したシグナル因子については今まで詳細な報告がなく、現在タンパク投与を行い、心室筋・心房筋への分化を試みている。転写因子についてはマウス胚において時系列な発現様式を確認しながら、遺伝子破壊マウスの作製中(理研横浜アレルギー研古関明彦教授との共同研究)とウイルス作製中(京都大学iPS研究所堀田秋津博士と共同研究)である。

### (3) 心筋因子の制御領域の特定と活性化因子

心筋分化・増殖の際に重要なプロモーター領域の単離を試みた。BAF型SWI/SNF複合体エピジェネティック因子を心筋特異的に強制発現させたTGマウスを作製し、各心筋プロモーターの変換状況を調べた。心筋ChIP解析より、野生型マウスではSWI/SNF複合体のコア因子であるBrg1は、心筋成熟に従って心アクチン、心トロポニン、心ホルモン*Nppa*等の胎児期遺伝子群のプロモーター上に結合できなくなっていることを見出した。しかしTGマウスではBrg1の心トロポニンプロモーター上への結合が見受けられた(2012Keystone Symposia招待講演、投稿準備中)。

## 4. 考察 まとめ

循環器科の3大疾患である不整脈、心不全、心筋梗塞は、死亡リスクの高い疾患

であり、様態が安定したとしても、組織へのダメージの回復はほぼ望めず、再発にリスクを抱えて患者は生活を強いられる。解消策として、心筋、ペースメーカー細胞、心臓刺激伝導系細胞の樹立は再生医療に必ず貢献すると考えられる。そこから、各々の細胞がどのように連携を持つのか、協調的な関係を築くのか、研究していけるものと考えている。分子治療戦略は、発現調節を組織特異的に行うことで分泌系因子戦略と比較して他の隣接組織、細胞への悪影響は少ないと考えられ、また転写因子の機能をクロマチン構造状態でコントロールする我々の系は、より特定の組織に分化、機能させ、またその分化状態を安定に維持することが可能であると考えられる。この発想により、ESで基礎実験をもとに、ヒト、ES、iPS、placentaで検討可能であると考えられる。本研究結果は以上の観点から臨床応用に直接貢献出来ると考えて、本研究は早期にまとめたい。

## 5. 発表論文、参考文献

### 特許

「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」

東京大学分子生物学研究所 代表:竹内純、分担:森田唯加、塚原由布子

出願番号:特願2012-011458 出願日:2012年01月23日 出願国:日本

### 国際科学論文

#### 1. van Weerd JH., Koshiha-Takeuchi K., Kwon C, and Takeuchi JK.

Epigenetic factors and cardiac development.

*Cardiovascular Research* 91, 203–211, 2011. (査読あり)

2. Takeuchi JK., Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori AD, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Zhou YQ, Yeh RF, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier DY, Pollard KS, Scott IC, Bruneau BG. Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development.

*Nature Communication.* 2011, 2:187, 1-11. (査読あり)

### 邦文総説

#### 1. 塚原由布子、小柴和子、竹内純、

月刊「Heart View」Vol. 15 No. 8(2011) 特集「血管・心筋再生はどこまで来たか」

「心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン制御の役割」

#### 2. 竹内純、宮川一富田幸子、笹岡陽介、小柴和子

Annual Review循環器、中外医学社 1-16. (2011) 「心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子」

#### 3. 杉崎弘江、竹内純

実験医学28, 62-69. (2010) 「心臓再生医療を目指した幹・前駆細胞からの利用状況と応用戦略」