

クロマチンリモデリング因子を介した心肥大発症メカニズムの解明

東京大学 分子細胞生物学研究所
エピゲノム疾患センター 心循環器再生研究分野
小柴 和子

1. はじめに

心臓疾患はヒトの死亡原因でも高位に位置する疾患であり、特に心肥大は高頻度で認められる心疾患である。我々は Zinc フィンガータイプの転写因子をコードする *Sal14* 遺伝子に変異が生じると、マウスで肥大型心筋症を発症する事を見いだした。定量リアルタイム PCR を用いて、*Sal14* 変異マウスと野生型マウスとで比較したところ、心肥大マーカーとともに胎児性心臓特異的転写因子の発現が増加していることが明らかとなった。さらにエピジェネティック因子群にも発現変化が認められ、SWI/SNF 型クロマチンリモデリング因子の *Smarcd3*(Baf60c)が発現上昇していた。Baf60c は初期胚中胚葉に心臓特異的転写因子の Tbx5、Nkx2-5、Gata4 とともに異所的に導入されると、そこに心筋を分化誘導するという心筋分化において重要な役割を担っている因子である (Takeuchi and Bruneau, 2009)。本研究では Baf60c の制御機構を調べることにより、エピジェネティック因子を介した新たな心肥大発症メカニズムについて明らかにする。

2. 方法

2-1 *Smarcd3* トランスジェニック (TG) マウスの作製

Baf60c の発現上昇が実際に心肥大を引き起こすかどうか、心筋特異的に Baf60c を過剰に発現するマウスを作製した。Baf60c をコードする *Smarcd3* 遺伝子を α MHC プロモーター直下につなぐとともに、導入された遺伝子の発現観察を容易にするため、*IRES*、*EGFP* を下流につないだ。得られたマウスの心臓形態を経時的に観察し、さらに心電図を計測することにより、心機能について調べた。

2-2 *Smarcd3* 遺伝子の上流解析

rVISTA を用い脊椎動物種間で *Smarcd3* 遺伝子の上流・下流配列を比較し、種間で高く保存されており *Sal14* 結合配列を含む領域を探索した。その領域を Luc ベクター (pGL3-promoter vector) に挿入し、*Sal14* が *Smarcd3* の発現制御に関わっているかどうか調べた。

2-3 *Sal14* 転写抑制作用の分子的解析

Sal14 がどのように *Smarcd3* の発現を制御するのか、その分子メカニズムを明らかにするために、免疫沈降法を用いて *Sal14* と結合する因子について調べた。

3. 結果

Smarcd3 TG マウスでは P0 で心臓全体に EGFP の発現が認められ、さらに心室壁の肥厚が認められた。8 週令のマウスで心電図を計測したところ、左室肥大の特徴である T 波の異常が確認できた。また TG マウスでは成体であるにもかかわらず、心筋層に pHH3 陽性細胞が多数存在し、胎児性心筋特異的転写因子も発現していた。心筋形態は小型化心筋が多数認められ、これらのことから、*Smarcd3* TG マウスでは心筋の成熟が抑制され、心筋が胎児期の状態にあることが示唆された。

次いで、*Smarcd3* の上流に 3 カ所、下流に 2 カ所 *Sal14* 結合配列を含む領域を選び、*luc* アッセイをおこなった。その結果、上流 2 カ所、下流 1 カ所が *Sal14* 存在下で活性が減少した。興味深いことに、いずれの領域でも *Sal14* 結合配列の近傍に *Gata4* の結合配列が存在し、*Gata4* と *Sal14* を同時に投与すると、濃度依存的に *Gata4* の活性作用を押さえることが明らかになった。

さらに、*Sal14* による転写抑制の分子メカニズムを知るために、転写抑制作用をもつ NuRD 型複合体の構成因子である *Mi-2 β* 、*HDAC2/9* と *Sal14* が相互作用するかどうか免疫沈降を行ったところ、野生型マウス心臓では *Sal14* がこれら因子と結合し、複合体を形成していることがわかった。一方、*Sal14* 変異マウスでは *Sal14* はこれらの因子と複合体を作りにくくなっていることが明らかとなった。

4. 考察

Sal14 と *Smarcd3* は心臓発生過程において相補的な発現様式を示す。*Smarcd3* は胎性期 e9.5、e10.5 で心室に強く発現し、その後発生とともに発現は弱まっていく。それに対し *Sal14* は発生初期には心室に弱く発現し、e12.5 以降発現を強めていく。出生直後の P0 では *Smarcd3* の発現はほとんど認められないが、*Sal14* は心室に強く発現している。この発現様式と、今回我々が得た結果とをあわせて考えると、*Sal14* 変異マウスにおける心肥大の発症は *Baf60c* の過剰な発現によるものと言える。*Sal14* は *Mi-2 β* や *HDAC* とともに抑制型複合体を形成し、発生とともに *Smarcd3* の発現を抑える。*Sal14* に変異が生じると抑制型複合体に結合しにくくなり、その結果 *Smarcd3* を十分に抑制できなくなるため、成体になっても *Smarcd3* が発現し続けることになる。つまり、心筋は *Smarcd3* が抑制されることにより、成熟の方向に向かい、*Smarcd3* の発現が維持されたままでは、心筋は成熟せず胎児期の状態が保たれる。そのため、*Sal14* 変異マウス、*Smarcd3* TG マウスともに、成体になっても心筋が増殖し続け、胎児性心筋特異的転写因子が発現していると考えられる。このことは増殖能の低下した成体心筋が損傷を受けた時に、*Smarcd3* (*Baf60c*) を強制発現させることで成熟心筋を胎児性心筋化させ、増殖を促し心筋再生を促進できる可能性を示す。興味深いことに、成体になっても心臓再生能を有する有尾両生類のアホロートルを用いて、再生中の心臓における心臓主要因子の発現を調べたところ、*Baf60c* の発現が短時間で劇的に上昇してくることを我々は見いだした。つまり通常の再生現象においても *Baf60c* が心臓再生の主要因子として実際に関与していることになり、この因子の発現制御が今後の再生医療、心肥大発症機序の解明において重要な手がかりになると期待される。

5. 発表論文、参考文献

1. van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK. (2011) Epigenetic Factors and cardiac development. *Cardiovasc Res.* 91: 203-211.
2. 塚原由布子、小柴和子、竹内純 (2011) 「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* 15: 787-795.
3. 竹内純、宮川一富田幸子、笹岡陽介、小柴和子 (2011) 「心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子」*Annual Review 2011 循環器*
4. Takeuchi JK.* and Bruneau BG.* (2009) Direct differentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-711. *: Equal correspondence
5. 竹内純、小柴和子 (2009) 「心臓誘導と心筋分化—マスター因子は存在するのか？」*医学のあゆみ*別冊 5月号
6. Koshiba-Takeuchi K.*, Takeuchi JK.*, Arruda EP., Kathiriya IS., Mo R., Hui CC., Srivastava D. and Bruneau BG. (2006) Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nature Genetics* 38:175-183. *Equal contribution