

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所属	東京大学分子細胞生物学研究所 エピゲノム疾患研究センター
氏名	竹内 純
研究テーマ	心不全発症とエピジェネティック因子機能制御との関係

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

目的: エピジェネティック因子の機能機序の理解から心筋再生能失活の原因と再生能向上を目指す

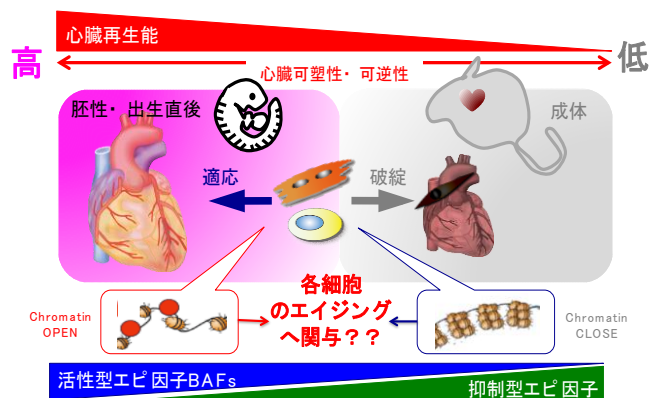
近年、ほ乳類の心臓が新生児限定ではあるが再生可能ということが報告されてから、マウス遺伝学を用いた研究が主たる場となってきた。成体でも再生能が維持されたゼブラフィッシュとは異なり、出生後1週間以内に心臓再生能力を失うマウスの心臓は、その構成細胞のどこに原因があるのだろうか？また、どのような因子が心筋環境を変化させる要因となっているのだろうか？(図1)

我々の研究室における先行研究により、新生児の心筋は増殖活性が高く、虚血下においても再生能が高く維持し続けることを明らかにしていた(Sadek, Martin, Takeuchi., *Stem Cell Report* 2014)。そこで、その主たる原因は心筋にあると考えた。次に、心筋再生可能な時期と不可能な時期における遺伝子発現変化を解析したところ、BAF クロマチン構造変換因子群の顕著な発現変化が認められた。BAF 因子は心臓誘導時必須の核タンパク質であるが、本研究で再生時期特異的にも一過的に発現が亢進し再生終了に伴って平常状態に発現量が戻ることが明らかにされた。この発現変化と関連して、心臓構成タンパク質や心ホルモン、心臓転写因子、血管増殖因子、細胞増殖関連因子でのヒストンアセチル化度合の変化や転写活性度合が再生能の低下に伴っていることをCHIP解析によって見出した。これらの遺伝子プロモーター/エンハンサーは心筋成熟に伴って高度にメチル化されていくが、再生時には一過的にアセチル化され再生終了時には再びメチル化される。BAFの強制発現系によって人為的に脱メチル化を引き起こさせ再生能を引き出せること、BAFの機能を抑制させることで再生能力が消失することも明らかにされた。さらに、心筋のみではなく未分化細胞も心臓再生に寄与することも突き止めた。これらの細胞は細胞系譜追跡を行うと、心筋や平滑筋へと分化していることも明らかとなり、心臓再生には様々な細胞の可塑的な能力が統合される必要があると思われる(図2)。

今回のセッションでは、心筋細胞と成体心臓に存在する未分化細胞に特化して、全ゲノムにおける変換領域から明らかにされた見解を述べていきたい。さらに、クロマチン構造・ヒストン修飾変換を担うキー因子の投与による再生能の向上について、心筋のみならず生物学的な観点から統合的に報告したい。



(図1: 心臓再生に寄与する細胞種)



(図2: 心臓再生能力はクロマチン・ヒストンの活性化能力と関係している?)

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京大学分子細胞生物学研究所 エピゲノム疾患研究センター
氏 名	竹内 純
研究テーマ	心不全発症とエピジェネティック因子機能制御との関係

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

目的:エピジェネティック因子の機能機序の理解から心筋再生能失活の原因と再生能向上を目指す
(心臓再生に不可欠と考えられている心筋と線維芽細胞に焦点を当てて、両細胞群が心臓再生時に (A) どう寄与するのか、(B) 両者の維持または増殖を制御している因子の単離を目指す)

研究方法:心筋

- ① 心筋増殖下における遺伝子変化
- ② 心筋制御遺伝子のゲノム上でのエピジェネティック変化
- ③ 強制発現系および機能阻害系における心臓再生能の変化

:線維芽細胞

- ① 心筋再生時に線維芽細胞にて発現変化する遺伝子群
- ② 時系列な発現変化
- ③ 再生能力への寄与:線維芽細胞の分化転換能

研究結果:心筋

- ① 心臓再生時に発現亢進するクロマチン制御因子

A:心筋(aMHC)プロモータ上に GFP をノックインしたトランスジェニックマウス(aMHC-GFP TG)マウスを用いて GFP 陽性の細胞を選別後 BrdU 陽性細胞と陰性細胞とで遺伝子発現比較を行った。その結果、クロマチン構造変換因子(Smarcd3とSmarca4)において顕著な発現変化が見受けられた。B:次に、マウス心臓再生時におけるこれらの遺伝子の時系列な発現変化を免疫組織化学法を用いて追跡したところ、切除後一日以内に Baf60c(Smarcd3 がコードしている)タンパク質の発現が亢進していることが確認された。ウエスタンブロッティング法を用いても同様な結果を得ている。さらに、この一過的な発現亢進がマウス心臓再生特異的なものなのか、心臓再生共通のメカニズムなのか知る為に、再生能力の高い有尾両生類アホートルを用いて心臓切除後の Baf60c の発現変化を調べた。その結果、心臓切除後一日後以内には Baf60c タンパク質の発現が亢進しており、心臓切除後9日目には Baf60c の発現は切除前の量に戻っていることが明らかとなった。これにより、Baf60c(Smarcd3)は心臓再生時に共通して一過的に発現が亢進する因子であることが分かる。

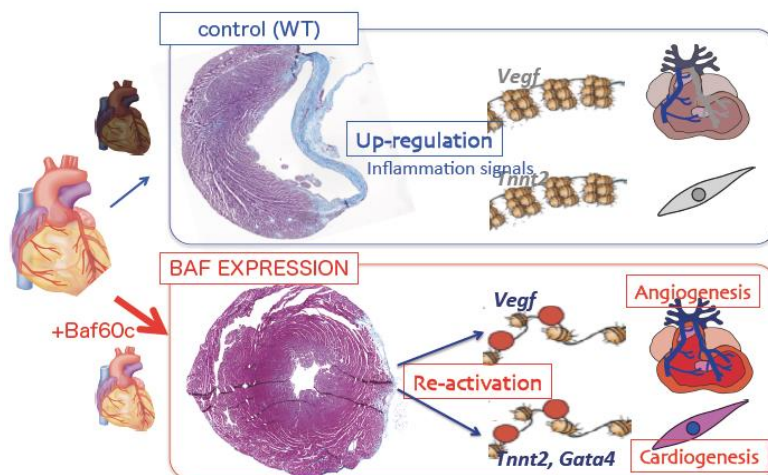
- ② 心臓再生時におけるヒストン修飾が変化する遺伝子群

心臓発生過程において、発生が進むに連れて発現が減少し心臓形成に重要と思われる遺伝子として心トロポニン(Tnnt2)と Gata4、そして VEGF 遺伝子のプロモータ上でのヒストン修飾変化を ChIP 解析法を用いて調べた。その結果、発生が進むに連れてこれらのプロモータ上では H3K27me3 度合いが亢進しており、H3K4me 度合いが減少していることが明らかとなった。つまり、発生が進むに連れてこれらのプロモータは不活化されていくことが分かる。

- ③ Baf60c(Smarcd3)の強制発現によって、エピジェネティック変化が生じ再生能が向上する

心臓再生能がほぼ消失された4週齢マウスにおいて、Baf60c レンチウイルスを用いて心臓での強制発現を試みた。その結果、心トロポニン(Tnnt2)プロモータにおいて、H3K27ac が顕著に亢進しており、H3K27me3 が抑制されていた。また、Tnnt2 基本転写領域(基部側)においては Baf60c の結合とポリメラーゼ II のリクルートメントが確認された。この結果と酷似した結果を心臓転写因子 Gata4 および VEGF のプロモータ上においても確認できた。次項:まとめ図参照。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)



研究結果: 線維芽細胞

① 線維芽細胞特異的に発現する転写因子群

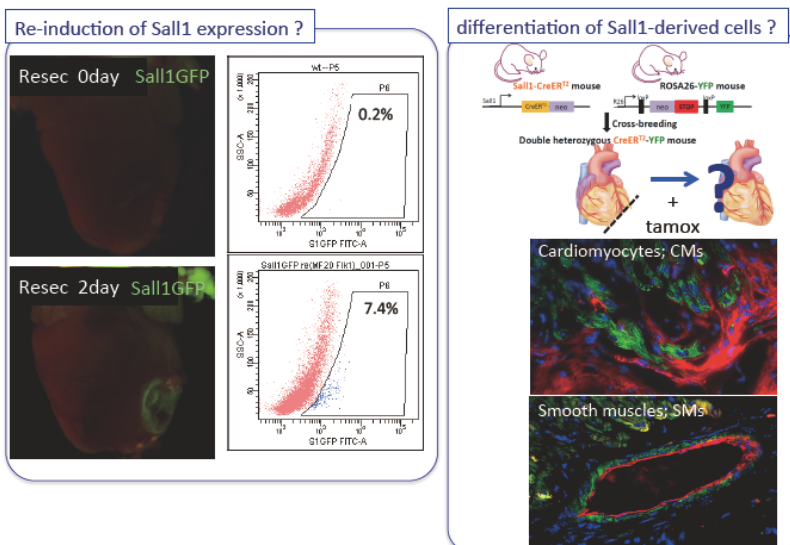
心臓再生可能時心臓先心部の切除を行い、12 時間以内には転写因子 *Sall1* の発現が亢進することが分かった。この転写因子は心臓前駆細胞特異的な発現を呈し、心臓前駆細胞が未分化維持に寄与することが先行研究によって明らかにされている(Morita et al., *in preparation* 2015)。

② 心臓切除後早期に反応する *Sall1* 遺伝子

心臓再生過程における時系列な発現変化を追跡すべく、*Sall1* 遺伝子座に GFP をノックインした *Sall1*-GFP トランスジェニック(TG)マウスを作成した。この TG マウス新生児の心臓先心部を切除して *Sall1* の発現変化は GFP を通して追跡が可能となる。GFP 陽性細胞数の時系列な変化を追跡したところ、新生児の心臓切除後2~4日目をピークとして *Sall1* 陽性細胞が一過的に誘導されることを見いだした。下記左図参照。

③ 線維芽細胞からの分化転換能

陽性細胞の性質理解を行ったところ、*Sall1*⁺;*Thy1* 陽性細胞であることが見いだされた。この *Sall1* 陽性細胞は心臓切除後7日間で消失することから、心臓再生時早期に機能する細胞と考えられ、*Sall1*⁺;*Thy1*⁺細胞を選別後、再培養を試みた。その結果、心筋へと分化する細胞が見いだされたことから、少なくとも哺乳類の心臓再生には *Thy1* 陽性の細胞群からの心筋へ分化転換することが見いだされた。



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

さらに、Sall 陽性となった細胞が *in vivo* で心筋に分化転換するのか、Sall1creERT2 マウスと ROSA-RFP レポーターマウスを交配し、新生児タモキシフェン投与12時間後に心臓切除を行い、一度でも Sall1 陽性となった細胞の追跡を行った。其の結果、Sall1 陽性であった細胞は心筋へと分化していることを見いだした。前項右図参照。この発見は現在ホットな研究領域である人為的なリプログラム研究のみならず、生体心臓が持ち合わせている能力を初めて見いだした研究結果である。

考察&課題

心筋: 心筋の可逆性を分子のレベルから証明した初めての研究であると考えている。エピジェネティックな変化が心筋における遺伝子発現(心筋:心トロポニン、心臓転写因子: Gata4、血管新生サイトカイン: VEGF)の抑制を引き起こし、結果として急な環境変化に対して心筋細胞が対応できないような性質へと変化していくことを証明した。逆に心臓切除により TNF α の発現が誘導され易くなり心筋壊死プログラムが遂行される環境となっていることを見いだした。これらのゲノム修飾変化は BAF60c の強制発現系において、これらの抑制が解除され結果的に遺伝子発現の再誘導が引き起こされることを見いだした。つまり、Baf60c は心筋壊死プログラムを緩和またはリセットし、幼若期へと巻き戻していると示唆される。これらの研究によって、心筋細胞の中で、環境変化をセンスし反応する細胞群が存在するのではないかと考えられる。このような細胞が出生後における心臓全体内でどう局在するのか、または心筋細胞全てが持っている能力なのか、が今後のテーマであると考えられる。

線維芽細胞: 出生後の生体において、心臓線維芽細胞が自ら持ち合わせている能力を見いだした。内在の THY1 陽性細胞から心筋へ分化する機構について、詳細な実験を組み、この現象が心臓において限定された期間のみ見受けられるのか、さらに心臓線維芽細胞のみの能力なのか、研究していく必要があると考えられる。よって、以下の実験系を組んで証明していく。A: 新生児心臓から THY1 陽性細胞を単離して培養系にて分化方向を調べる。B: SALL+;THY1+細胞と SALL-;THY1+細胞との遺伝子比較を行う。A&B の実験により、THY1+陽性細胞で性質の違いを見いだす。C: Thy1creERT2 マウスまたは Periostin1creERT2 マウスを用いて線維芽細胞特異的な遺伝子破壊マウスの作製を試みる。さらには、Thy1creERT2 マウスと ROSA-RFP レポーターマウスを交配し新生児で心臓切除を行い、タモキシフェン投与により系譜追跡を行う。以上の実験系において仮説を証明し、今年度中には投稿を目指す。

**Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	東京大学分子細胞生物学研究所 エピゲノム疾患研究センター
氏 名	竹内 純

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, <u>Takeuchi JK</u> , Kanno J, Bonewald LF, Imai Y. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice., Bone. Mar 60; 68-77, 2014, 査読有 (別紙 1)
2	Xu B, Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, <u>Takeuchi JK</u> , 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. Nov 26 ;110(48) :19438-19443, 2013, 査読有 (別紙 2)
3	Sadek HA, Martin JF, <u>Takeuchi JK</u> , Leor J, Nei Y, Giacca M, Lee RT., Multi-Investigator Letter on Reproducibility of Neonatal Heart Regeneration following Apical Resection., Stem Cell Reports. Jul 8; 3(1):1. 2014, 査読無 (別紙 3)

② <論文 PDF 添付なし>

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2014 年 10 月	第 13 回日本心臓血管発生研究会(福島)、守山裕大、小柴和子、竹内純、心筋か平滑筋か:真骨魚類の進化から明らかとなった新規細胞運命決定メカニズム。
2	2014 年 10 月	第 13 回日本心臓血管発生研究会(福島)、伊藤航平、小柴和子、竹内純、心臓損傷時におけるゼブラフィッシュとメダカの異なる修復表現型
3	2014 年 9 月	2014 International Workshop on Developmental and Regenerative Biology in Yamagata(山形)、小柴和子、Epigenetic regulations in the vertebrate heart regeneration
4	2014 年 7 月	Euro Evo Devo Vienna 2014 (Austria)、Yuta Moriyama, Jun Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi、Elastin gene neo-functionalization endows teleost-specific heart component, "bulbus arteriosus" in fish development and evolution. (別紙 4)
5	2014 年 5 月	2014 年度エピジェネティクス研究会(東京)、竹内純、心臓再生とエピジェネティクス研究。(別紙 5)
6	2014 年 5 月	第 47 回日本発生生物学会大会(愛知)、守山裕大、How to convert cardiomyocyte into smooth muscle; Lessons from fish heart evolution.
7	2014 年 5 月	第 47 回日本発生生物学会大会(愛知)、森田唯加、竹内純、A novel defined factor directly specifies cardiac lineages from pluripotent stem cells and promotess heart regeneration.
8	2014 年 5 月	第 47 回日本発生生物学会大会(愛知)、中村遼、竹内純、The Epigenetic Regulation in Mammalian Heart Regeneration.
9	2014 年 5 月	第 47 回日本発生生物学会大会(愛知)、竹内純、Partial Reprograming for Heart Cell Survival.
10	2014 年 5 月	2014 Weinstein Cardiovascular Conference (Madrid, Spain)、Ryo Nakamura, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Yuko Tsukahara, Tetsuo Sasano, Mizuyo Kojima, Tetsushi Furukawa, Hesham A Sadek and Jun K Takeuchi、Functional roles of the Epigenetic factors in mammalian heart regeneration.
11	2014 年 5 月	2014 Weinstein Cardiovascular Conference(Madrid, Spain)、Yuika Morita, Jun K Takeuchi、NON MESP1-PROGENITORS BY A DEFINED FACTOR CONTRIBUTE TO CARDIAC LINEAGES FROM PLURIPOTENT STEM CELLS.
12	2014 年 5 月	2014 Weinstein Cardiovascular Conference(Madrid, Spain)、Kohei Ito, Mai Morioka, Shun Kimura, Mai Tasaki, Keiji Inohaya, Jun K. Takeuchi and Akira Kudo、DIFFERENTIAL REPARATIVE PHENOTYPES BETWEEN ZEBRAFISH AND MEDAKA AFTER CARDIAC INJURY.
13	2014 年 5 月	2014 Weinstein Cardiovascular Conference(Madrid, Spain)、Yuuta Moriyama, Jun K Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi、How to convert cardiomyocyte into smooth muscle; Lessons from fish heart evolution

14	2014年4月	第51回日本臨床分子医学会学術集会(東京)、竹内純、心臓再生能維持とゲノム構造変換.
15	2014年4月	2014 Keystone Symposia Conference(Boston, USA)、R Nakamura, K Takeuchi, T Sasano, Y Tsukahara, H Sadek, J Takeuchi, Y Hori, Y Ando, M Kojima, T Furukawa、The Epigenetic Regulation for Cardiomyocyte Plasticity in Heart Regeneration.
16	2014年4月	2014 Keystone Symposia Conference (Boston, USA)、Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Anderson, Chulan Kwon, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Jun K. Takeuchi、Heart developmental programming and regeneration by a novel defined factor. (別紙 16)
17	2014年3月	第91回日本生理学会大会(鹿児島)、竹内純、哺乳類心臓再生能力が維持されるには?
18	2014年3月	第13回日本再生医療学会総会(京都)、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.
19	2013年12月	第36回日本分子生物学会年会(神戸)、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.
20	2013年11月	第17回日本心血管内分泌代謝学会(大阪)、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
21	2013年11月	第35回日本心臓生検研究会(東京)、竹内純、哺乳類心臓再生が維持されるには?
22	2013年9月	European Society of Cardiology (ESC) Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 (Berlin, Germany)、Jun K. Takeuchi、heart cell survival by defined factors.
23	2013年9月	European Society of Cardiology (ESC) Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013 (Berlin, Germany)、Yuika Morita, Yuko Tsukahara, Peter Anderson, Kazumi Hirabayashi, Hiroe Sugizaki, Ryuichi Nishinakamura, Chulan Kwon, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Jun K. Takeuchi、A novel defined factor directly specifies cardiac lineages from pluripotent stem cells and promotes heart regeneration. (別紙 23)
24	2013年9月	日本動物学会第84回岡山大会 2013、竹内純、心臓再生はどのようにして可能となるのか?
25	2013年9月	日本動物学会第84回岡山大会 2013、守山裕大、竹内純、小柴和子、軟体動物頭足類にみられる進化的新規形質「鰓心臓」の進化発生学的研究
26	2013年9月	第19回小型魚類研究会(仙台)、Yuta Moriyama, Jun Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi、Elastin gene sub/neo-functionalization and formation of teleost-specific outflow tract, “bulbus arteriosus”, in fish development and evolution.
27	2013年9月	Merk Millipore BioScience Forum 2013(東京)、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.
28	2013年7月	International Union of Physiological Sciences(IUPS) (Birmingham)、Kazuko Koshiba-Takeuchi、Transcription factors regulate cardiac septum formation in the vertebrate evolution.
29	2013年7月	第53回日本先天異常学会学術集会(大阪)、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.

30	2013年7月	第7回 TAKAO International Symposium (東京)、Jun K. Takeuchi、Heart cells survival by the defined factors.
31	2013年7月	第28回難病治療研究会(東京)、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。(別紙31)
32	2013年6月	I SHR(国際心臓研究学会) (San Diego, USA)、Ryo Nakamura, Kazuko Koshiba-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.
33	2013年5月	第46回日本発生生物学会大会(島根)、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。(別紙33)
34	2013年5月	2013 Weinstein Conference (Arizona, USA)、Yuika Morita, Kazuko Koshiba-Takeuchi and Jun K. Takeuchi、Direct Differentiation from Pluripotent Stem Cells to Cardiac Lineages by Defined Factors。(別紙34)
35	2013年3月	CDB シンポジウム「The Making of a Vertebrate.」(神戸)、Yuuta Moriyama, Shoji Kawakami, Naoko Yokota, Jan Hendrick van Weerd, Jun K Takeuchi, Kazuko Koshiba-Takeuchi、How to Build a Four Chambered Heart: Molecular Mechanism Underlying Atrial and Ventricular Septation in Vertebrate Heart。(別紙35)
36	2013年1月	第7回日仏先端科学(JFFoS) シンポジウム(滋賀)、竹内純、Epigenetic Factors in Cardiac Development and Regeneration。(別紙36)
37	2012年12月	第35回日本分子生物学会年会(福岡)、山田小和加、竹内純、Dnmt1 specifically functions in heart development and maintenance。(別紙37)
38	2012年12月	第35回日本分子生物学会年会(福岡)、中村遼、小柴和子、塚原由布子、笹野哲郎、安藤由貴、小島瑞代、古川哲史、A Sadek Hesham、心臓再生における統合的なクロマチン構造変換。(別紙38)
39	2012年12月	第35回日本分子生物学会年会(福岡)、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。(別紙39)

3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿中	Nature Cell Biology
2		
3		
4		