様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月 ２１ 日現在

機関番号：３２２０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｋ０８５４８

研究課題名（和文）家族性大動脈解離家系のミオシン重鎖Myh11点変異による平滑筋形質転換機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of the transformation of smooth muscle cells in familial thoracic aortic aneurysm and dissection (FTAAD) of point mutation of myosin heavy chain, Myh11,

研究代表者

早川　朋子（Hayakawa, Tomoko）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：３０４２０８２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らはこれまでに、マウスiPS細胞を用いた平滑筋分化誘導培養系構築と合成型から収縮型平滑筋細胞へ移行する培養系構築に成功し、形質転換を制御するヒストン修飾酵素Nsd1を同定した。本研究において、Nsd1発現抑制とMyh11発現亢進の間で作用する分子の解析を行った。bHLH型転写因子群がNsd1の下流として働きMyh11発現亢進を誘導することが判明した。bHLH転写因子群に着目し、培養平滑筋細胞に対して発現抑制を行ったところ、Nsd1抑制と同様にMyh11発現亢進が確認された。これにより、Nsd1の下流としてMyh11発現を調節する遺伝子として、bHLH転写因子群が重要である事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
動脈硬化に起因する虚血性心疾患や脳卒中は、主要な死因の一つである。脱分化した血管平滑筋細胞は、動脈硬化や大動脈瘤病変で観察され、血管疾患を促進する。Myh11は、平滑筋細胞の分化において最も成熟したときに強く発現するが、脱分化にともないMyh11発現は急激に低下する。本研究は、Myh11発現を制御するエピジェネティックな因子であるNsd1の作用を解析することで、動脈硬化が惹起されるメカニズムが解明される。今回、in vitroの系でbHLHs因子群がNsd1の下流として作用することがわかったため、これら因子群が動脈硬化の創薬のターゲットになる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：We had successfully established a culture system for inducing smooth muscle differentiation and transition from synthetic to contractile smooth muscle cells using mouse iPS cells, and identified the histone modification enzyme Nsd1 as a regulator of transformation. In this study, we analyzed the molecules that act between Nsd1 repression and Myh11 upregulation. bHLH-type transcription factors were found to act downstream of Nsd1 and induce Myh11 upregulation. bHLH-type transcription factors were focused on and their expression was repressed in cultured smooth muscle cells, and the results showed that Nsd1 Myh11 expression was upregulated in cultured smooth muscle cells, similar to the suppression of Nsd1. This indicates that the bHLH transcription factors are important as genes that regulate Myh11 expression downstream of Nsd1.

研究分野：循環器

キーワード：平滑筋細胞　動脈硬化　形質転換

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｆ－１９－２

１．研究開始当初の背景

血管平滑筋細胞の収縮型（分化型）から合成型（脱分化型）への形質転換は動脈硬化疾患の重要な原因である。平滑筋ミオシン重鎖(Myh11)は平滑筋細胞の分化マーカーであり、主に細胞質に局在して平滑筋収縮に寄与する。それに対し核内に局在するミオシンは転写制御に関与するとの報告がある。申請者らは、⑴マウス iPS 細胞を用いた平滑筋分化誘導培養系構築と、⑵合成型から収縮型平滑筋細胞へ移行する培養系構築に成功し、形質転換を制御するヒストン修飾酵素 Nsd1 を同定した。Nsd1 の発現を抑制すると培養平滑筋細胞の Myh11 発現と収縮性が亢進する。さらに、申請者らは家族性大動脈解離家系から Myh11 遺伝子変異を見出し、遺伝子変異マウスの樹立に成功した。このマウスはストレス負荷により大動脈解離を高頻度で生じるなど血管病の表現型を呈する。

２．研究の目的

（１）　動脈硬化症は、平滑筋細胞の形質転換による動脈壁の肥厚および弾性喪失を引き起こす心血管疾患の総称であり、多くの先進国における死亡の主な原因となっている。特に大動脈解離・大動脈瘤破裂といった大動脈救急疾患は、予後が不良であることや治療法の進展がみられないことから病態解明が喫緊の課題である。申請者らは平滑筋の形質転換を制御することができれば動脈硬化の治療と予防に貢献できるとの考えから、本研究の目的を Myh11 の尾部領域変異と Nsd1 による平滑筋細胞形質転換の解明とした。

（２）　申請者らは家族性大動脈瘤・解離が多発する家系を発見し、その原因が Myh11 遺伝子変異(del1263K)であることを突き止めた（Imai Y, et al. Int J Cardiol 2015）。申請者らは同家系の変異ノックインマウスを新規に作製し、薬物負荷により大動脈解離と瘤を発症し動脈管開存を合併するモデルマウスを作製した。これまでヒトの病態を反映する Myh11 遺伝子変異によるモデルマウスは世界に例がないことから、申請者らの発見した Myh11 変異(del1263K)が大動脈平滑筋の形質転換の新たなメカニズム解析に重要な役割を果たすと期待される。

（３）　Nsd1 遺伝子のハプロ不全が原因として知られるソトス症候群は、新生児の 5-40%の頻度で先天性心奇形が、また小児から成人において上行大動脈拡張が認められる。そこで我々は心血管系における Nsd1 の作用を調べるため、Nsd1 欠損ホモ接合マウスを作製し心機能の解析を行う。

３．研究の方法

（１）　ChIP sequence

（２）　体外受精

（３）　Tail-cuff による血圧測定

（４）　qRT-PCR

（５）　RNA sequence

（６）　遺伝子改変マウスの形態解析

４．研究成果

（１）　ChIP seq を行ったが、抗体の不適合のため解析ができなかった。

（２）　Nsd1 遺伝子欠損マウスを大量に作出するために体外受精技術の新規確立を行った。ヘテロの卵と精子より体外受精を行ったところ、野生型、ヘテロ、ホモの割合は、32%, 47%, 21%であった。ヘテロの雄雌の交配ではホモ接合体はほとんど生まれてこなかったが、体外受精技術が確立したため、ホモ接合体の解析が可能になった。

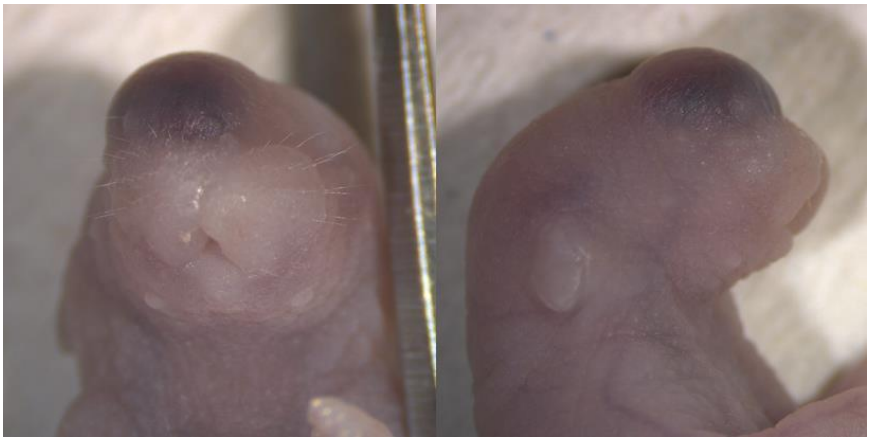
（３）　野生型とホモ型の収縮期血圧を測定したが、差は見られなかった。

（４）　Nsd1 発現抑制と Myh11 発現亢進の間で作用する分子の解析を行った結果、Tw1 を含む複数の bHLH 型転写因子群の発現が約 20～60%低下することが判明し、bHLH 型転写因子群が Nsd1 の下流として作用する可能性が示唆された。

（５）　培養平滑筋細胞に対し Nsd1 発現抑制を行ったところ、培養平滑筋細胞の性質が合成型から収縮型へ部分的に回復したことが確認された。さらに RNA seq による Gene ontology analysis により、発現上昇遺伝子群は有意差の大きい順の上位５位全てが circulatory, cardiovascular, muscle system 関連遺伝子群であり、また muscle contraction も含まれていたことから、収縮型平滑筋に重要な遺伝子群が網羅的に上昇した事が証明された。

（６）　ヘテロ型の Nsd1 欠損マウスの形態を解析した所、頭部・骨格形成異常、腸ヘルニア、歯の異常、水腎症が見られた。

新生児の頭部形成の異常（出生直後に死亡）

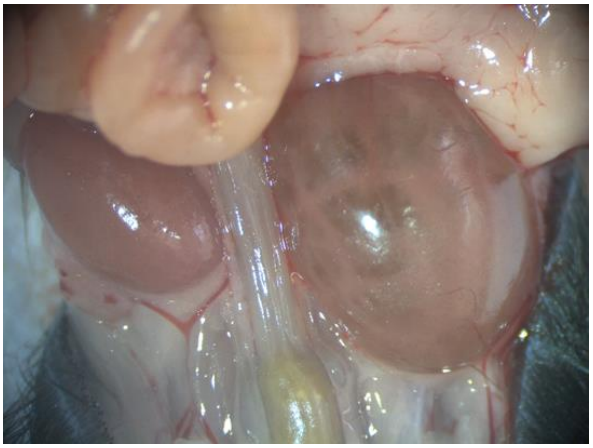


骨格形成の異常（出生直後に死亡）

腸ヘルニア（出生直後に死亡）

歯の異常

水腎症



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 早川朋子、今井利美、相澤健一、今井靖、永井良三、真鍋一郎
２．発表標題 レチノイン酸受容体結合因子であるNsd1は血管平滑筋細胞の形質転換を制御する
３．学会等名 第４０回　日本臨床薬理学会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	永井　良三 (Nagai Ryozo) (60207975)	自治医科大学・医学部・学長 (32202)	
研究分担者	今井　靖 (Imai Yasushi) (20359631)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	相澤　健一 (Aizawa Kenichi) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関