

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08144

研究課題名（和文）心筋脱分化を特異的に誘導する新規転写因子の機能解析

研究課題名（英文）Investigating the molecular mechanism of cardiomyocyte dedifferentiation induced by a novel transcription factor

研究代表者

小川 真仁（Ogawa, Masahito）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：00898009

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では顕著な心筋脱分化を特異的に誘導可能にする転写因子の同定とそのメカニズムの一端を明らかにする事ができた。心筋脱分化と心筋細胞増殖は異なる制御機構により調整されており、新たな知見を得る事が出来た。またこれにより脱分化特異的に制御することにより、心臓再生における重要な役割も明らかにする事が出来た。メカニズムの解析において脱分化心筋細胞に特徴的な遺伝子発現変動とエピゲノム変動が見られ、この事が脱分化誘導機構の一つ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

これまで心臓再生時において心筋脱分化が観察されており再生機構に重要であると考えられてきたが、その機能はまだ詳しく理解されていない。本研究は心筋脱分化の重要性を明らかにする事に成功した。これにより心筋自己再生を応用した再生療法を開発するために重要な制御機構の解明になると言え、新たな心不全治療の確立に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Here, we identified a transcription factor (TF) that possesses a novel role in cardiomyocyte (CM) dedifferentiation and could know how the TF can cause the phenomenon. CM dedifferentiation and proliferation, the key events to achieve cardiac regeneration in zebrafish were controlled by distinct genetic pathways. The genetically modified zebrafish models can specifically promote or impede CM dedifferentiation through the loss of and gain of function of the TF demonstrating the important role of dedifferentiation during cardiac regeneration. Epigenomic approaches highlighted the induction mechanism of CM dedifferentiation caused by the TF.

研究分野：循環器

キーワード：再生 心筋細胞 増殖 脱分化 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

学術的背景 ゼブラフィッシュの心臓は損傷を受けた後、既存の心筋細胞が脱分化・増殖することにより再生する (Kikuchi, et al., Nature. 2010)。心筋脱分化は一時的に未分化様となる形態の変化であり、増殖能を活性化させると考えられている。しかし、心筋再生における脱分化誘導のプロセスや、脱分化のみに介入して増殖能を向上できるかは詳しく解析されていない。心筋再生時の脱分化を誘導可能にする転写プログラムの解析、およびその中枢に働く転写因子を同定することは上記の問題を解決する上で重要な課題である。

最近、申請者は赤血球特異的と知られている転写因子 *krüppel-like factor 1 (klf1)* が損傷によりゼブラフィッシュの心筋細胞で発現し、心筋脱分化と増殖誘導を調節しているという新規の再生機序を明らかにした。更には *klf1* を非損傷時の心筋に強制発現させると著しい心筋細胞の脱分化と増殖を誘導させることに成功した (Ogawa et al., Science.)。更なる解析で *klf1* の心筋細胞増殖と脱分化誘導機能は、それぞれ特徴的なメカニズムにより調節されていることが明らかになった。このことにより増殖とは独立して心筋脱分化を誘導する転写プログラムがある事を示唆している。

そこで本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、**心筋再生において心筋脱分化に特異的な機能を制御する転写因子は何か、またどのようにそれを可能にしているか**。更にはその中枢を担う転写因子の機能阻害・亢進により心筋細胞増殖能の不全および著しい向上が可能かである。

これを解決する為には心筋脱分化を特異的に誘導する転写因子の同定が必要となる。先行研究として申請者は、*klf1* の下流解析により見つかった転写因子が心筋脱分化を特異的に誘導する可能性を示した。

転写因子の同定には、タモキシフェン依存性に心筋特異的に *klf1* を過剰発現させたゼブラフィッシュの、心臓(7日目)の RNA-seq 解析の結果を用いた。申請者の先行研究や他研究室の研究 (Monroe T. et al. Dev Cell. 2019) から、心筋細胞分化関連遺伝子に抑制的な制御が心筋の脱分化誘導に重要である。そこで転写抑制機能を持つ事が知られている転写因子のみに注目した。その中で転写抑制因子との報告があり発現上昇率で最上位の転写因子かつ上流に *klf1*-ChIP-seq のピークを持ち、*klf1* が直接的に調節する遺伝子を選定した。

以上の事からこれを標的として心筋特異的転写因子過剰発現ゼブラフィッシュを作成した、非損傷時の心臓で候補の転写因子を強制発現させると、心筋脱分化で特徴的な脱分化マーカーの発現とサルコメア構造の崩壊が見られた。更なる解析で候補因子は *klf1* とは異なり心筋細胞の増殖の誘導はほとんど示さなかった。これにより新たに**心筋細胞脱分化を特異的に誘導可能にする因子**である事が明らかになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は新規に同定された転写因子が持つ心筋脱分化を特異的に誘導可能にする分子機序の解明、および候補転写因子の機能阻害/亢進による心筋細胞増殖への影響を解析する事である。これにより心筋再生における心筋脱分化の機能の一端を明らかにすることを目標としている。それを可能するために以下の2つの研究を行う。

Aim1. 候補転写因子が持つ心筋脱分化特異的な機能を ChIP-seq、ATAC-seq と RNA-seq を用いたエピゲノム解析、トランスクリプトーム解析により明らかにする。

Aim2. 心筋での候補転写因子に対する遺伝子介入による発現抑制/強化は心筋細胞増殖機能の不全/更なる向上を示すか解析する。

3. 研究の方法

Aim1. 心筋の候補転写因子発現による心筋脱分化特異的に誘導可能にしている機序の解析

方法 先行研究でも用いたゼブラフィッシュの心筋特異的候補転写因子過剰発現モデルを用いて、タモキシフェン依存性に心筋へ候補転写因子を過剰発現させ脱分化を示した心臓(7日または14日目)から RNA とクロマチンをそれぞれ分取する。このサンプルから RNA-seq、

ATAC-seq, ヒストン ChIP-seq(H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3)を行い、コントロール(非過剰発現)と比較し、それぞれから心筋の脱分化に特徴的な遺伝子発現パターンとクロマチンの構造やヒストン修飾のパターンの変化を示すデータを得る。更には HA 抗体を使用し、心筋で過剰発現させた候補転写因子に対する ChIP-seq も同時に行い、候補転写因子が DNA 結合する領域の探索も行う。バイオインフォマティクスを活用して、それぞれの解析データを結合させて候補転写因子が標的とする遺伝子として予測される心筋分化関連遺伝子およびエピゲノム制御因子に対して、どのような調節領域に結合し発現調節しているかをクロマチンレベルと mRNA レベルで解析する。

以上により脱分化を起こす新規転写因子の機能をエピゲノム解析、トランスクリプトーム解析から明らかにする。結果により候補転写因子が標的とする下流遺伝子が脱分化誘導機序にどう重要かを明らかにする為、ノックアウトや過剰発現等の遺伝子改変技術にてその役割を解析する。

Aim2. 心筋の候補転写因子に対する遺伝子介入による心筋細胞増殖機能への影響

方法 1 当研究室で確立したコンディショナルノックアウト法(cKO)を用いて心筋特異的に機能を抑制する(Sugimoto K, et al, eLife. 2017)。方法として遺伝子抑制用のジーントラップカセット(図 3A)を TALEN による遺伝子組み換え法を利用して、ゼブラフィッシュの標的遺伝子のイントロン配列に逆位で挿入する事で遺伝子改変した魚 cKO を作成する。このジーントラップカセットは Cre-loxP 反応により loxP/lox5171 間での逆位組換えにより、永続的に順方向に変換され上流遺伝子の転写を停止させる(図 3B)。この魚に心筋細胞特異的に Cre を発現する魚と掛け合せタモキシフェン依存性の心筋細胞特異的 cKO モデルを作成する。cKO およびコントロール(同腹仔)に心筋細胞の再生反応を誘導するために心臓の切除法(Poss KD. et al., Nature. 2002)を用いて損傷を与えて、心筋細胞増殖能および再生能への影響を組織学な解析を用いて心筋細胞の増殖率、DNA 合成を起こす心筋細胞数の評価を行う。更にはコラゲナーゼ処理により単離した心筋細胞を解析に用いて、単一細胞レベルでの細胞周期の解析を行う。

方法 2 心筋細胞分裂は非常に短時間で完了するので観察し定量する事は、上記の心臓切除による心筋再生モデルでも難しいが、図 1B のように心筋特異的 kif1 過剰発現モデルの心筋は細胞分裂が多く観察される。そこで心筋特異的 kif1 過剰発現モデルと cKO を掛け合わせた後に、方法 1 と同様な解析に加えて pHH3 染色による心筋細胞分裂数や形態変化の評価も入れて解析を行う。

方法 1 と 2 を通して候補転写因子の制御する心筋脱分化が心筋細胞増殖能への影響と心筋細胞増殖時のどの過程に関与しているかを明らかにする。また結果によっては cKO にて転写阻害された心筋の核(ヒストン H2B-GFP 陽性)とコントロールの心筋からの核(cmlc2:nls-dsRed 陽性)を FACS で分取し、RNA-seq を解析にて比較し、更なる機序を解析する。

方法 3 心筋特異的候補転写因子発現モデルを用いて心筋で候補転写因子を増加させ心筋の脱分化を誘導させた後、心筋細胞の増殖・再生反応を誘導させる為に心臓切除法および心筋特異的 kif1 過剰発現モデルにて心筋細胞増殖を誘導する。この実験で得られた心臓を方法 1 と 2 で行う評価法を用いて、心筋細胞の増殖能が向上するか解析する。

4. 研究成果

本研究では心筋脱分化を特異的に誘導する新規転写因子の同定とその機能を明らかにし、更には心臓再生における心筋脱分化の重要性を理解する事を行った。

まず Aim1 として候補転写因子を心筋で過剰発現させ心筋脱分化を誘導した心臓を用いて、RNA-seq を行った。ここで明らかになった事はサルコメアの構成に必要な心筋遺伝子の発現減少や心筋分化に役割を持つ遺伝子の発現が減少し、脱分化の誘導機構の一端が示された。これらの遺伝子の発現変化の要因を明らかにするため、この心臓を用いたエピゲノム解析の ATAC-seq とヒストンと転写因子 ChIP-seq を行った。詳細な結果は現在解析中だが、簡易的な解析ではいくつかの心筋分化に関わる遺伝子の非活性化が見られる事がわかり、クロマチンの構造変化を介して遺伝子抑制している結果が見られた。これらの変化が脱分化の誘導の制御機構である事が分かった。また scRNA-seq 解析も行い、現在までに単一心筋細胞レベルでの遺伝子発現変化を基に心筋脱分化に特徴的な細胞分布と流動性を示す事が分かった。

次に Aim2 として候補遺伝子に対する cKO モデルを作製した。挿入したジーントラップカセットの有用性を確認する為に gPCR とサザンブロットを行い、カセットが正しい位置に単一遺伝子として組換えが起こったことが確認された。このモデルを用いて心筋特異的な CreER ラインを掛け合わせるため心筋特異的 cKO モデルを確立した。このラインを用いてこの候補転写因子の活性を抑制した後、心筋傷害により再生を誘導した所、この転写因子は心筋再生において重要な役割を持つ事が明らかになった。現在はこれらの結果をまとめて論文を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Luo Kaiping, Ogawa Masahito, Ayer Anita, Britton Warwick J., Stocker Roland, Kikuchi Kazu, Oehlers Stefan H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Zebrafish <i>Heme Oxygenase 1a</i> Is Necessary for Normal Development and Macrophage Migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zebrafish	6. 最初と最後の頁 7~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/zeb.2021.0058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Friedman CE, Cheatham SW, Mills RJ, Ogawa M, Redd MA, Chiu HS, Shen S, Sun Y, Mizikovsky D, Bouveret R, Chen X, Voges H, Paterson S, De Angelis JE, Andersen SB, Yoon S, Faulkner GJ, Smith KA, Harvey RP, Hogan BM, Nguyen Q, Kikuchi K, Hudson JE, Palpant NJ.	4. 巻 -
2. 論文標題 HOPX governs a molecular and physiological switch between cardiomyocyte progenitor and maturation gene programs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.04.17.488603	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Friedman CE, Cheatham SW, Negi S, Mills RJ, Ogawa M, Redd MA, Chiu HS, Shen S, Sun Y, Mizikovsky D, Bouveret R, Chen X, Voges HK, Paterson S, De Angelis JE, Andersen SB, Cao Y, Wu Y, Jafrani YMA, Yoon S, Faulkner GJ, Smith KA, Porrello E, Harvey RP, Hogan BM, Nguyen Q, Zeng J, Kikuchi K, Hudson JE, Palpant NJ.	4. 巻 59
2. 論文標題 HOPX-associated molecular programs control cardiomyocyte cell states underpinning cardiac structure and function	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 91~107.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2023.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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 Masahito Ogawa, Kazu Kikuchi
2. 発表標題 Elucidating mechanism of cardiomyocyte renewal induced by transcription factor Klf1
3. 学会等名 第28回小型魚類学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 産業財産権の種類、番号 特許、P202305	発明者 菊地 和, 小川 真仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P202305	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Klf1 induced cardiomyogenesis	発明者 菊地 和, 小川 真仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-506453	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
オーストラリア	Victor Chang Cardiac Research Institute			
英国	University of Dundee			