

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22689026

研究課題名（和文） 心臓構成細胞分化誘導メカニズムへの理解

研究課題名（英文） Understanding the functional mechanisms of cardiac cell induction

研究代表者

竹内 純 (TAKEUCHI JUN)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：10451999

研究成果の概要（和文）：

## (1)心室筋・心房筋分化のプログラミング因子の単離

先行研究より、Baf60cの発現以降に心室筋・心房筋の運命決定がなされる事が明らかとなった。この結果を元に、心臓発生時期と出生0日のから心房と心室領域からマイクロアレーを行いmRNA発現プロファイルを作製した。さらにqRT-PCRで時系列発現変化を再確認した後、20候補因子に絞り込みを行った。マウス胚における発現様式を確認したところ、12遺伝子(分泌性6、転写因子4、エピジェネティック2)において興味深い結果が得られた。mRNAの発現領域をマウス胚を用いて確認したところ、6因子において興味深い発現が見受けられた。現在強制発現系を樹立中。分泌性因子に関してはレコンビナントを作製し、ES分化細胞系への投与と心筋初代培養系に投与を行い、心室筋様細胞及び心房筋様細胞に分化する結果が得られている(特許申請中)。

## (2)心臓前駆・幹細胞のプログラミング因子の探索

既知の心臓幹・前駆細胞特異的に発現するマーカー(Islet1、Flk1)を用いて両陽性細胞からマイクロアレーを行い15の候補遺伝子を単離した。この候補遺伝子は1:マウス9日胚における発現様式、2:ES細胞分化誘導系における時系列発現変化様式で絞り込みを行ない、遺伝子破壊マウスの表現型結果と初期胚における発現様式を再確認し、8種類の候補遺伝子に絞込んだ。結果、心臓中胚葉誘導因子である可能性があるC,Dで、細胞系譜解析(creERT2 KIマウスをROSA-YFPレポーターマウスと交配)を行ったところ、心臓構成細胞(心筋、刺激伝導系、平滑筋、内皮)に分化していることは明らかとなった(論文投稿中)。さらに、これらの細胞を発現した細胞集団は効率よく心臓を構成する細胞群(心筋、刺激伝導系)に分化していた(特許申請済2012年1月23日：国際特許申請済2012年12月22日)。

研究成果の概要（英文）：

Two types of cardiomyocytes; atria-ventricular cardiomyocytes are formed from their common progenitor cell lineages, but a key factor for induction of cardiac progenitor cells as well as the specification of cardiomyocytes is not known yet. To understand atria-ventricular cardiomyocyte or cardiac progenitor specification, we generated gene profiles from aMHC-GFP positive heart cells in these mice lines or Islet1/Flk positive cells in mice

embryos. 6 genes were isolated as candidate factors for specification of atria-ventricular cardiomyocytes, 8 genes were screened out as cardiac progenitor specific-genes. Two genes, C or D, were expressed in undifferentiated cell region that defined by islet1/Nkx2-5 gene as major cardiac progenitor markers during development but not expressed in the heart forming region. These genes' knockout mice exhibit severe defect of OFT and RV and die at approximately E9.5, suggesting that C/D-derived cells contribute to the heart and are essential for cardiogenesis. By using tamoxifen inducible creERT2-ROSA-YFP reporter system, lineage-tracing analysis of C/D-derived cells could easily demonstrated in vivo. In these analyses showed us that previously expressed these genes substantially contribute to the whole-heart in development, expressing in atria/ventricular cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle, and conduction cells including pacemaker cells. In conclusion, re-expression of C/D as candidate genes is necessary to promote cardiac program in postnatal stages, suggesting that C/D genes play as key regulators to trigger cardiac program.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋分化、心臓前駆細胞、エピジェネティクス、クロマチン因子

#### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋分化（転写因子MyoDにより制御）、平滑筋分化（転写因子Myocardinにより制御）とは異なり、心筋分化を誘導するマスター因子は長年見つかっていなかったため、多くの研究者はサイトカイン投与による心筋誘導には様々な問題点が明らかとなり、臨床応用を見据える上ではマスター制御遺伝子の同定は必須であった。本研究代表者はエピジェネティック因子であるクロマチン構造変換因子SWI/SNF-BAF群に着目し、心臓発生、心疾患における機能を研究してきた。その結果、クロマチン因子群の中には組織特異的に発現する因子が存在し、発生過程における領域の区画化形成に関わっていることをマウス発生

工学・分子生物学を用いて明らかにした(Lickert,Takeuchi et al.Nature 2004; Takeuchi et al.PNAS 2007; Zhu et al.PNAS 2008; Yoshimura et al.PNAS 2009)。さらに、マウス胚の強制発現系において、クロマチン因子の一つBaf60cと心臓特異的転写因子を共発現させることにより、心筋収縮因子の発現と共に拍動細胞の誘導に成功した(Takeuchi & Bruneau.Nature 2009)。

この結果から、クロマチン構造を変換するエピジェネティックシグナル因子を基底とする機能複合体が細胞の特殊分化に作用していると考えられる。しかしながら、SWI/SNF-BAF因子が心臓構成細胞（心室・心房心筋、ペースメーカー細胞、刺激伝導系細胞、心内皮細

胞)の分化系譜全てを制御しているのか、特定細胞分化をのみ制御しているのか、申請者の結果からでは明らかに出来ていない。この制御メカニズムを明らかにすることはクロマチン因子の分子メカニズムをより詳細に解明するだけでなく、iPS細胞等の細胞移植を利用した再生医療を行っていく上で極めて重要な課題である。なぜなら、未分化細胞やiPS細胞を将来の臨床応用を目指し再生医療に用いる為には、「単一であり、心筋以外には分化しない純化細胞」という大きな課題を克服する必要があるからである。

よって、心臓発生における BAF 因子を始めクロマチン構造変換複合体の細胞系譜を明らかにし、特定細胞を誘導する機能複合体の同定することを目的とした研究が必要となってくる。

## 2. 研究の目的

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、細胞の運命が決定される場合も、再度プログラミングされる際においても、エピジェネティックな影響も重要な要因となっている。

本研究において申請者は、心臓誘導・心筋分化過程においてクロマチン状態に強く影響を受ける2つの問題解明を目的とする。

(1)心筋発生におけるクロマチン因子の特定細胞への分化誘導機能(クロマチン因子制御かの可能性にある、心筋分化、心臓前駆・幹細胞、ペースメーカー細胞の樹立)を明らかにし、(2)心臓誘導時におけるクロマチン因子の領域特異的発現・機能を制御する上流メカニズムを明らかにすることを目標とする。

## 3. 研究の方法

(1):クロマチン因子に制御される心臓構成細胞(1A心筋細胞、1B心臓幹細胞、1Cペースメーカー細胞)の分化制御機構の樹立

(2):クロマチン因子の細胞系譜研究と発現細

胞の選別、機能複合体の同定

## 4. 研究成果

3(1):に関してはさらに3つのパートに分けて研究を行った。(1A);心房筋・心室筋特異的分化、(1B);心臓前駆・幹細胞分化、(1C);ペースメーカー分化から理解することをテーマに掲げて研究を行ってきた。1(A)に関しては、RNAi法を用いて候補因子の機能阻害実験を行ってきた。その中で、心房誘導に関わる分泌性因子を一つ、転写因子を3つ同定した。また、心室誘導に関わる候補因子を2つ同定してきた。現在、マウス全胚培養を用いた強制発現系において遺伝子の組み合わせを用いて心臓予定域以外組織において強制発現を行なっている。また、同時に細胞培養系をお用いて、強制発現を行なうためのウイルス作製を行なっている。1(B)においては、既に特許申請(東京大学知財部管理番号:32B121002-1)と国際特許申請を行ない、さらに心臓前駆細胞を誘導する特定のプログラム因子の同定まで至った。本研究は非常に新しい概念を含んでおり、直接ES細胞から心臓誘導可能であることが証明された。現在論文作製中であり、さらに特許申請を行なうと同時に線維芽細胞や皮膚組織を用いてリプログラム可能か、実験予定である。1(C)に関しては、1(A)の候補因子の中に誘導活性を持った因子を見出した。現在、カルシウムイメージングを立ち上げ、心筋タイプの選別を行なっている。

3(2):に関しては、2つの仕事を行なった。2(A);クロマチンコア因子であるBrg1の心臓特異的に遺伝子破壊マウスの作製。この研究において、先天性心疾患の重篤化がクロマチン因子の発現量に依存することが世界で初めて報告出来た。さらに、心臓特異的遺伝子破壊マウスでは心筋分化の極度の阻害が見受け

られ、これは心筋増殖因子の発現が抑制されていることが明らかとなった (Takeuchi et al., Nature Commun. 2011)。

2(B) ; クロマチン因子の恒常的発現 (TG) マウスの作製と心筋再生には特異領域でのクロマチン構造の変換機能。心室筋内において心筋成熟期に連れて発現量が減少するエピ因子を見出した。このエピ因子を恒常的に発現するTGマウスでは心奇形を伴わなかったが、心筋梗塞マウス(MIマウス)においては極度に心不全抑制効果がみられた。(論文投稿中 2013; van Weerd, Koshiba-Takeuchi et al., *Cardiovas. Res.* 2011)。心筋保護因子として注目しており、この心筋では心筋増殖因子、心特異的ホルモン、血管申請因子のエンハンサー領域においてH3k27acされ、PolIIIが強くリクルートされていた(通常では発生に伴って、これらの領域ではH3k27me3され、転写が抑制されている)。つまり、クロマチン構造変換因子の強発現によってヒストン修飾変換も生じることが分かり、これからはクロマチン因子が何を認識して、どのようにクロマチン構造を変換して行くのか、調べて行く必要がある。つまり、次の課題はChIP-seqと質量分析計を用いた生体パートナーの同定である。そして、この心臓保護作用メカニズムがヒトにおいても保存されているか、研究して行かなくてはならない。その為にはヒト心筋、もしくはiPS細胞を用いた実験を組む必要があるとも考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- (1) 竹内純、エピジェネティクスで組織可塑性を理解する、羊土社、実験医学、Vol.30 No.18、2896-2901, 2012、査読無
- (2) 中村遼、塚原由布子、竹内純、心臓発生

と心疾患のエピジェネティクス — クロマチンモデリング因子・ヒストン修飾因子が織りなす複雑な臓器発生機構のモデルとして —、羊土社、実験医学、Vol.30 No.18、2923-2931, 2012、査読無

(3) 森田唯加、小柴和子、竹内純、心臓発生とその分子メカニズム、メディカルレビュー社、血管医学、Vol.13 No 3、97-113、2012、査読無

(4) 塚原由布子、小柴和子、竹内純、心臓発生にかかわるクロマチン・ヒストン制御の役割、メジカルビュー社、Heart View、Vol. 15 No. 8、55-63、2011、査読無

(5) van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK., Epigenetic factors and cardiac development, Cardiovascular Res., 91, 203-11, 2011, 査読有

(6) Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-Olguín P, Holloway AK, Mori A, Wylie JN, Munson C, Zhu Y, Yu-Qing Zhou<sup>9</sup>, Ru-Fang Yeh<sup>6</sup>, Henkelman RM, Harvey RP, Metzger D, Chambon P, Stainier D<sup>YR</sup>, Pollard KS, Scott IC, & Bruneau BG, Chromatin Remodeling Complex Dosage Modulates Transcription Factor Function in Heart Development, Nature Communications 1187, 1-11, 2011、査読有

(7) 竹内純、宮川一富田幸子、笹岡陽介、小柴和子、心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子中外医学社 Annual Review 循環器、1-16, 2011、査読無

(8) 杉崎弘江、竹内純、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、羊土社、実験医学、Vol.28、62-69、2010、査読無

[学会発表] (計43件)

- (1) Jun K Takeuchi, et al., How to Build a Four Chambered Heart: Molecular Mechanism Underlying Atrial and Ventricular Septation in Vertebrate Heart, CDB シンポジウム「The Making of a Vertebrate.」(神戸), 2013.3.4
- (2) 竹内純, Epigenetic Factors in Cardiac Development and Regeneration, 第7回日仏先端科学(JFFoS)シンポジウム招待講演(滋賀), 2013.1.25
- (3) 竹内純, 心疾患重篤化と心機能再生に関わるエピジェネティック因子群、奈良県立医科大学セミナー招待講演(奈良), 2012.12.26
- (4) 竹内純, 他, Dnmt1 specifically functions in heart development and maintenance, 第35回日本分子生物学会年会(福岡), 212.12.11
- (5) 竹内純, 他, 心臓再生における統合的なクロマチン構造変換, 第35回日本分子生物学会年会(福岡), 212.12.11
- (6) 竹内純, 他, 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, 第35回日本分子生物学会年会(福岡), 212.12.11
- (7) Jun K Takeuchi, et al., Sa+ Cells, a Novel Cardiac Lineage, Promote Heart Program and Its Regeneration, 第29回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会(福岡), 2012.10.26
- (8) 竹内純, 他, 特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構, 第11回日本心臓血管発生研究会(福島), 2012.10.19
- (9) 竹内純, 他, 心筋再生におけるエピゲノム制御機構, 第11回日本心臓血管発生研究会(福島), 2012.10.19
- (10) 竹内純, 他, 特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構, 第3回Molecular Cardiovascular Conference II(北海道), 2012.9.8
- (11) 竹内純, 心臓再生能力を司るクロマチン結合制御因子群, 第33回日本炎症・再生医学会(福岡), 2012.7.5
- (12) Jun K Takeuchi, et al., Fetal epigenetic modifiers stimulate cardiomyocyte regeneration and protect fibrosis in mammalian/ampfibian models, 第10回国際幹細胞学会(ISSCR)年次総会(横浜), 2012.6.14
- (13) Jun K Takeuchi, et al., Sall promotes cardiac progenitor cell fate and fully contribute to cardiomyocyte lineages, 第10回国際幹細胞学会(ISSCR)年次総会(横浜), 2012.6.14
- (14) 竹内純, 他, 心臓再生向上因子としてのクロマチン制御機構, 第11回日本再生医療学会総会(横浜), 2012.6.13
- (15) 竹内純, 他, Sall は心臓前駆細胞必須因子として全心臓細胞系譜を制御する, 第11回日本再生医療学会総会(横浜), 2012.6.13
- (16) 竹内純, クロマチン因子から見る心臓再生と心筋可塑性, 第55回日本腎臓学会学術総会(横浜), 2012.6.1
- (17) Jun K Takeuchi, et al., Epigenetic factors and the capacity for heart regeneration in mammals, 第45回日本発生生物学会(神戸), 2012.5.28
- (18) Jun K Takeuchi, et al., Cell-Fate Sppecification of Cardiac Progenitors/Stem Cells by Defined Factors in vivo and in vitro, 第45回日本発生生物学会(神戸), 2012.5.28
- (19) Jun K Takeuchi, et al., Sall+ Cells Represent a Renewing cardiac Progenitor Population, 2012 Weinstein cardiovascular development conference (Chicago, USA), 2012.5.3
- (20) Jun K Takeuchi, et al., The novel mechanism of histone-chromatin

regulation for cardiomyocytes regeneration,  
2012 Weinstein cardiovascular

development conference (Chicago, USA),

2012.5.3

(21) 竹内純、心臓構成細胞の運命決定と分化可塑性、次世代医学セミナー・ワークショップ(福島)、2012.2.28

(22) 竹内純、心筋細胞を創るプログラム因子と護るリモデリング因子、第6回フロンティアサイエンス機構サイエンスセミナー(金沢)、2012.2.20

(23) 竹内純、他、新たな心臓前駆細胞制御因子と階層性の理解、第41回日本心脈管作動物質学会(秋田)、2012.2.11

(24) 竹内純、心臓発生と心筋分化誘導のマスター因子、第41回日本心脈管作動物質学会(秋田)、2012.2.11

(25) Jun K Takeuchi, et al., Chromatin Formation is Necessary for Cardiomyocyte Regeneration in Mammal/Amphibian Models, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Keystone, USA), 2012.1.23

(26) Jun K Takeuchi, et al., Sall+ Cells Represent a Renewing cardiac Progenitor Population, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Keystone, USA), 2012.1.23

(27) Jun K Takeuchi, Rate-limiting Function of Chromatin/Histone Modulators for Cardiac Specification, The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section(東京), 2011.12.3

(28) 竹内純、心疾患発症とエピジェネティック因子群、大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患におけるエピゲノム異常の分子機構」(大阪)、2011.11.17

(29) 竹内純、心臓を造る因子と護る因子、東京医科歯科大学難治疾患研究所「難治疾患共同研究拠点事業」による研究集会(東京), 2011.10.21

(30) 竹内純、他、マウスが紐解く心臓研究のアプローチ、日本遺伝学会第83回大会(京都), 2011.9.22

(31) 竹内純、他、胚性・体性心臓前駆細胞をマークする新規因子の特異な分化制御機構、第2回 Molecular Cardiovascular Conference II(北海道), 2011.9.3

(32) 竹内純、心臓誘導と心疾患：エピジェネティック因子群の機能解析からわかったこと、第5回神戸生活習慣病研究会(神戸), 2011.7.24

(33) 竹内純、エピジェネティクスと心臓研究、第13回アテロジェネシス研究会(岐阜), 2011.7.20

(34) Jun K Takeuchi, et al., Cell-Fate Specification of Cardiac Progenitor/Stem Cells by Defined Factors in vivo, ISSCR 9th Annual Meeting(Toronto, Canada), 2011.6.18

(35) Jun K Takeuchi, Chromatin Remodeling and Heart Cell-Fate Specification, 162th IMEG Seminar(熊本), 2011.4.20

(36) 竹内純、心疾患発症におけるエピジェネティクス因子群、日本医学総会(東京), 2011.4.8

(37) 竹内純、Chromatin regulate cardiac cell fates and keep a healthy heart, 第33回日本分子生物学会シンポジウム(神戸), 2010.12.8

(38) Jun K Takeuchi, Direct differentiation to Cardiac cells by defined factors, International Congress of Cardiology(上海、中国), 2010.12.7

(39) 竹内純、Rate-limiting chromatin factors define the individual cardiac cell fate, 日本心不全学会(東京), 2010.10.8

(40) 竹内純、心臓発生を紐解くクロマチンモデリング因子研究、第1回 Molecular Cardiovascular Conference II (北海道), 2010.9.4

(41) 竹内純、心臓発生を紐解くクロマチンモデリング因子研究、第9回心臓血管発生研究会(浦安), 2010.7.10

(42) 竹内純、Epigenetic signal pathway controls cardiac hyperrophic signaling by modulating fetal gene programs, 第43回発生生物学会(京都), 2010.6.23

(43) 竹内純、Cardiac transcription factors, World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2010(北京、中国), 2010.6.19

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：特定因子による心臓幹・前駆細胞の誘導／活性化方法

発明者：竹内純、森田唯加、塚原由布子

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2012-011458

出願年月日：2012年12月21日

国内外の別：国外

○取得状況 (計1件)

名称：高効率心臓細胞分化能を持った新規心臓前駆(幹)細胞制御因子の樹立法

発明者：竹内純、森田唯加、塚原由布子

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2012-011458

取得年月日：2012年1月23日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/junktakeuchi-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 純 (TAKEUCHI JUN)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：10451999

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：