

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591083

研究課題名(和文)非古典的Wntシグナルのエピジェネティック修飾による心筋遺伝子発現の調整について

研究課題名(英文)Epigenetic control of cardiac gene expressions by non-canonical Wnts

研究代表者

小柳 雅孔 (Koyanagi, Masamichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00325474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルが心筋遺伝子発現に重要であることが言われてきたが、最近非古典的Wntタンパクも成人幹細胞・前駆細胞の心筋遺伝子発現を増加させることが分かってきた。しがしながら下流のシグナルは不明であった。申請者は、血管内皮前駆細胞をWnt5aで刺激するとヒストンリジンメチル化酵素とヒストンリジン脱メチル化酵素の増加を認め、ヒストンのメチル化が変化することを見出した。マウスおよびラットの成人幹細胞・前駆細胞である間葉系幹細胞(MSC)とマウスES細胞、ヒトMSCで確認を行ったところ、Wnt5aは造血幹細胞系でのみエピジェネティック変化をきたした。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that canonical Wnt as well as non-canonical Wnt signal is important to induce cardiac genes. However underlying signal is not well elucidated. We found that non-canonical Wnt5a increase histone lysine methylases and demethylases in endothelial progenitor cells. This increases changed the pattern of methylated histone. These epigenetic changes has been found in hematopoietic stem progenitor cells in human, mouse, and rats, but not on ES cells and MSCs so far.

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：分子心臓病態学

キーワード：エピジェネティクス 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療による心血管疾患治療戦略において、成人幹細胞・前駆細胞から効率よく心筋細胞に分化させる方法は確立されていない。こうした中、非古典的 Wnt タンパクが成人幹細胞・前駆細胞の心筋遺伝子発現を増加させることが分かってきたが、下流のシグナルは不明であり、これを明らかにすることで心筋再生の効率化をはかることが期待される。申請者は Wnt5a 刺激で増加する遺伝子を、マイクロアレイ法を用い EPC で検討した。するとヒストンのメチル基を修飾する種々の酵素が増加すること、ヒストンのメチル化が変化することを見出した。したがって、非古典的 Wnt が、エピジェネティックなメカニズムを介して遺伝子の発現を制御している可能性が示唆される。エピジェネティック修飾による遺伝子発現調節はいまだ十分に解明されておらず、したがって、非古典的 Wnt とエピジェネティック修飾が遺伝子発現調節に関わることを検証し、効率のいい分化方法を見出そうと企画した本研究は、将来の心臓血管生物学のみならず幹細胞生物学に多大な貢献を果たすことと期待される。また、幹細胞生物学の領域で、どのように心筋細胞の分化が制御されるかということは一大命題であり、特に骨髄由来幹細胞に代表される成人幹細胞の心筋細胞への分化効率が増加すれば臨床での有用性は高まり梗塞心や拡張型心筋症などの心筋細胞への再生療法として発展することが大いに期待できる。本研究では、非古典的 Wnt のエピジェネティック変化による心筋遺伝子の発現制御を検証した。

(Wnt によるエピジェネティック変化) 申請者は EPC を用いた予備実験で、Wnt5a がリジン脱メチル化酵素 (KDM) の一つである JMJD2B を増やすこと、転写抑制に働くメチル化リジン 9 番を脱メチル化することを証

明した。KDM の一つである JMJD2 ファミリーは、ジメチルもしくはトリメチル化された 9 番のリジン基の脱メチル化を起こし、転写を活性化する。したがって、非古典的 Wnt が、リジン脱メチル化酵素を増加し、ヒストンの構造を変化させることで遺伝子の発現を制御している可能性が示唆される

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は、非古典的 Wnt タンパクによる幹細胞 (主に成人幹細胞・前駆細胞) の心筋分化シグナルを解明すること、特に非古典的 Wnt がエピジェネティック変化により心筋遺伝子の発現を制御しているかどうかを明らかにすることである

## 3. 研究の方法

培養細胞を用い分子生物学的手法で実験を行った (詳しくは成果参照)

## 4. 研究成果

1) どのようなエピジェネティック修飾因子が非古典的 Wnt によって増加するか

マイクロアレイによる実験では、Wnt5a は EPC において種々のエピジェネティック修飾因子、すなわちヒストンリジンメチル化酵素 (MLL と NSD1) とヒストンリジン脱メチル化酵素 (JMJD2 ファミリー) の増加を認めていた。このことを確認するために RT-PCR およびウエスタンブロットを行い、遺伝子のみならず、タンパクレベルでも発現が増加していることを確認した。さらに、非古典的 Wnt が他の細胞種でもエピジェネティック修飾因子を増加するかどうか、マウスおよびラットの成人幹細胞・前駆細胞である間葉系幹細胞 (MSC) とマウス ES 細胞、さらにヒト CD34 陽性幹細胞で確認を行ったが、予想に反し、造血細胞系幹細胞・前駆細胞でのみ同様の遺伝子変化を認め、ES 細胞や MSC では認められなかった。

2) 非古典的 Wnt はエピジェネティック修飾

をきたすのか？ そうであればどのようなものか？

クロマチンの活性化因子であるアセチル化ヒストン H3 とトリメチル化された H3 リジン 4 番、抑制因子であるトリメチル化された H3 リジン 9 番と 27 番の EPC における Wnt5a による変化は蛋白発現レベルで確認した。面白いことにトリメチル化された H3 リジン 9 番のみが Wnt5a により減少しており、このことは、全体的なバランスでは Wnt5a 刺激で EPC は遺伝子転写活性化に傾いていることを示唆する。またこの事実は非古典的 Wnt が実際にエピジェネティック修飾に関わっていることを支持する。実際の分化の過程においては全般的なヒストンリジン基のメチル化様式の変化よりはプロモーター部位の詳細な解析が重要であると考えられる。したがって、心筋遺伝子のプロモーターのエピジェネティック修飾様式をクロマチン免疫沈降法で確かめた。すなわちクロマチンの活性化因子であるアセチル化ヒストン H3 とトリメチル化された H3 リジン 4 番、抑制因子であるトリメチル化された H3 リジン 9 番と 27 番の EPC における Wnt5a による変化を心筋遺伝子のプロモーターのうち、TNNT2 のエピジェネティック修飾様式をクロマチン免疫沈降法で確かめた。また、心筋遺伝子以外のプロモーター、eNOS や 2 型 VEGF レセプターは非古典的 Wnt によりヒストンリジンのメチル化様式が変化しないことが分かった。この現象が EPC 特異的か他の細胞種 (MSC とマウス ES 細胞) でも同様かを確認したが、前項と同様に造血幹細胞・前駆細胞でのみ認められた。

3) 心筋分化の過程で内因性ヒストン脱メチル化酵素発現は内因性 Wnt 発現と相関して変化するのか？

マウス成人幹細胞・前駆細胞の心筋分化誘導実験 (Koyanagi et al, *PLoS ONE* 4, e5765) を用い実験を行った。また、成人幹細胞・前

駆細胞以外にもマウスの ES 細胞を用いて実験を行った。内因性の古典的もしくは非古典的 Wnt 発現が心筋分化の過程で増加することが ES 細胞 (Liu et al 2007 *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 104:3859) および EPC (Koyanagi et al, *Circ Res* 2007;101:1139) で示されている。詳しくは、ES 細胞は一過性の古典的 Wnt 発現の後に非古典的 Wnt の増加、EPC の場合は非古典的 Wnt の一過性の増加である。したがって心筋分化の過程における内因性 Wnt の発現変化によりヒストン脱メチル化酵素の発現が調節され、心筋分化に関わっている可能性がある。そこで ES 細胞および成人幹細胞・前駆細胞を用い、ヒストン脱メチル化酵素の発現変化を心筋分化の過程を経時的に調べた。まず内因性 Wnt5a を抑制する目的で、Fzd-2 タンパクを用いたところ、ES 細胞での Wnt5a ターゲット遺伝子である JMJD2B と JMJD2C が有意に抑制された。また、同様に心筋細胞分化実験では有意に抑制された。しかしながら、Wnt5a を加えるのみでは心筋分化が促進されなかったため非古典的 Wnt は ES 細胞の心筋分化には重要であるが唯一の因子ではない可能性がある。このことに関しては更なる研究が必要。

4) ヒストン脱メチル化酵素の心筋分化への役割は？

前述のように研究代表者は Wnt 刺激により 1) ヒストン脱メチル化酵素である JMJD2 が増加すること、2) トリメチル化された H3 リジン 9 番が減少すること、3) 心筋遺伝子が増加すること、を見出した。したがってヒストン脱メチル化酵素である JMJD2 ファミリーの増加が、心筋分化に重要であることが示唆される。そこで我々は、JMJD2B と 2C の過剰発現を行い、心筋分化が増加するか、エピジェネティック修飾、特に心筋遺伝子のプロモーター領域の修飾様式が変化するかを確認する予定にしていたが、過剰発現実験モデルの

開発は細胞腫の問題のためかうまくいっていない。ひとつの理由はJMJタンパクの遺伝子サイズが大きいため遺伝子導入が困難であったことが考えられる。そこでJMJタンパクの働きを確認するために遺伝子抑制試験も行っている。siRNAやshRNA導入法も行っているが、抑制レベルが高率でないためノックアウトモデルを作成中である。現時点では終了できていないが、この系で心筋分化誘導実験を行えば、心筋分化におけるJMJD2の直接的な役割が明らかになる。

#### 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 5件)

1. Alterations in the telomere length distribution and the subtelomeric methylation status in human vascular endothelial cells under elevated temperature in culture condition **著者名:Maeda, T; Guan, JZ; Koyanagi, M; Makino, N**  
AGING CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH 巻: 25 号: 3 ページ: 231-238 DOI: 10.1007/s40520-013-0045-6 発行: JUN 2013
2. Acute myocardial infarction activates progenitor cells and increases Wnt signalling in the bone marrow **著者名:Assmus, B; Iwasaki, M; Schachinger, V; Roex, T; Koyanagi, M et al**  
EUROPEAN HEART JOURNAL 巻: 33 号: 15 ページ: 1911-1919 DOI: 10.1093/eurheartj/ehr388 発行: AUG 2012
3. Aging-Associated Alteration of Telomere Length and Subtelomeric

Status in Female Patients With Parkinson's Disease **著者名:Maeda, T; Guan, JZ; Koyanagi, M; Higuchi, Y; Makino, N**

JOURNAL OF NEUROGENETICS 巻: 26 号: 2 ページ: 245-251 DOI: 10.3109/01677063.2011.651665 発行: JUN 2012

4. Epigenetic Regulation of Endothelial Lineage Committed Genes in Pro-Angiogenic Hematopoietic and Endothelial Progenitor Cells **著者名:Ohtani, K; Vlachoianis, GJ; Koyanagi, M et al**

CIRCULATION RESEARCH 巻: 109 号: 11 ページ: 1219-U71 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247304 発行: NOV 11 2011

5. Hepatocyte Growth Factor Induces a Proangiogenic Phenotype and Mobilizes Endothelial Progenitor Cells by Activating Nox2 **著者名:Schroder, K; Schutz, S; Schloffel, I; Batz, S; Takac, I; Weissmann, N; Michaelis, UR; Koyanagi, M; Brandes, RP**

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 巻: 15 号: 4 ページ: 915-923 DOI: 10.1089/ars.2010.3533 発行: AUG 2011

[学会発表](計 2件)

November 21-22, 2011 (Paris)

European Epigenomics & Stem Cells-2011 Meetings

Masamichi Koyanagi

Title; Wnt5a increases histone lysine demethylases and induces epigenetic remodeling

November 3-7, 2012, Los Angeles, USA

AHA Scientific Sessions

Masamichi Koyanagi (招待講演)

Title; Epigenetic control of stem cell function

〔図書〕(計 1件)

Masamichi Koyanagi and Stefanie Dimmeler

Title; Circulating progenitor cells (a part of "HEART REGENERATION

Stem Cells and Beyond" Pub. date: Mar 2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小柳 雅孔 (KOYANAGI Masamichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 00325474

### (2) 研究分担者

前田 豊樹 (MAEDA Toyoki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号: 30264112

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: