

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370085

研究課題名(和文)細胞力覚が遺伝子発現を制御する分子機構とその生物学的意義

研究課題名(英文)Mechanical control of gene expression and its biological significance

研究代表者

小椋 利彦(Ogura, Toshihiko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙飛行士に見られる筋萎縮など、力刺激を失うことで生体の恒常性は維持できなくなる。本研究では、力という物理的な刺激を細胞/組織がどのように受容し、反応するかを、特に遺伝子発現制御の視点から研究し、力感知性転写制御因子を複数同定した。これらの因子は、心臓発生、血液循環の恒常性、代謝、創傷治癒など、様々な現象で重要な働きをもつことが本研究で明らかとなった。このような研究成果は、宇宙飛行士や寝たきり老人の廃用性萎縮や肥満/糖尿病の治療薬を開発する上で、重要な基盤的知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：As observed as severe muscular atrophy of astronauts in micro-gravity situation, a loss of mechanical stimuli causes failure of homeostasis maintenance. However, molecular mechanisms by which cells and tissues sense physical force stimuli are largely unknown. In this research, we have identified several force-sensitive factors that control gene expression in living tissues. By extensive analyses, we now know that these factors play essential roles in cardiac development, maintenance of circulatory homeostasis, energy metabolism wound healing/regeneration. Our data provide fundamental insights into the disuse syndrome of astronauts and bedridden old patients, obesity/diabetes and their therapeutic approaches.

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：細胞力覚 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

心臓は心拍、血流が無いと正常発生しない。また、心臓内の血流が乱れると、先天性心疾患のような奇形が生じる (*Nature* 421, 172, 2003)。このことは、心臓を構成する細胞への力学刺激が、分化、増殖、形態形成に重要であることを意味している。しかし、力学刺激と形態形成を結びつけるシグナル伝達機構は、ほとんど解析されていない。申請者は、容易に心拍動態を制御できるゼブラフィッシュ心臓をモデルに、心拍/血流によって発現が維持され、弁形成に必須の働きをもつ複数の遺伝子を単離した。本研究では、これらの遺伝子を糸口に、血流、心拍に起因する力学的刺激から遺伝子発現、ひいては弁形成に至る未踏のシグナル伝達機構を解明することを目的とする。また、適宜、マウスを用いて、ヒトの循環器疾患を念頭においた研究を展開する。

2. 研究の目的

生物は、常に力の刺激を受けて生活している。これは、無重力下の宇宙飛行士に見られる顕著な骨や筋肉の萎縮を見れば明らかであり、長期病臥患者にも同様の現象が見られる。これとは逆に、運動による力学刺激を筋肉や骨は感知し、肥大や骨組織の強化によって適応している。また、循環器系においても、長期、短期の血圧負荷、循環血液量の増大などは心肥大を起すし、力学刺激の受容系、反応系の破綻が拡張性/肥大型心筋症を発症することが示されている。

このような機構は、胎児発生にも見られる。例えば、心拍/血流の異常は心奇形の原因となり、遺伝子異常をもたない先天性心疾患の原因になると考えられている (*Nature* 421, 172, 2003)。また、幹細胞は、その外部環境(細胞外基質)の硬さを感じし(Active Touch と呼ばれる)、反応することで分化の方向を硬さに応じて変える(*Cell* 126, 677, 2006)。以上の事実は、細胞が種々の力学刺激を感じし、生化学的、遺伝的反応で応える能力を持つことを意味する。

力学的刺激を受容して遺伝子発現を変化させたり、生化学的な反応で応えるメカニズムを mechanotransduction と呼ぶが、その分子実体はほとんど解明されていない。しかし、mechanotransduction の解明は、加齢や長期病臥による筋肉/骨萎縮、心肥大や心不全、拡張性/肥大型心筋症などの新しい治療法の発見、先天性心疾患発症メカニズムの理解と予防、幹細胞の分化制御や組織構築技術など、きわめて多くの応用的研究に発展する可能性を秘めている。しかも、これらの問題は、従来の分子生物学的な視点とは異なり、工学、物理、数理などの複合的、学際的な着

眼点と手法を内包しており、生命現象を新しい視点で再解釈する糸口となる。

申請者らは、心臓発生に必須な転写因子 Tbx5 の co-activator を探し、Mrtf-b を見いだした。Mrtf-b は Tbx5 に対し強力な転写活性可能をもつが、その詳細な解析によって、拍動による心筋細胞の伸展刺激が引き金となって核内に速やかに移行することを見いだした。ゼブラフィッシュをモデルに用いると、Mrtf-b は心拍を止めると細胞質に、心拍を再開させると核に局在する。このことは、Mrtf-b が細胞への力学刺激に反応して核内に入り、Tbx5 などの転写を調節していることを意味し、力学刺激の遺伝子発現への影響は、予想以上に大きく、直接的であることを物語っている。

また、Mrtf-b のように、力学刺激が遺伝子発現を制御する経路が存在することを踏まえ、ゼブラフィッシュ心臓をモデルに、拍動/血流によって発現誘導、維持される遺伝子の同定を試みた。その結果、miR-143(すでに論文として発表)、miR-21 などの miRNA、Egr1 などの転写因子遺伝子、Crip2、Filamin などの細胞骨格蛋白遺伝子を複数同定した。

本研究では、これまでに申請者が同定した拍動/血流感受性の遺伝子、タンパク質を糸口に、力刺激から遺伝子発現に至る mechanotransduction の一経路を解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

1) Bac DNA から様々な領域を取り出し、レポーターに繋いで解析することによって、miR-21 の弁特異性、力反応性制御部位を同定する。また、この制御部位を用いて in vivo、in vitro で力刺激に対する反応を定量的に可視化するシステムを構築する。また、miR-21 とヒレ/心筋再生との関連を解析する。加えて、miR-21 KO マウスの解析も進める。

2) これまでに同定した力刺激反応タンパク Crip2、Mrtf-b の力刺激依存的核内シヤトルの分子メカニズムを、最新の MEMS 技術を用いて再現し、解明する。

3) Egr1、Filamin などの新規分子について、力反応性がどのようにして生まれるか、その分子メカニズムを解析する。

4) Mrtf-b KO マウスを解析し、Mrtf-b によって支配され、しかも力刺激と結びついた生命現象を見つけ出し、分析する。

4. 研究成果

1) Tbx5/Mrtf-b 転写複合体の研究成果

これまでの実験から、Tbx5 の標的遺伝子 ANF (Atrial Natriuretic Fctor) プロモーター上に、Tbx5 結合部位が複数、タンデムに並び、ここに Tbx5 が結合することが明

らかとなっている。Mrtf-b は、細胞に力が加わってアクチンリモデリングが起こると細胞質から核内にシャトルし、Tbx5 と複合体を形成して ANF 遺伝子を強力に活性化する。

Mrtf-b は、別の転写因子 SRF (Serum Response Factor) とも複合体を形成することがわかっており、ANF プロモーター上には Tbx5 結合部位の近傍に SRF 結合配列が存在している。また、SRF 結合配列に酷似した A/T-rich motif も存在している。MKL 2 が SRF を活性化して ANF 遺伝子の発現誘導を起す可能性を確かめるため、SRF 結合配列を *in vitro* mutagenesis で壊したが、Tbx5/Mrtf-b による転写活性化には変化がなかった。このことは、Tbx5 による ANF の力刺激依存的な発現には、SRF の関与が無いことを示している。

しかしながら、SRF 結合配列様 A/T-rich motif を壊すと、Tbx5/Mrtf-b による転写活性化は消失した。このことは、Tbx5/Mrtf-b による転写活性化には、A/T-rich motif に結合する転写因子が必須であることを意味している。

そこで、この A/T-rich-motif に結合する転写因子の探索を行った。まず、SRF、MEF の関与を確認したが、これらの因子の影響は皆無であった。転写因子データベースから、A/T-rich-motif に結合し得るものを抽出し、発現ベクターに組み込んで半網羅的に解析したが、ANF を Tbx5/Mrtf-b とともに転写活性化する因子の同定には至らなかった。さらに、データベース探索を拡大して検索し、いくつかの候補をピックアップして同様の実験を行った結果、Tbx5/Mrtf-b と協調的に働く因子をした。この転写因子は、Cut-homeodomain を持つ蛋白質で、核内では nuclear matrix と結合していることが知られている。

このようなアプローチに加え、A/T-rich-motif に結合する蛋白質を精製する実験も並行して行った。ビオチン化した A/T-rich-motif プローブを用いて核抽出液から結合を精製した所、約 85kDa の蛋白質の特異的なバンドを得た。前述の因子の分子量が計算上 85kDa であり、同じ因子を検出している可能性が高い。この因子はプロテオミクス解析によってその identity を解析中である。

Tbx5/Mrtf-b 複合体の全貌解明には至っていないが、この研究成果は力依存性転写活性化のメカニズムが予想以上に複雑で、核内マトリックスとの関連も出て来たことから、新しい視点で解析する必要があることを意味している。なお、この新規遺伝子のノックダウンなどの実験をゼブラフィッシュなどで行っている。

加えて、力感受性因子 Mrtf-b に関する新たな事象を見いだすことができた。従来、Mrtf-b が活性化できる転写因子は SRF のみ

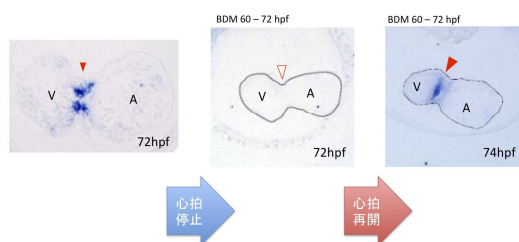
と考えられて来たが、我々の研究はこれに Tbx5 を加えることになった。さらに、我々は、核内にシャトルした Mrtf-b が、核内受容体を活性化し、脂質代謝の活性化と通じてエネルギー代謝 (ATP 産生) を制御していることを見いだした。血圧が上昇したり、頻脈などで心筋にエネルギー需要が高まると、心筋は ATP 産生を上昇させて適応する。また、心不全などによって心筋の収縮動態に病的な変化が起こると、正常時には脂質を燃焼して ATP を産生していた心筋が、脂質を利用できなくなり糖質を使って ATP 産生を行うようになる。これは ATP 産生効率が悪く、エネルギー代謝の観点から不利である。また、代謝されない脂質が心筋組織に蓄積すると Fatty heart を呼ばれる極めて危険な状態に陥る。従って、エネルギー源を糖質から脂質に戻してやる必要が末期心不全の治療にはある。しかし、この治療法が現時点で知られていない。

我々の見いだした力依存性代謝調節機構は、この病態を理解する手だてとなる。血圧上昇や頻脈によって心筋への力学負荷が増大すると、Mrtf-b が核内に移行して複数の核内受容体を活性化する。この結果、脂質代謝が亢進して ATP 産生を促進する。これは今まで報告されたことの無い新しいシグナル経路で、力刺激とエネルギー代謝を結びつける重要な知見となった。

2) miR-21、Egr1 プロモーターによる力刺激への反応可視化

miRNA のひとつ miR-21 は、力刺激依存的に発現誘導される遺伝子 (特に、血流に起因するずり応力によって血管内皮細胞に誘導される遺伝子) を検索して同定した。また、Egr1 も同様の手法で見だし、しかもその発現が miR-21 と酷似し、ゼブラフィッシュ心臓の弁形成心内膜細胞に心拍依存的に発現する (下図)。すなわち、拍動する心

egr1 遺伝子の発現も血流依存的



臓では弁形成細胞に発現し、心拍を止めると発現が消失する。心拍が止まって発現を失った心臓の拍動を再開させると、egr1 遺伝子の発現はすみやかに回復する。この力依存性発現制御は、培養ヒト血管内皮細胞 HUVEC を用いても確認できた。そこで、ヒトとゼブラフィッシュ egr1 遺伝子のプロモーター配列を解析、比較した。その結果、5つの SRF 結合配列が直列の配置されていることが明らかとなった (次ページ図)。

Mouse vs zebra egr1 promoter



application of mechanical strain to cells found to [localize extracellular matrix-coated substrates induce translocation of phospho CREB to the nucleus] Cell Biochem 104, 527, 2007 by Inghen

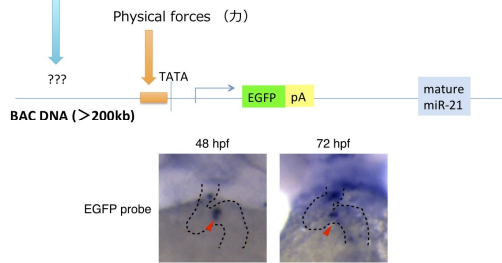


次に、miR-21 の力刺激依存的な発現がどのように制御されているかを知る目的で、miR-21 プロモーターを同定して解析した。驚くべきことに、転写開始点の上流 200bp の短い領域は、ヒトとゼブラフィッシュで高度の保存されており、重要なモチーフが同定可能であった。そして、これらのモチーフには、前述した SRF 結合サイトが高度に保存された状態で見つかった。すなわち、弁形成前、心内膜細胞には、強い逆流刺激が加わっていて、これによって MKL2 が細胞質から核内にシャトルする。その結果、SRF/Mrtf-b2 複合体が形成されて miR-21 プロモーターを活性化する（下図）。さらに、miR-21 プロモーター上には、Egr1 結合モチーフとなる GC-rich な配列も見つかった（下図）。



この可能性を確かめるため、約 200bp の短いプロモーター断片を EGFP 遺伝子に繋ぎ、トランスジェニックフィッシュを作製して EGFP 蛍光を確認した。結果、EGFP は心内膜、心筋を含む心臓全体で発現することがわかった。そして、BDM を用いて心拍を止めると EGFP の蛍光も消失した。BDM の除去による心拍再開では、EGFP の発現は速やかに回復した。以上の事実は、200bp の小さな領域に力反応性部位があり、その部位には SRF/Mrtf-b が結合する可能性があること、SRF/Mrtf-b は独立に転写因子 Egr1 を誘導し、Egr1 も miR-21 の発現誘導に寄与すること、弁特異的な miR-21 の発現調節は 200bp 以外の部分になることを結論できる。実際、miR-21 を含む大きな BAC クローンを用いると、EGFP はきれいに弁形成部位に限局し、血流依存性も再現できた（次図）。

Valve-specific regulation (弁特異性)



3) miR-21 と組織再生

miR-21 の発現が力によること、miR-21 の発現によって細胞増殖は正に制御されることから、例えば、組織が外力によって損傷した場合、miR-21 の発現が誘導されて細胞増殖が促進されて創傷が治癒し、動物種によっては再生が起こることも考えられる。

ゼブラフィッシュでは、尾びれ先端の切除、心臓先端（心尖部）の外科的切除によって再生が起こる。この再生過程で miR-21 の関与があるかを検証した。その結果、尾びれ切除、心尖部切除の療法で、miR-21 の強い発現誘導が確認できた。このことは、ゼブラフィッシュの組織再生の過程で miR-21 の関与があることを示唆している。

4) miR-21 ノックアウトマウスの解析

miR-21 の機能を、ゼブラフィッシュ以外の生物種で解析する目的でノックアウトマウスを作製した。残念ながら、miR-21 KO マウスは、正常に発生し、心臓形態、循環動態も正常であった。これは、miR-21 の機能には種による違いがあることを意味している。しかし、培養細胞への力学刺激印加では、miR-21 の発現誘導が速やかに起こることを確認していたので、マウスでも力刺激への反応過程で miR-21 が何らかの意義をもっていることは予想された。

そこで、マウスの創傷治癒過程での miR-21 の機能解析を行った。まず、マウス背部を剃毛して一定の大きさで皮膚をパンチアウトして欠損を作製した。そして、予想通り、皮膚欠損部位には miR-21 の発現が強く誘導されることを確認した。miR-21 KO マウスでは miR-21 の発現誘導は全く起こらない。

皮膚損傷後の治癒過程を観察した結果、驚くべきことに、miR-21 KO マウスでは、皮膚損傷が極めて速やかに治癒することが確認できた。しかも、治癒した皮膚では繊維化が抑制され、皮膚は瘢痕を形成せずにきれいに治癒した。創傷治癒過程で、miR-21 がどのような標的遺伝子を制御しているか、詳細な探索を行おうとしたが、皮膚損傷部位からの mRNA の精製が充分に行えず、網羅的に検索するに至っていない。

本研究助成金によって、CRISPR/Cas9 のシステムを導入した。現時点で、ゼブラフィッシュを用いた egr1, miR-21 遺伝子への変異導入に成功した。現時点で、変異を持ったゼブラフィッシュ個体の成長を待っている。

る段階であり、解析可能となった時点で詳細な分析を進める。また、マウス Egr1 に関しては、発生過程の腱でその発現が顕著であり、筋肉の収縮によって腱に力学的な負荷が加わることから、腱の力刺激依存できた形成に Egr1 は関与していることが示唆される。Egr1 のノックアウトマウスの作製は、購入した ES 細胞の質が悪く、germ line への導入が起こらず、本研究期間内に KO マウスを作出することが出来なかった。Egr1 遺伝子の機能は、代謝、腱/筋発生と維持、心筋恒常性の維持など、多様であることを考え、今後も KO マウスを作製することを目指したいと考えている。

5) mechanotransduction 因子としての YAP とその転写活性化機構に関する新規因子

Hippo 経路に属する YAP は、細胞が基質の硬さに反応したり、細胞密度を検知して反応を起す際に、転写因子 Tead にシグナルを伝達するものとして注目されている。我々は、この YAP の転写活性化に深く関する因子を同定した。

マウスの初期胚発生時、コンパクションを起してタイトな細胞集団を形成するが、この細胞集団の外側は trophoctoderm 細胞として分化する。内側の細胞は未分化性を保持して ICM となるが、タイトな細胞集団の外側、内側には、それぞれ引張りとは圧縮という正反対の力が加わる。

我々が以前からノックアウトマウスを作製して、マウス初期胚の発生を解析してきたが、Sbno1 遺伝子の KO マウスでは、trophoctoderm 細胞の分化が選択的に失われる。trophoctoderm 細胞の分化には YAP が重要であることが知られており、Sbno1 と YAP の機能的な関連を見た所、Sbno1 は YAP/Tead の転写活性化能を正に制御する因子であった。そして、YAP/Tead/Sbno1 転写活性化複合体は、Trophoctoderm 細胞の分化に必須な Cdx2 遺伝子プロモーターの一部に結合し、その転写を制御していた。

Sbno1 は、YAP/Tead 以外にも Notch のシグナルと協調的に働くなど、これまでに無い新しい知見が得られ、現在、論文投稿に向けてデータを整理中である。

また、Sbno1 は、様々な癌で修飾を受けていることも明らかとなり、mechanotransduction と癌化、mechanotransduction と trophoctoderm 分化という局面を、Sbno1 という新しいクロマチン因子から解析する突破口となると期待できる。

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 12 件)

1; Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New

BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 23, 6553-6566, 2014 査読有り

2; Saito AC, Ogura T, Fujiwara K, Murata S, Nomura SM. Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells: A Method for Cell-Giant Unilamellar Vesicle Electrofusion. *PLoS ONE* 9, e106853. doi; 10.1371/journal.pone.0106853, 2014 査読有

3; Huynen L, Suzuku T, Ogura T, Watanabe Y, Craig D, Millar CD, Hofreiter M, Smith C, Mirmoerini S, Lambert D. Reconstruction and in vivo analysis of the extinct *tbx5* gene from ancient wingless moa (Aves: Dinornithiformes). *BMC Evolutionary Biology*, 14, 75, 2014 査読有り

4; Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-Function Mutations in RIT1 Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 93, 173-180, 2013. 査読有り

5; Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, S. Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, Kawakami K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T. Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. *Nature Communications*, 4, Article number 1978, 2013 (doi:10.1038/ncomms2978). 査読有り

6; Watanabe Y, Zaffran S, Kuroiwa A, Higuchi H, Ogura T, Harvey RP, Kelly RG, Buckingham M. Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by *Tbx1*, *Nkx2-5*, and *Islet1* reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 18273-18280, 2012 査読有り

7; Hirota Y, Sawada M, Kida YS, Huang S, Yamada O, Sakaguchi M, Ogura T, Okano H, Sawamoto K. Roles of planar cell polarity signaling in maturation of neuronal precursor cells in the postnatal mouse olfactory bulb. *Stem Cells* 30, 1726-1733, 2012 査読有り

[学会発表](計 9 件) 代表的なものを記載

1; 小椋利彦, Hemodynamic forces as a regulator of cardiogenesis and homeostasis, The 62nd NIBB Conference, 2014 年 11 月 17~19 日、

「岡崎コンファレンスセンター」(愛知県・岡崎市)

2: 小椋利彦、生命現象を力学的に再解釈する、そして、生命現象を再構築する???, 東京工業大学生体システム専攻バイオサイエンスシンポジウム、東京工業大学すずかけ台キャンパス、2014年2月18日、「東京工業大学」(神奈川県・横浜市)

3: 小椋利彦、生命現象を力を視点に再解釈するために、生物物理学会東北支部会、2013年12月13日、「東北大学片平キャンパス」(宮城県・仙台市)

4: 小椋利彦、細胞は力をどのように感知し、どのように反応するか、日本人類遺伝学会大8回大会特別講演、2013年11月21日、「仙台江陽グランドホテル」(宮城県・仙台市)

5: 小椋利彦、力を視点に、生命現象を再解釈する、第19回創発システムシンポジウム(創発夏の学校2013)チュートリアル講演&ワークショップ、2013年8月31日~9月2日、「大阪アカデミア」(大阪府・大阪市)

6: 小椋利彦、Physical forces as a regulator of morphogenesis and homeostasis – paving a way to medical application、第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2013年6月27日、「京都大学知芝蘭会館」(京都府・京都市)

7: 小椋利彦 Hemodynamics-dependent valvulogenesis of zebrafish heart mediated by miR-21. Exciting Biology 2012 (Force in Biology) 2012, 10, 4-10, 6 ダブリン(アイルランド)

8: 小椋利彦 Physical forces generated by cells and sensed by cells. 6th Mechanobiology Conference 2012, 11, 12-11, 14 シンガポール(シンガポール)

9: T.Banjo, M Omi, KY. Miyasaka, YS. Kida, T Ogura. Hemodynamics-dependent valvulogenesis of zebrafish heart mediated by miR-21. Weinstein Cardiovascular Development Conference 2012, 5, 2-5, 4. シカゴ(米国)

〔図書〕(計2件)

1: 小椋利彦、日本臨床社、日本臨床 第73巻(第1号) 日本臨床 特集 多発性骨髄腫の病態と最新治療(基礎と臨床の最新情報)サリドマイド、cereblon と多発性骨髄腫、2015年、(149-145頁)

2: [監修]小椋利彦、学研メディカル秀潤社、細胞工学 Vol 33、No. 9 特集 新メカノトランスダクション(工学との融合が明らかにする力学刺激センサーの動作とシグナル伝達) 2014年(910-1012頁)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞内へ物体を導入する方法
発明者: 斉藤明、野村慎一郎、小椋利彦
権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構
種類: 特許

番号: 特願2014-059898

出願年月日: 2014、3、24

国内外の別: PCT 出願準備中

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

小椋 利彦 (OGURA TOSHIHIKO)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 60273851

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: